

VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*



**Anais
2020**



VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

APRESENTAÇÃO

No Anais do VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology* e XI Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia estão publicados os resumos expandidos e resumos simples de trabalhos científicos apresentados durante o evento. O mesmo foi organizado pelo Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, nos dias 16 a 18 de setembro de 2020.



PBF 

Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Fisiopatologia



UEM

Universidade
Estadual de
Maringá

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., Brasil)

Anais de Simpósios do Programa de Biociências e Fisiopatologia

- UEM / Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-
Graduação em Biociências e Fisiopatologia. -- Vol. 1 (2014)-

-- Maringá : UEM/PBF, 2014-

Anual

ISSN 2176-6045

1. Biociências - Periódicos. 2. Fisiopatologia - Periódicos.
3. Educação física e lazer. I. Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia.

CDD 21.ed. 796.07



VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*
XI *Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

ORGANIZAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

REITORIA

Prof. Dr. Júlio César Damasceno - **Reitor**

Prof. Dr. Ricardo Dias Silva - **Vice-Reitor**

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman - **Diretor**

Prof. Dr. Nelson Nardo Júnior - **Diretor Adjunto**

**DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E
BIOMEDICINA**

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini - **Chefe**

Profa. Dra. Vânia Ramos Sela da Silva - **Chefe Adjunta**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS
E FISIOPATOLOGIA**

Profa. Dra. Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo -
Coordenadora

Profa. Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini -
Coordenadora Adjunta



VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*
XI *Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

COORDENAÇÃO GERAL

Profa. Dra. Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo

Profa. Dra. Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça

Profa. Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini

COMISSÃO ORGANIZADORA

Amanda Gubert Alves dos Santos

Camila Barros Galinari

Cíntia Akemi Tanoshi

Deborah Thaís Palma Scanferla

Lincoln Luís Silva

Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado

Renata Sano Lini

STAFF

Glaucia Sayuri Arita

Isabella Harumi Yonehara Noma

Jean Eduardo Meneguello

João Vítor Perez de Souza

Victor Hugo de Souza



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SUMÁRIO

Resumos expandidos.....	18
Estudos em biociências e fisiopatologia.....	19
INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DO CIPROFLOXACINO CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DA URINA.....	20
UMA NOVA PROPOSTA: MULTIPLEX – PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> ; genes <i>mecA</i> e <i>PVL</i>	26
FLORICULTURA: UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM UM MUNICÍPIO NO NORTE-CENTRAL DO PARANÁ.....	32
Estudos em cardiopatologia.....	38
RESTRIÇÃO PROTEICA NA ADOLESCÊNCIA E A SUA IMPLICAÇÃO NAS DISFUNÇÕES DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMICO NA HIPERTENSÃO A LONGO PRAZO	39
CARDIOVASCULAR EVENTS, ALL-CAUSE AND CARDIOVASCULAR MORTALITY WITH LEFT VENTRICULAR GLOBAL LONGITUDINAL STRAIN IN CHRONIC KIDNEY DISEASE PATIENTS: SYSTEMATIC REVIEW	45
DISFUNÇÃO CARDIOMETABÓLICA EM RATOS ADULTOS PROGRAMADOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA NA ADOLESCÊNCIA	51
Abordagem imunogenética em doenças crônicas e infecciosas	57
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-SSP PARA GENOTIPAGEM DE SNPS NOS GENES <i>IL33</i> E <i>IL1RL1</i>	58
TNF-alfa and IL-17 CYTOKINES LEVELS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS AFTER ANTI-TNF THERAPY	64
PROFILES OF KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS AND HLA CLASS I LIGANDS IN PATIENTS WITH ZIKA VIRUS.....	70
CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- α , IL-17A e IL-17F COM OS GENÓTIPOS DESSAS CITOCINAS EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE ...	76
ROLE OF <i>TOLL-LIKE RECEPTOR</i> GENE VARIANTS IN ZIKA VIRUS INFECTION	81
Descobertas em neurogastroenterologia.....	87
INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> PROMOVE ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS NO ÍLEO E CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS	88
IMPACTO DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO <i>Toxoplasma gondii</i> SOBRE O DUODENO E JEJUNO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS C57BL/6	94



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ALTERAÇÕES INTESTINAIS EM HAMSTERS EM DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	100
A ASSOCIAÇÃO DA PERSONALIDADE <i>MINDFULNESS</i> COM A IMUNOGLOBULINA-A SECRETÓRIA FECAL E O ESTRESSE PSICOLÓGICO AGUDO - UM ESTUDO EXPLORATÓRIO EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	106
Inovações na terapêutica antitumoral e de feridas.....	112
ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> DA HIPERICINA ENCAPSULADA COM PLURÔNICO F-127 EM MODELO DE NEOPLASIA DO EPITÉLIO MAMÁRIO ...	113
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA CRISINA EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL EM MODELO DE CULTURA CELULAR 3D.....	119
Novas alternativas para tratamentos antimicrobianos	124
EVALUATION OF NEW THERAPEUTIC OPTIONS FOR PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS.....	125
ATIVIDADE ANTI- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> E CARACTERIZAÇÃO DE PIPERINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA REVESTIDAS COM QUITOSANA.....	130
FUNGICIDAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF A 1,3,4-OXADIAZOLE DERIVATIVE AGAINST <i>Candida albicans</i>	136
Resumos simples	142
Bioquímica Clínica.....	143
VARIÁVEIS PRÉ-ANALÍTICAS GERADORAS DE RECOLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO NO LABORATÓRIO DE ENSINO E PESQUISA EM ANÁLISES CLÍNICAS (LEPAC- UEM)	144
MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA ATRAVÉS DE ANTIBIÓTICOS E PROBIÓTICOS TEM EFEITO POSITIVO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL NO ÍLEO DE RATOS	145
QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL PROMOVE INFLAMAÇÃO NO PULMÃO DE RATOS WISTAR	146
AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO NO HUMOR VÍTREO DE RATAS WISTAR COMO CONTRIBUIÇÃO PARA A ESTIMATIVA DO INTERVALO <i>POST MORTEM</i>	147
Citologia clínica	148
CÂNCER DE COLO DO ÚTERO: UM OLHAR PARA O SEGUIMENTO.....	149
SEGUIMENTO NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	150



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CELL INTERNALIZATION AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF HYPERYCIN ENCAPSULATED IN PLURONIC® F-127 IN HUMAN CERVICAL CANCER CELLS	151
ARTEPILLIN C INDUCES CYTOTOXIC EFFECTS ON BREAST CANCER CELLS THROUGH NECROSIS AND LATE APOPTOSIS	152
Epidemiologia	153
SAÚDE MENTAL ADOLESCENTE: AVALIAÇÃO SOBRE DEPRESSÃO EM ESTUDANTES DE UMA CIDADE DE PEQUENO PORTE.....	154
TAXA DE MORTALIDADE EM GESTANTES INFECTADAS COM HIV	155
COMPORTAMENTOS DE RISCO DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE ESCOLA CONFSSIONAL E NÃO CONFSSIONAL NO NOROESTE DO PARANÁ	156
ANÁLISE DA TENDÊNCIA DE INTERNAÇÕES POR TUBERCULOSE PULMONAR EM UM ESTADO DO SUL DO BRASIL	157
ANÁLISE ESPACIAL DO VÍRUS DA DENGUE NO PARANÁ	158
ANÁLISE DAS FORMAS DE EXPOSIÇÃO NAS INTOXICAÇÕES POR AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ, 2010-2019	159
SPATIAL ANALYSIS OF HEPATITIS B MORTALITY IN PARANÁ STATE	160
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS NOTIFICAÇÕES DE DENGUE NO BRASIL ...	161
COMORBIDADES E ÓBITOS POR COVID-19 NO BRASIL.....	162
TIPOS DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS NO ESTADO DO PARANÁ	163
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE HIV/AIDS NA 15ª REGIONAL DE SAÚDE DO PARANÁ.....	164
ESTILO DE VIDA E COMPORTAMENTO DE RISCO DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE UMA ESCOLA PÚBLICA DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ	165
COX PROPORTIONAL-HAZARDS PARA DETERMINAR OS FATORES DE RISCO PARA ÓBITOS DE PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS EM UNIDADES DE TRATAMENTO INTENSIVO NO BRASIL	166
PREVALÊNCIA DE AIDS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: UMA ANÁLISE COMPARATIVA SEGUNDO CATEGORIA DE EXPOSIÇÃO SEXUAL	167
ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS NO ESTADO DO PARANÁ: NO PERÍODO DE 2015 A 2019	168



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

LESÕES AUTOPROVOCADAS INTENCIONALMENTE POR PESTICIDAS: ANÁLISE DOS CASOS NOTIFICADOS NO SIM-PARANÁ ENTRE 2009 E 2018	169
DEPRESSÃO E CONSUMO DE SELÊNIO: UM ESTUDO EM AGRICULTORES DO ESPÍRITO SANTO	170
FUNGAL INFECTIONS IN HOSPITALIZED PATIENTS IN THE REGION OF MARINGÁ – PR (2018 TO 2020)	171
Farmacognosia	172
PLANTAS MEDICINAIS COM POTENCIAL AÇÃO CONTRA O VIRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	173
PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DO GEL DE <i>Aloe vera</i> : UMA DISCUSSÃO SOBRE SEU USO EM QUEIMADURAS.....	174
AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO GEL DE <i>Aloe vera</i>	175
ATIVIDADE BIOLÓGICA DA <i>Guazuma ulmifolia</i> LAMARK. - REVISÃO SISTEMÁTICA	176
ESTUDO COMPARATIVO DE SECAGEM DO EXTRATO DA CASCA DE UVA (<i>Vitis labrusca</i>) MICROENCAPSULADO.....	177
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cordia verbenacea</i> .	178
Farmacologia	179
DERIVADOS IMIDAZÓLICOS COMO POTENCIAIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS	180
EFEITO DA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO ÁCIDO VANÍLICO CONTRA A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELOS.....	181
ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL E CÂNFORA OBTIDOS DAS FOLHAS DE <i>Ocimum kilimandscharicum</i> EM CAMUNDONGOS	182
EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ANETOL + METOTREXATO NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NO METABOLISMO HEPÁTICO DE RATOS ARTRÍTICOS	183
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ANETOL MICROENCAPSULADO EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA	184
A BERBERINA INIBE A PRODUÇÃO DE GLICOSE E O CONSUMO DE OXIGÊNIO NO FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO	185



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COMBINAÇÃO DE ANÁLISES ESPECTROSCÓPICA VIBRACIONAL E HISTOLÓGICA É EFETIVA PARA O ESTUDO DE ALTERAÇÕES NA MEMBRANA SINOVIAL DE RATOS ARTRÍTICOS E PARA AVALIAR O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO	186
β -MYRCENE PROTECT AGAINST ACUTE ACETAMINOPHEN HEPATOTOXICITY IN MICE.....	187
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO β -CARIOFILENO NO MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO.....	188
EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO BETA-MIRCENO NO MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	189
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO RESOLVINA D2 NO MODELO DE LESÃO CUTÂNEA INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO	190
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DA COENZIMA Q10 NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON.....	191
AVALIAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA NA INDUÇÃO DE CISTITE EM RATAS WISTAR POR VIA INTRAPERITONEAL	192
ACETYLSALICYLIC ACID REDUCES SKIN INFLAMMATION CAUSED BY UVB IRRADIATION: ROLE OF THE 15-EPI-LIPOXIN A4 - ALX/FPR2 AXIS.....	193
FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO RESOLVINA D5 INIBE O PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO.....	194
Fisiologia.....	195
DIETA COM BAIXO TEOR DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DIMINUI A GLICONEOGENESE HEPÁTICA EM RATOS	196
AVALIAÇÃO DO CONSUMO SEMANAL DE RAÇÃO NUTRICIONAL E ÁGUA EM ANIMAIS HIPERTRIGLICERIDÊMICOS QUE SUPER EXPRESSAM A APOLIPOPROTEÍNA apoCIII SUBMETIDOS A TREINAMENTO AERÓBICO DE 8 SEMANAS EM ESTEIRA	197
A EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE COBRE EM RATOS DIABÉTICOS REDUZ A REATIVIDADE DE VASOS DE CONDUTÂNCIA	198
CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS DE COMPOSIÇÃO CORPORAL E PERFIL BIOQUÍMICO DE ADOLESCENTES DO SEXO FEMININO COM OBESIDADE..	199
EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBICO DE 8 SEMANAS EM ESTEIRA NA MASSA CARDÍACA DE ANIMAIS DISLIPIDÊMICOS POR SUPEREXPRESSÃO DA ApoCIII: DADOS PRELIMINARES	200



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS POR SUPEREXPRESSÃO DA ApoCIII APRESENTAM CONSERVAÇÃO DA MASSA TOTAL DE GORDURA APÓS 8 SEMANAS DE TREINAMENTO AERÓBICO: DADOS PRELIMINARES.....	201
Genética	202
EXPRESSÃO DA PROTEASE PRINCIPAL 3CL DE SARS-CoV-2	203
MICRORNA-155 AS THERAPEUTIC OPTION FOR CANCER TREATMENT	204
Imunogenética	205
EXTRAÇÃO DE DNA DE LEITE HUMANO POR DIFERENTES METODOLOGIAS	206
DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PCR-ARMS PARA A GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs2073618 NO GENE OSTEOPROTEGERINA	207
PADRONIZAÇÃO DE PCR-SSP PARA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs1800896 NO GENE <i>IL10</i>	208
Imunologia	209
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO EM PACIENTES DO MUNICÍPIO DE CAMPO ERÊ-SC.....	210
ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE DERIVADOS DIESTERIFICADOS DO ÁCIDO URSÓLICO EM MACRÓFAGOS RAW264.7.....	211
PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE ZIKA VIRUS UTILIZANDO PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE ENVELOPE.....	212
NÍVEL DE IL1 β E TNF α SALIVAR E O DESFECHO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	213
EXPRESSÃO DE IL-6 EM EPITÉLIO DE AMOSTRAS DE CÉRVICE UTERINA POSITIVAS PARA HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO	214
EXPRESSÃO DE p16 EM CÉRVICE UTERINA DE PACIENTES INFECTADAS POR HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO	215
Microbiologia	216
SELEÇÃO DE EPITOPOS ESPECÍFICOS DO VÍRUS DA DENGUE COM FOCO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	217
AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS POLISSUBSTITUÍDOS FRENTE A <i>Candida</i> spp. E <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	218
<i>Ex vivo</i> PHOTOACOUSTIC SPECTROSCOPY FOR MONITORING DERMATOPHYTOSIS AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY WITH HYPERICIN IN P-123.....	219



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SPECIES AND SUSCEPTIBILITY TO AZOLIC ANTIFUNGALS IN <i>Aspergillus</i> spp ENVIRONMENTAL STRAINS FROM THE SOUTHEAST REGION OF BRAZIL ..	220
ANÁLISE BACTERIANA DE TRÊS LINHAS DO TRANSPORTE COLETIVO DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ.	221
POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE CULTURA DE CALOS DE <i>Cereus hildmannianus</i> EM MEIO ALTERNATIVO	222
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> COM O USO DE CURCUMINA SOBRE A ESPÉCIE DE <i>Candida albicans</i>	223
HEMOCULTURAS POSITIVAS DE PACIENTES NO PRONTO ATENDIMENTO DE UM HOSPITAL DE ENSINO: PREVALÊNCIA DE MICRORGANISMOS E ANÁLISE DA MORTALIDADE	224
MORPHOLOGICAL ALTERATION OF <i>Candida albicans</i> AFTER MURINE CANDIDEMIA.....	225
OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DO CARVACROL E SUA AVALIAÇÃO ANTIMICOBACTERIANA.....	226
ANTIBIOTIC ADJUVANTS INCREASING POLYMYXIN B ACTIVITY IN MULTIDRUG RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA	227
ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE IS DOWN-REGULATED AFTER PHOTOINACTIVATION BY ROSE BENGAL	228
UTILIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Klebsiella oxytoca</i> COMO AGENTE QUELANTE DE FERRO BIODEGRADÁVEL.....	229
GLUTATHIONE REDUCTASE INHIBITORS SELECTED BY VIRTUAL SCREENING	230
MONITORAMENTO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE <i>Pseudomonas</i> spp. RECUPERADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA NO PERÍODO DE DEZ ANOS.....	231
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPOSTO SINTÉTICO LMM6 CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i>	232
SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIMICOBACTERIANA DE DERIVADOS INDÓLICOS	233
DINÂMICA DE MORTE DE <i>Staphylococcus aureus</i> APÓS EXPOSIÇÃO A EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO.....	234
PROTEOMIC PROFILING OF KPC-PRODUCER <i>Klebsiella pneumoniae</i> AFTER INDUCED POLYMYXIN B RESISTANCE	235
EFFECTIVENESS OF CURCUMIN PHOTODYNAMIC THERAPY IN A PATIENT WITH ONYCHOMYCOSIS.....	236



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL CULTIVÁVEL DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> Linnaeus (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) COM PROSPECÇÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO	237
PREVALÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR <i>Candida</i> spp. EM PREMATUROS DE HOSPITAL TERCIÁRIO DA REGIÃO NORDESTE, BRASIL.....	238
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DE RESÍDUO FOLIAR DE <i>Stevia reubaudiana</i>	239
<i>Microsporium canis</i> AS A FUNGAL AGENT CLOSELY RELATED TO <i>Tinea capitis</i> AT MARINGÁ/PR	240
Morfologia	241
PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL NÃO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM NEURÔNIOS ENTÉRICOS DE RATOS WISTAR	242
REGENERAÇÃO ÓSSEA DA CALVÁRIA DE RATOS APÓS IMPLANTE DO COMPÓSITO HIDROXIAPATITA- β -TRICÁLCIO FOSFATO (HA- β TCP) ASSOCIADO À CURCUMINA.....	243
NEONATAL METFORMIN AMELIORATE THE REPRODUCTIVE INJURIES BY ADULTHOOD HIGH-FAT DIET INTAKE	244
EXPRESSÃO DE BMP-2 EM DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATOS, APÓS IMPLANTE DE SCAFFOLDS DE HIDROXIAPATITA (HA β) NATURAL E SEU NANOCOMPÓSITO COM Nb ₂ O ₅ (HA β -Nb)	245
AÇÃO DO GEL DE <i>Limonium brasiliense</i> NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS.	246
USO DE <i>Echinacea purpurea</i> CAUSA AUMENTO NA ÁREA DOS GÂNGLIOS MIOENTÉRICOS DO JEJUNO DE <i>Rattus norvegicus</i> COM INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i>	247
LOW PROTEIN DIET INFLUENCED THE PROLIFERATION/DIFFERENTIATION CELL DYNAMIC IN RAT VENTRAL PROSTATE	248
AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS VASOS HEPÁTICOS DE RATOS WISTAR SUPLEMENTADOS COM L-GLUTATIONA 1% EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE WALKER-256.....	249
MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE DISTAL COLON WALL OF UNINFECTED AND INFECTED RATS WITH 5000 <i>Toxoplasma gondii</i> OOCYSTS IN DIFFERENT PERIODS OF INFECTION.....	250
EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO 5-FLUOROURACIL: ALTERAÇÕES NA MASSA CARDÍACA E NA DISPOSIÇÃO DE FIBRAS COLAGENAS DE RATOS WISTAR	251



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> NÃO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS TÚNICAS MUSCULARES DO JEJUNO DE HAMSTERS.....	252
REDUÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DE MASTÓCITOS DO LOBO VENTRAL DA PRÓSTATA DE RATOS <i>Wistar</i> ADMINISTRADOS COM 5-FLUORURACIL ...	253
QUANTITATIVE ANALYSIS OF CD68-POSITIVE MACROPHAGES IN THE MUCOSA OF THE JEJUNUM OF ARTHRITIC RATS TREATED WITH QUERCETIN-LOADED MICROCAPSULES	254
ACUTE INFECTION INDUCED BY <i>Toxoplasma gondii</i> CAUSES HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE DISTAL COLON OF RATS	255
DOSE DE 5-FLUOROURACIL UTILIZADA NA PRÁTICA ONCOLÓGICA PROMOVE ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL E NOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO PLEXO MIOENTÉRICO DO CÓLON DE RATOS <i>Wistar</i> ..	256
INFECÇÃO CRÔNICA DO <i>Toxoplasma gondii</i> NA MORFOMETRIA DOS FOLÍCULOS OVARIANOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS.....	257
LEISHMANIOSE VISCERAL NÃO PROVOCA ALTERAÇÃO NA ÁREA DOS GÂNGLIOS MIOENTÉRICOS E SUBMUCOSOS DO JEJUNO DE CÃES	258
Neurociências	259
PERSPECTIVAS E DESAFIOS APRESENTADAS POR PROFESSORES QUE TRABALHAM COM CRIANÇAS DIAGNOSTICADAS COM ALTAS HABILIDADES E SUPERDOTAÇÃO	260
AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CRF1 NO NÚCLEO INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL (BNST) NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS TIPO ANSIOSOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6	261
5HT1A INDUCE LONG-TERM SYNAPTIC DEPRESSION IN THE PREFRONTAL CORTEX VIA TREK-1 ACTIVATION	262
AÇÃO NEUROPROTETORA E MODULADORA DA MICROBIOTA INTESTINAL DA <i>Ginkgo biloba</i> E <i>Centella asiatica</i> EM RATAS <i>Wistar</i> OVARIETOMIZADAS..	263
LABELING DENSITY OF PERINEURONAL NET IN EXTRINSIC INNERVATION OF MICE DISTAL COLON.....	264
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA DE PARKINSON EM LONDRINA – PARANÁ.....	265
Parasitologia	266
REDUÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS NA TELA SUBMUCOSA DO DUODENO DE RATOS SUBMETIDOS A INFECÇÃO AGUDA POR <i>Toxoplasma gondii</i>	267



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> CAUSA ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA DOS NEURÔNIOS MIENTÉRICOS DO ÍLEO DE HAMSTERS	268
ANÁLISE DA CONTAGEM DE CÉLULAS TGF- β IMUNORREATIVAS NO DUODENO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFECÇÃO AGUDA POR <i>Toxoplasma gondii</i>	269
COOPERATIVE ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES AND ANTIPARASITIC DRUGS AGAINST <i>Giardia intestinalis</i> IN VITRO	270
A INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> E O TRATAMENTO COM <i>Echinacea purpurea</i> NÃO CAUSAM ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE MASTÓCITOS 5-HT-IR NO ÍLEO DE RATOS WISTAR	271
TERAPIA ALTERNATIVA PARA TRATAMENTO DE CAMUNDOGOS SWISS NATURALMENTE INFECTADOS COM <i>Giardia muris</i>	272
<i>Blastocystis hominis</i> : RELAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA E SINTOMAS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS	273
IDENTIFICAÇÃO ENTEROPARASITÁRIA DE DUAS LINHAS DO TRANSPORTE COLETIVO DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ	274
CHARACTERIZATION OF ANTI- <i>Trichomonas vaginalis</i> ACTIVITY OF 1,10 PHENANTHROLINE -5,6-DIONE (PHENDIONE) AND METAL DERIVATIVES ...	275
EFEITOS DA INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> SOBRE OS MASTÓCITOS DO ÍLEO DE HAMSTERS DOURADOS	276
<i>Trypanosoma cruzi</i> SECRETES EXTRACELLULAR VESICLES DURING INFECTION THAT ACT AS MODULATORS OF THE HOST'S IMMUNE SYSTEM	277
O USO DE <i>Echinacea purpurea</i> EM RATOS COM INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> AUMENTA O NÚMERO DE MASTÓCITOS NA PRÓSTATA DORSOLATERAL	278
ATIVIDADE IN VITRO DO ELETROFIO CONTENDO ANFOTERICINA B E GLUCANTIME® SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania sp.</i>	279
PERFIL DE IL-10 E IFN γ EM GESTANTES EM DIFERENTES FASES CLÍNICAS DA TOXOPLASMOSE	280
TRATAMENTO COM <i>Echinacea purpurea</i> ALTERA O NÚMERO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES EM RATOS INFECTADOS POR <i>Toxoplasma gondii</i>	281
INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ALTERA AS FIBRAS COLÁGENAS DO ÍLEO DE HAMSTERS	282



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> E TRATAMENTO COM <i>Echinacea purpurea</i> PROVOCAM AUMENTO DE MASTÓCITOS SEROTONINÉRGICOS NO JEJUNO DE <i>Rattus norvegicus</i>	283
ANÁLISE DE CÉLULAS CALICIFORMES NO DUODENO DE <i>Rattus norvegicus</i> SUBMETIDOS A INFEÇÃO CRONICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> E TRATADOS POR <i>Echinacea purpurea</i>	284
IN VITRO EFFECTS OF GLUCANTIME® INCORPORATED IN PVA BY ELECTROSPINNING ON AMASTIGOTE FORMS OF <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	285
COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS DE ROTINA QUANTO À RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE <i>Giardia duodenalis</i>	286
ENTEROPARASIToses EM ESCOLARES INDÍGENAS NO SUL DO BRASIL ANTES E APÓS TRATAMENTO EM MASSA	287
Patologia	288
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE RATOS WISTAR INDUZIDOS COM 1,2 DIMETILHIDRAZINA (DMH) E TRATADOS COM <i>Bifidobacterium animalis</i>	289
IMPLICAÇÕES DAS MUTAÇÕES NOS GENES <i>KRAS</i> E <i>EGFR</i> NO CÂNCER COLORRETAL HUMANO	290
Pesquisa clínica.....	291
ESCOLHAS ALIMENTARES DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA ATENDIDAS EM UM SERVIÇO DE ONCOLOGIA NA REGIÃO MEIO OESTE DE SANTA CATARINA	292
INTERVENÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO DIMINUI NÍVEL DE BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO E HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	293
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE <i>Rhodiola rosea L.</i> EM PRATICANTES DE ATIVIDADE FÍSICA	294
Saúde coletiva	295
PERFIL E FATORES ASSOCIADOS ÀS DISLIPIDEMIAS EM HIPERTENSOS E DIABÉTICOS ACOMPANHADOS PELA ATENÇÃO PRIMÁRIA EM VIÇOSA/MG	296
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONSUMO E CONVÍVIO COM OUTRAS PESSOAS NO ABANDONO DO TABACO	297
COVID-19 – O USO DAS TECNOLOGIAS DIGITAIS E DA TELEMEDICINA: UMA DISCUSSÃO SOBRE SEGURANÇA DE DADOS E ASPECTOS BIOÉTICOS	298



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

O CUIDADO DE ENFERMAGEM AO PACIENTE OBESO NORTEADO PELOS DIAGNÓSTICOS E INTERVENÇÕES DE ENFERMAGEM.....	299
A INSERÇÃO DA BIOÉTICA NO SERVIÇO SOCIAL	300
MORTALIDADE INFANTIL E FETAL: COMPARATIVO ENTRE O PARANÁ E A 7ªRS/PR.....	301
ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS E PERFIL DE CONSUMO DO TABACO EM PACIENTES ATENDIDOS POR UM CENTRO DE TRATAMENTO EM MARINGÁ	302
Toxicologia.....	303
CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO PRELIMINAR DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE COPAIBA (<i>C. langsdorffi</i>).....	304
3D RECONSTRUCTED EPIDERMIS MODEL TO EXPLORE THE SIMULTANEOUS EXPOSURE OF SKIN TO AIR PARTICULATE MATTER AND SOLAR RADIATION	305
EFEITO DA <i>Cimicifuga racemosa</i> L. E DOXORRUBICINA SOB A MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE CAMUNDONGAS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	306
AVALIAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA, MORFINA E HEROÍNA EM FLUÍDO ORAL.....	307
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES PRÉ-TREINO	308
ANÁLISE DE ETILENOTIUREIA POR CG-EM E EXTRAÇÃO POR DPX	309
EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF <i>Athenaea velutina</i> ON ENZYMATIC ACTIVITY OF THE EPIDIDYMIS OF WISTAR RATS.....	310
CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES DA CULTURA DA UVA	311
EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O METABOLISMO E ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO	312
DETERMINAÇÃO DE ANFETAMÍNICOS EM CABELO: VALIDAÇÃO ANALÍTICA	313
Vigilância em saúde e ambiental.....	314
PRESENÇA DE BACTÉRIAS EM ÁGUAS MINERAIS COMERCIALIZADAS NO BRASIL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	315
POSSÍVEIS INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS EM FUMANTES	316
ATUAÇÃO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA EM TEMPOS DE COVID-19	317

Resumos expandidos



*Estudos em biociências
e fisiopatologia*



INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DO CIPROFLOXACINO CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DA URINA

Aline Natália de Santi¹; Mayara Assumpção Lolis Baveloni²; Isabella da Silva de Oliveira³; Monica de Souza Ferreira de Mattos¹; Danielle Rosani Shinohara⁴; Rúbia Pazzetto⁵; Sheila Alexandra Belini Nishiyama⁶; Maria Cristina Bronharo Tognim⁶

¹ Estudante de pós-graduação, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

² Estudante de graduação, Medicina, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

³ Estudante de graduação, Biologia, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.

⁴ Estudante de pós-graduação, Programa de Ciências da Saúde, PR, Brasil

⁵ Farmacêutico Bioquímico, Hospital Universitário de Maringá, PR, Brasil

⁶ Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, PR, Brasil

e-mail: alinesanti0@gmail.com

Palavras chaves: *Enterobacteriaceae*; antibacterianos; ciprofloxacino.

1. INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções bacterianas em mais comuns em humanos, afetando anualmente milhões de pessoas na comunidade. Consideradas entre as mais frequentes causas de internações por infecções em pacientes idosos, as ITUs também são motivo mais comum de prescrição de antimicrobianos na atenção básica [1,2].

Grande parte das ITUs são causadas por bactérias Gram-negativas, especialmente espécies da família *Enterobacteriaceae*, sendo *Escherichia coli* comumente isolada em aproximadamente 70 a 90% dos casos relacionados à ITU não complicada [3,4]. Além de *E. coli*, espécies de *Klebsiella*, *Proteus* e *Enterobacter* são frequentemente recuperadas de pacientes com ITUs [5]. O tratamento de ITUs tem se tornado um desafio tanto devido à recorrência dessas infecções, quanto ao aumento gradativo das taxas de resistência bacteriana aos antimicrobianos, incluindo o ciprofloxacino [4-8].

O ciprofloxacino está incluído na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde. Esse antimicrobiano pertence à classe das fluoroquinolonas e, desde 1987, é frequentemente usado para tratar diversas infecções bacterianas [9]. Para ITUs complicadas, incluindo pielonefrite, a terapia com ciprofloxacino é uma das principais opções contra bactérias Gram-negativas multidroga resistentes (BGN-MDR) por apresentarem elevadas concentrações no trato urinário [10]. As quinolonas estruturalmente são semelhantes, porém elas variam consideravelmente em polaridade. As manipulações do pH urinário alteram a porcentagem desse antibiótico com íon dipolar, fazendo sua atividade aumentar ou diminuir [11].

Para que exista eficácia terapêutica nas ITUs, o pH urinário deve ser considerado como um fator de relevância. Na urina ácida, o pH pode variar de 4,5 a 6,0 e alcalina de 6,5 a 8,0 [12] assim o pH do fluido onde as bactérias estão presentes durante o processo infeccioso pode variar, assumindo característica ácida ou básica [5,13].

O pH urinário não afeta apenas o crescimento do uropatógeno, mas também a atividade dos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das ITUs [14,15]. Dependendo do antimicrobiano, se o pH urinário não for monitorado, a atividade antimicrobiana pode diminuir, predispondo ao desenvolvimento de resistência [12].

Poucos estudos *in vitro* tem avaliado o impacto do pH sobre a ação dos antimicrobianos, mas estudos desta natureza são de extrema importância, pois podem direcionar os médicos na definição de tratamentos mais adequados para ITUs [11,13,15].

Diante do aumento de BGN-MDR causando ITUs, das dificuldades cada vez maiores no tratamento dessas infecções e da falta de dados na literatura que auxiliem no melhor recurso terapêutico para as ITUs, observamos a necessidade de estudos que verifiquem o impacto do pH na atividade dos antimicrobianos. Sabe-se que condições fisiológicas, como o pH, apresentam influência na sensibilidade dos microrganismos [16], porém, poucos estudos atuais relacionam a influência do pH na atividade do ciprofloxacino contra bactérias Gram-negativas isoladas da urina.



Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a variação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do ciprofloxacino frente aos pHs 6,0, 7,0 e 8,0 para a otimização do pH do ambiente proporcionando um melhor alcance do resultado terapêutico a sua relação com o pH urinário das amostras que foram recuperadas de pacientes que estavam hospitalizados ou que foram atendidos em pronto atendimento ou ambulatórios do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras bacterianas

O estudo foi conduzido no Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) localizado na região noroeste do Paraná. No período de junho de 2018 a junho de 2019, foram selecionadas 106 isolados consecutivos de *E. coli* recuperadas de pacientes que estavam hospitalizados ou que foram atendidos em pronto atendimento ou ambulatórios do HURM. Posteriormente foram estocadas no Laboratório de Microbiologia Médica (LMM) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Brasil. Apenas um isolado por paciente foi incluído no estudo, sendo sempre o primeiro isolado. Os isolados bacterianos foram identificados e com perfil de sensibilidade aos agentes antibacterianos por meio do método automatizado Phoenix®-BD (Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, EUA). O presente estudo foi aprovado pelo COPEP (aprovado em 31/05/2017, PARECER nº: 2.093.342/ CAEE 63610816.0.0000.0104).

2.2 Agente antimicrobiano

O ciprofloxacino foi adquirido da LabCompany (Londrina, Paraná, Brasil). O antimicrobiano foi diluído em água para obter a solução na concentração 16 mg/L (primeira concentração), preparada sempre no dia do experimento.

2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM do ciprofloxacino foi realizada pelo método de ágar diluição como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)[17] utilizando pH 7,0 e ágar *Mueller-Hinton* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). As placas inoculadas foram incubadas em ar ambiente a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 20 h. O teste de sensibilidade ao ciprofloxacino foi realizado para cada isolado em pH 6,0; 7,0 e 8,0. O ajuste do pH do meio de cultura foi realizado com soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) depois de autoclavado. A CIM do agente antimicrobiano foi definida como a menor concentração que inibe completamente o crescimento do organismo em testes duplicados. As cepas padrão *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853 e *Escherichia coli* ATCC® 25922 foram utilizadas como controles. As concentrações de ciprofloxacino variaram de 0,03 a 16 mg/L. Os testes de sensibilidade foram executados em duplicata e a interpretação dos resultados de CIM baseada nos pontos de corte para *E. coli* estabelecidos pelo CLSI[17].

2.4 Busca de dados secundários

Os dados do pH urinário foram coletados a partir do exame parcial de urina (urina 1) dos pacientes [18]. Os pHs encontrados do exame parcial de urina variaram entre 5,5 a 8,0. Esses dados foram correlacionados com os valores das CIMs obtidas nos diferentes pHs testados e com as CIMs determinadas pelo método automatizado Phoenix®-BD (Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, USA). Dos 106 isolados foram recuperados os dados dos pHs de 90 amostras de urina, devido ao fato de que algumas amostras não foram prescritas o exame parcial de urina, somente a cultura.

3. RESULTADOS

3.1 Susceptibilidade *in vitro*

A Tabela 1 apresenta o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 106 isolados de *E. coli* na urina ao ciprofloxacino em diferentes valores de pH usando a metodologia de ágar diluição. Em pH 7,0 a CIM teve variação entre 0,03 a 16 mg/L, o ciprofloxacino foi altamente efetiva em 55% dos isolados, que foram sensíveis ao antimicrobiano testado. Na metodologia automatizada (Phoenix®-BD), culturas com meios no pH 7,0, 73% das amostras foram sensíveis ao ciprofloxacino (Tabela 2).



Tabela 1. Sensibilidade *in vitro* pelo método de ágar diluição em pH 6,0 7,0 e 8,0 para ciprofloxacino em 106 isolados clínicos de *E. coli* de infecções do trato urinário.

Microorganismo	Nº de isolados	pH do teste	Nº de isolados com as seguinte CIMs (mg/L):									% de isolados			
												CLSI			
			0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	S	I	R
<i>E. coli</i>	106	6,0	-	1	20	24	9	4	3	9	1	35	42	8	49
		7,0	5	10	33	10	6	2	6	2	5	27	55	6	40
		8,0	31	23	11	5	2	1	1	2	19	11	66	2	32

(CIM) Concentração Inibitória Mínima, (-) nenhum isolado, (S) sensível, (I) intermediária, (R) resistente; Critérios interpretativos do CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2020) (sensível, CIM de $\leq 0,25$ mg/L; intermediário, CIM de 0,5 mg/L; resistente, CIM de ≥ 1 mg/L).

Tabela 2. Sensibilidade *in vitro* para ciprofloxacino pelo método automatizado Phoenix®-BD de 90 isolados clínicos de *E. coli* comparado ao da urina de onde estes isolados foram recuperados.

Microorganismo	Nº de isolados	pH urinário	Nº de isolados com as seguintes CIMs (mg/L):					% de isolados		
								CLSI		
			0,124	0,25	0,5	1	2	S	I	R
<i>E. coli</i>	90*	5,0	-	2	-	-	4	33	-	67
		5,5	5	1	1	-	5	50	8	42
		6,0	4	-	-	-	20	17	-	83
		6,5	8	-	2	-	8	44	2	44
		7,0	18	1	1	1	5	73	4	23
		8,0	4	-	-	-	-	100	-	-

(CIM) Concentração Inibitória Mínima, (-) nenhum isolado, (S) sensível, (I) intermediária, (R) resistente. Critérios interpretativos do CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2020) (sensível, CIM de $\leq 0,25$ mg/L; intermediário, CIM de 0,5 mg/L; resistente, CIM de ≥ 1 mg/L).

* Alguns isolados não foram possíveis recuperar os dados do pH da urina 1, devido ao fato de não ter sido realizado o exame.

3.2 Efeito do pH na CIM

3.2.1 Metodologia ágar diluição

A atividade *in vitro* do ciprofloxacino em relação à alcalinização do meio de cultura de crescimento (Figura 2) quando testado em pH 6,0 observou-se um aumento de número de isolados resistentes, chegando à 48%, com a variação da CIM 0,06 a 16 mg/L. Em contraste, quando testado em pH 8,0 notou-se que 66% dos isolados mostraram-se sensíveis ao ciprofloxacino, com crescimento até a CIM 0,25 mg/L. Um total de 18 isolados que eram resistentes ao ciprofloxacino em pH 6,0 tornaram-se sensíveis quando testados em pH 8,0 (Tabela 1).

3.2.2 Metodologia automatizada Phoenix®-BD

É possível observar na Figura 1, que os isolados do pH urinário 8,0 todas as amostras de sensibilidade frente ao ciprofloxacino, enquanto que no pH urinário 6,0, 83% dos isolados mostraram resistência em relação ao ciprofloxacino.

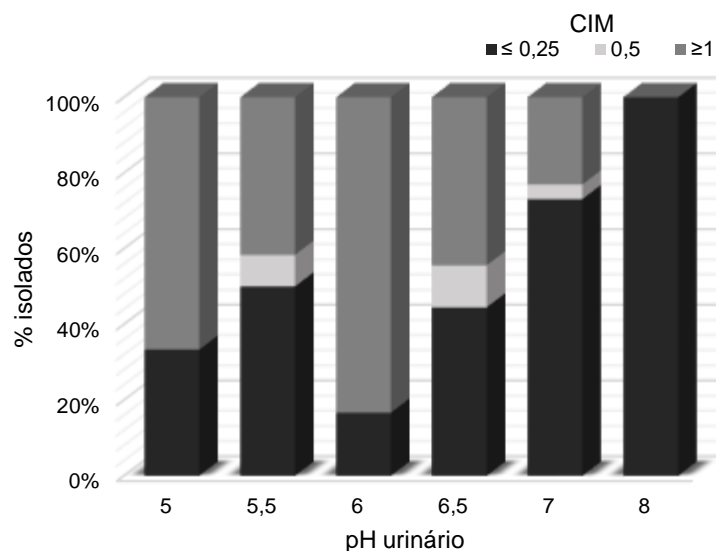


Figura 1. Correlação dos pHs urinário encontrados do exame parcial de urina com os valores das CIMs obtidas pelo método automatizado nos diferentes pHs testados pela % dos isolados de *E. coli*. Sensível, CIM de $\leq 0,25$ mg/L; intermediário, CIM de 0,5 mg/L; resistente, CIM de ≥ 1 mg/L).

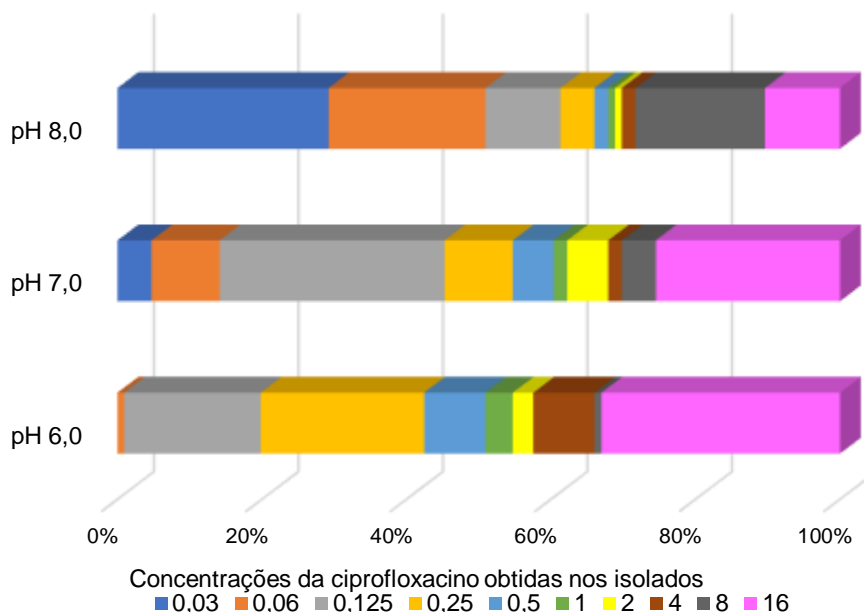


Figura 2. Correlação dos pHs 6,0, 7,0 e 8,0 com os valores das CIMs obtidas pelo método de ágar diluição nos diferentes pHs testados pela % dos isolados de *E. coli*. Sensível, CIM de $\leq 0,25$ mg/L; intermediário, CIM de 0,5 mg/L; resistente, CIM de ≥ 1 mg/L).

4. DISCUSSÃO

As fluoroquinolonas com um grupo piperazina, como o ciprofloxacino, apresentam uma diminuição progressiva da atividade quando o pH é reduzido [19], semelhante aos achados do presente estudo, onde o ciprofloxacino teve maior eficácia em 70 das 109 amostras, quando testada em pH alcalino (Figura 2). Os autores Smith e Ratcliffe [20] sugerem que em pHs altos as fluoroquinolonas tendem a ter carga negativa e os medicamentos que contêm a piperazina carregadas negativamente, incluindo o ciprofloxacino, teriam um maior efeito. Em contraste, com pHs mais baixos, as fluoroquinolonas contendo piperazina tem carga positiva, e esse fator tende a diminuir sua penetração nas bactérias e, assim conseqüentemente, diminui também sua atividade [19], sendo possível observar na figura 2 do presente estudo, em que quando o antimicrobiano testado em pH 6,0, teve um aumento



da CIM do qual 52 isolados do total de amostras testadas, apresentaram resistência com CIMs que variaram entre 1 a 16 mg/L. É possível observar também esse mesmo efeito no pH do parcial de urina 1 das amostras, onde em pHs mais ácidos teve aumento das CIMs.

Alguns achados indicam que fatores de pH e a concentração de cátions divalentes podem afetar as atividades da droga [19,21]. Um estudo relatou [22] que o efeito do pH na atividade das fluoroquinolonas contra *E. coli* depende da natureza dos compostos presentes na quinolona, reforçando positivamente os resultados do presente estudo, já que os pHs interferiram consideravelmente na atividade do ciprofloxacino, principalmente em pH alcalino, onde apresentou maior eficácia.

Quando comparado o resultado do pH urinário e o resultado das CIMs realizadas no aparelho automatizado Phoenix®-BD, os pHs urinários ácidos aumentou as CIMs em relação aos alcalinos. Considerando que os testes de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados em rotinas laboratoriais são realizados pH neutro, conforme padronizado, podemos considerar que embora alguns isolados se apresentem como sensíveis *in vitro* podem não apresentar o mesmo comportamento *in vivo* principalmente para antimicrobianos como as quinolonas que sofrem importante efeito do pH sobre sua atividade. Se as urinas dos pacientes apresentarem pH ácido o tratamento à base de ciprofloxacino pode não ser eficaz uma vez que em pHs mais baixos sua atividade é diminuída.

O presente estudo testou e demonstrou uma importante influência do pH sobre a atividade do ciprofloxacino o que alerta para que este fato seja considerado no momento da terapêutica. Uma maneira simples é conhecer pH facilmente medido na rotina laboratorial e que seria de grande valia, para a escolha do antimicrobiano, bem como o uso de substâncias possam ser administradas concomitantemente ao antimicrobianos favorecendo ao sucesso terapêutico das ITUs.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo, é possível observar que a urina e, em particular, o seu pH influenciam na atividade do ciprofloxacino, dando ênfase ao pH ácido que é comumente encontrado no trato urinário e que pode diminuir sua atividade. Sugerimos que os guias possam se adequar, para que testes de sensibilidade sejam realizados levando em consideração o pH urinário, auxiliando os médicos no momento da adequação terapêutica.

FINANCIADORES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

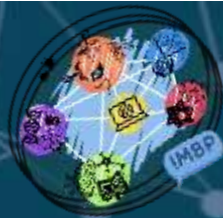
- [1] McLellan LK, Hunstad DA. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends Mol Med*. 2016; 22(11):946-957.
- [2] Zare F, Rostami FM, Shahsafi M. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from urinary tract infections in patients referring to Neka Laboratories-Iran. *Int J BioMed Public Health*. 2018; 1(1):30-36.
- [3] Gurevich E, Tchernin, D, Schreyber R, Muller R, Leibovitz E. Follow-up after infants younger than 2 months of age with urinary tract infection in southern Israel: epidemiologic, microbiologic and disease recurrence characteristics. *Braz J Infect Dis*. 2016; 20:19-25.
- [4] Campos ACC, Andrade NL, Ferdous M, Santos CC, Correia JCD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples of Hospitalized Patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Front Microbiol*. 2018 Feb; 16(9):243.
- [5] Wagenlehner FME, Naber KG. Treatment of bacterial urinary tract infections: presence and future. *Eur Urol*. 2006 Feb;49(2):235-44.
- [6] Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010 Aug; 300(6):371-9.
- [7] Cuba GT, Pignatari ACC, Patekoski KS, Luchesi LJ, Kiffer CRV. Pharmacodynamic profiling of commonly prescribed antimicrobial drugs against *Escherichia coli* isolates from urinary tract. *Braz J Infect Dis* 2014. Apr; 8(5):512–517.
- [8] Garoff L, Huseby DL, Praski AL, Hughes D. Effect of aminoacyl-tRNA synthetase mutations on susceptibility to ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Sep 15.
- [9] Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *J Med Microbiol* 2019; 68:1–10.



VII XI

**International Meeting of
Biosciences and Physiopathology**
**Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia**

- [10] Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014; 53:1565-1574.
- [11] Bel FD, Dewulf J, Witte BD, Langenhove HV, Janssen C. Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products. *Chemosphere*. 2009; 77:291–295.
- [12] Cunha BA. An infectious disease and pharmacokinetic perspective on oral antibiotic treatment of uncomplicated urinary tract infections due to multidrug-resistant Gram-negative uropathogens: the importance of urinary antibiotic concentrations and urinary pH. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Feb;35:521–526.
- [13] Fedrigo NH, Mazucheli J, Albiero J, Shinohara, DR, Lodi FG, Machado ACS, Sy SKB, Tognim MCB. Pharmacodynamic evaluation of fosfomycin against *E. coli* and *Klebsiella* spp. from urinary tract infections and the influence of pH on fosfomycin activities. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:AAC.02498-16.
- [14] Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(9):2069-89.
- [15] Yang L, Whag K, Li H, Denstedt JD, Cadieux PA. The influence of urinary pH on antibiotic efficacy against bacterial uropathogens. *Urology*. 2014;84:713. WI-713.e7.
- [16] Begic S, Worobec EA. Regulation of *Serratia marcescens* ompF and ompC porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. *Microbiology*. 2006; 152:485–491.
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100; 30th informational supplement. Wayne,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [18] Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15268: Laboratório clínico -Requisitos e recomendações para o exame de urina. ABNT. Brasil, 2005.
- [19] Kamberi M, Tsutsumi K,1 Kotegawa T, 1 Koichi Kawano,2 Koichi Nakamura,1 Yoshihito Niki,3 And Shigeyuki Nakano1 Influences of Urinary pH on Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Humans and Antimicrobial Activity In Vitro versus Those of Sparfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, Mar. 1999, 43(3):525–529.
- [20] Smith, J. T., and N. T. Ratcliffe. Effects of pH and magnesium on the activity of 4-quinolone antibacterials. *Infection*, 1986. 14(Suppl. 1):31–35.
- [21] Perez-Giraldo C, Hurtado C, Moran FJ, Blanco MT, Gomez- Garcia AC. The influence of magnesium on ofloxacin activity against different growth phases of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother*. 1990. 22:1021–1022.
- [22] Aagaard, J., T. Gasser, P. Rhodes, and P. O. Madsen. 1991. MICs of ciprofloxacin and trimethoprim for *Escherichia coli*: influence of pH, inoculum size and various body fluids. *Infection* 3(Suppl.):S167–S169.



UMA NOVA PROPOSTA: MULTIPLEX – PCR PARA DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus pseudointermedius*; genes *mecA* e PVL

Monica de Souza Ferreira de Mattos¹; Franciele Viana Fabri²; Paulo Victor Batista Marini¹; Nayara Helisandra Fedrigo²; Ana Paula Uber⁴; Silvia Maria dos Santos Saalfeld³; Bruno Buranello Costa⁴; Aline Natália de Santi¹; Sheila Alexandra Belini Nishiyama⁵; Maria Cristina Bronharo Tognim⁵

¹Acadêmico(a) de Pós-graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

²Acadêmico(a) de Pós-graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

³Acadêmico(a) de Pós-graduação (Doutorado), Programa em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

⁴Farmacêutico Bioquímico, Hospital Universitário de Maringá, PR, Brasil

⁵Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil

e-mail: monicamattosf@gmail.com.

Palavras chaves: *S. aureus*; *S. pseudointermedius*; Multiplex-PCR

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus e *S. pseudointermedius* são estafilococos coagulase positivas (ECP) colonizadores da mucosa nasal de humanos e de animais domésticos, como os cães [1]. Todavia, esses microrganismos também são considerados patógenos oportunistas, associados como *S. aureus* às infecções de pele e pneumonias e o *S. pseudointermedius* com pioderma canino e infecções em humanos [2-3].

Essas espécies podem carrear o gene *mecA* de resistência à meticilina (oxacilina no Brasil) responsável pela expressão de uma proteína ligante de penicilina alterada (do inglês, *penicillin-binding protein* - PBP2a) e o gene de virulência da leucocidina de *Panton-Valentine* (PVL) que codifica uma toxina que causa lise celular e necrose tecidual, responsável por infecções mais severas, associada principalmente a isolados da comunidade, mas já observada em isolados hospitalares [4-5].

A diferenciação dessas duas espécies de ECP apenas pelas características fenotípicas é complexa, pois não há marcadores bioquímicos específicos que possibilitem a determinação das espécies. Apesar dessa dificuldade, os métodos fenotípicos para identificação e determinação do perfil de resistência aos antibacterianos ainda têm sido os mais empregados na rotina laboratorial [7-8]. Todavia, os métodos moleculares vêm ganhando espaço nesse ambiente, devido sua rapidez e maior sensibilidade, que é explicada pela possibilidade de detecção simultânea de espécies e genes de resistência e virulência [9-10].

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo apresentar um novo método de *Multiplex-PCR* (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) capaz de diferenciar as espécies *S. aureus* e *S. pseudointermedius* e detectar os genes *mecA* e codificador de PVL de amostras coletadas de humanos e cães, provenientes do ambiente hospitalar e da comunidade.

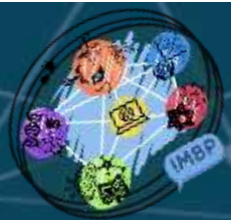
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Etapa I – Seleção dos primers e controles positivos

Foram selecionados pares de primers espécie-específicos, baseados na sequência do gene 16SrDNA para *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, além dos primers selecionados para a detecção dos genes *mecA* e para codificação da PVL. Os controles positivos utilizando cepas de referência e isolados clínicos também foram selecionados nessa etapa, como demonstrado na Figura 1.

2.2. Etapa II – Padronização da Multiplex-PCR com os primers selecionados

Nessa etapa os pares de primers selecionados foram analisados quanto ao número de pares de bases, as possíveis temperaturas de *melting* e o tamanho do *amplicon* (Figura 1). A partir dessas informações foram testadas diferentes condições de ciclagens, com variações na temperatura de



melting e no número de ciclos. Um novo par de *primers* foi testado para a detecção do gene *mecA* na *Multiplex-PCR*.

Na padronização da *Multiplex-PCR* foi utilizada uma alíquota de 2 µL de DNA adicionado a 23 µL de uma solução mãe de PCR, contendo os *primers* descritos na Figura 1, além de 10mM de dNTP, 0,3 µL de 5U/µL Taq DNA polimerase (Invitrogen Inc., California, EUA), 50mM de MgCl₂ 10x de tampão. Foram testadas as seguintes condições de ciclagem: 94° C (05 min), 94° C (45 seg), diferentes temperaturas de *melting* 52°C, 54°C e 56°C (45 seg), 72°C (1 min) por 30 e 35 ciclos, 72°C por 10 min, realizadas em termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, California, EUA). Após a amplificação, o produto da *Multiplex-PCR* foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100V por 50 minutos, em solução tampão TBE 0,5X, corado com brometo de etídio. O produto foi revelado com transluminador UV e fotografado em um fotodocumentador (LOCCUS Biotechnology®, Brasil) para ser analisado e interpretado.

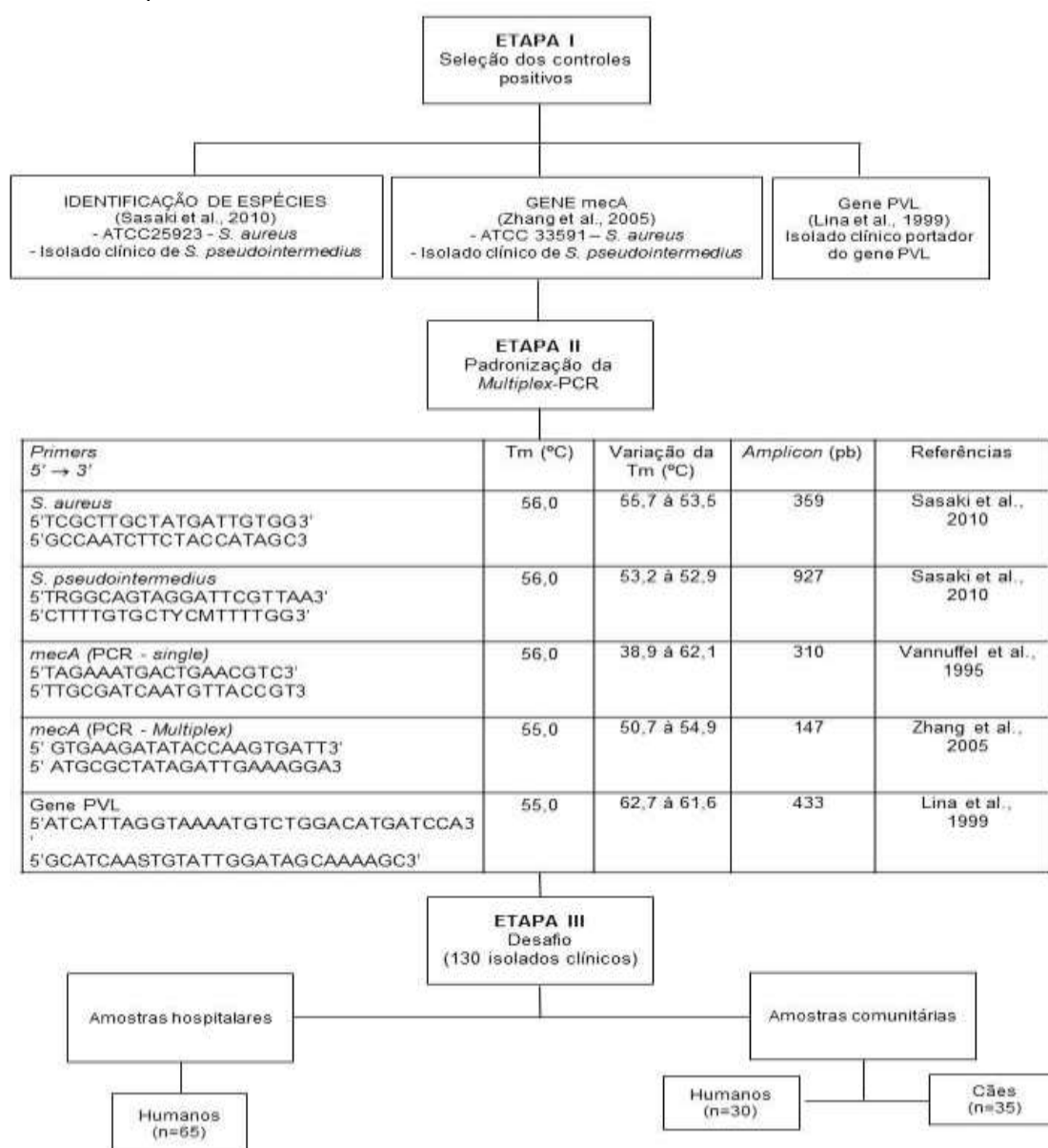


Figura 1. Etapas de padronização *Multiplex-PCR*.

2.3. Etapa III - Desafio com amostras clínicas

Foram selecionadas 130 amostras recuperadas do banco do Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (LMM/UEM), da qual 65 eram hospitalares isoladas de hemoculturas positivas para *S. aureus*, identificadas e com perfil de sensibilidade aos agentes



antibacterianos determinado previamente pelo método automatizado BD Phoenix® (Becton and Dickinson, Sparks, EUA), no período de fevereiro de 2015 a abril de 2019. Também foram recuperadas 65 amostras comunitárias caracterizadas fenotipicamente como ECP e seu perfil de sensibilidade a antibacterianos determinado pelos testes de Kirby-Bauer (disco-difusão) e ágar diluição, de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2015). Todas as 130 amostras foram submetidas a reações moleculares de PCR para identificação das espécies de ECP [12], do gene *mecA* [13] e do gene codificador de PVL [14], para posterior confirmação na reação de *Multiplex-PCR* padronizada na etapa anterior. O DNA das amostras foi extraído pelo método de CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*), de acordo com metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987).

O projeto foi aprovado no comitê de ética animal e biossegurança da Universidade Estadual de Maringá - UEM (COPEP – 075/2011) e comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UEM (CAAE 318.0.093.000-11/COPEP).

3. RESULTADOS

Na etapa I, os *primers* selecionados para a padronização da *Multiplex-PCR* foram capazes de detectar as espécies *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, assim como os genes *mecA* e codificador de PVL nas cepas de referências e nos isolados clínicos utilizados como controles positivos. Já na etapa II, foram testadas diferentes condições de ciclagens. Inicialmente, a reação foi padronizada com temperatura de *melting* de 56°C, uma média da temperatura dos *primers* selecionados. Entretanto, as amostras positivas para o gene *mecA* não amplificaram na *Multiplex-PCR*, sendo na sequência testadas as temperaturas de 52°C e 54°C, sendo alterado o *primer* de *mecA* de 310 pares de bases (pb) selecionado na etapa I, para o de 147 pb. Durante as tentativas de padronização da temperatura de *melting*, o número de ciclos de 30 também foi alterado para 35. Dessa forma, a reação foi padronizada nas seguintes condições de ciclagem: ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e um final de 72°C por 10 minutos, sendo que as quantidades e concentrações dos reagentes não foram modificadas.

Já na etapa III, quando comparado os resultados da *Multiplex-PCR* com as *PCRs singles* para diferenciação das espécies e determinação dos genes *mecA* e codificador de PVL (etapa I), as metodologias apresentaram os mesmos resultados, ou seja, capacidade idêntica de identificação (Figura 2). Das 65 (100%) amostras hospitalares já previamente identificadas como *S. aureus* pelo sistema automatizado BD Phoenix®, todas foram confirmadas como *S. aureus*, sendo que 20 (30,7%) apresentavam o gene *mecA* e 3 (4,6%) o gene codificador para PVL. Já das 65 (100%) amostras comunitárias, todas foram identificadas como *S. aureus*, tanto as amostras coletadas de humanos como às de cães. Sendo que do grupo de humanos 2 (6,6%) possuíam o gene *mecA* e 1 (3,3%) o gene PVL, enquanto nos cães 3 (8,5%) possuíam o gene *mecA* e nenhuma amostra apresentou o gene codificador para PVL, como pode-se observar na Figura 2.

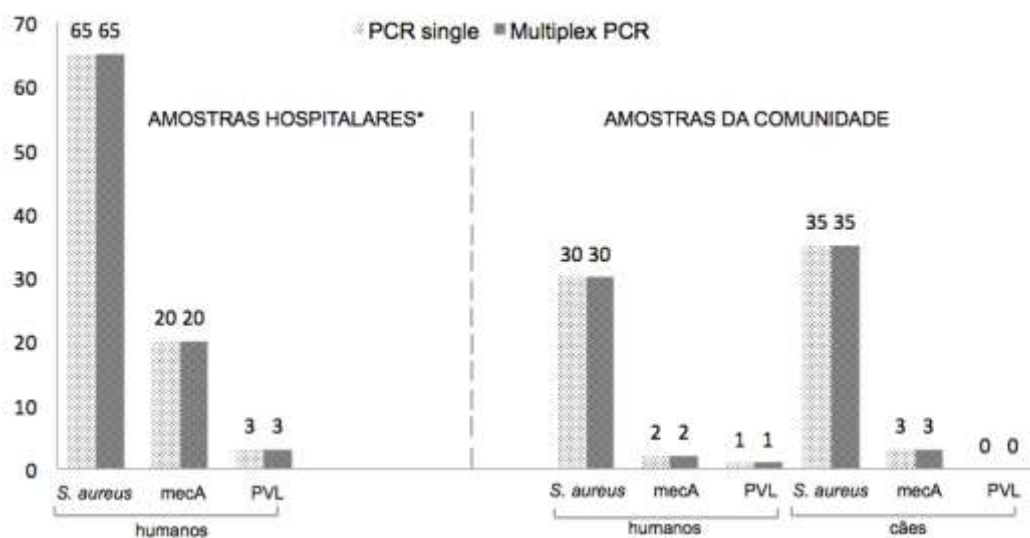


Figura 2. Detecção comparativa entre PCR *single* e a *Multiplex-PCR* proposta. *Amostras hospitalares já haviam sido previamente identificadas como *S. aureus* e determinado o perfil de sensibilidade dos isolados, através do método automatizado BD Phoenix® (Becton and Dickinson).



Todavia, quatro (20%) amostras clínicas hospitalares positivas para o gene *mecA* e duas amostras (66%) da comunidade haviam sido previamente caracterizadas nos testes de sensibilidade, como sensíveis à metilicina.

4. DISCUSSÃO

As duas espécies de ECPs analisadas nesse trabalho, *S. aureus* e *S. pseudointermedius*, podem atuar como patógenos oportunistas no ambiente hospitalar e na comunidade [17]. Embora a espécie *S. aureus* seja mais associada a humanos e *S. pseudointermedius* encontrado principalmente em cães, a interação frequente entre humanos e seus animais de estimação, tem possibilitado a detecção de *S. aureus* em infecções de cães e *S. pseudointermedius* em humanos. Recentemente, essa disseminação das espécies foi relatada em um trabalho realizado por nosso grupo [18], onde foram detectados isolados de um mesmo *cluster* (similaridade genética $\geq 80\%$) de amostras de humanos e cães, provenientes do ambiente hospitalar e da comunidade. Esses microrganismos podem ainda carrear e disseminar importantes genes de virulência e resistência a antibacterianos, tornando-os importantes fontes de disseminação desses genes, entre isolados de humanos para animais, ou vice-versa.

Devido a limitações dos métodos fenotípicos na diferenciação dos ECPs e a importância na determinação de genes de virulência e do perfil de sensibilidade desses isolados, a detecção molecular pode ser uma alternativa adequada para o diagnóstico de infecções causadas por ECPs. Entretanto, as reações *singles* de PCR para diferenciação das espécies e determinação dos genes *mecA* e codificador de PVL torna o processo mais trabalhoso e demorado. As reações tipo *Multiplex* possibilitam a detecção simultânea de vários genes, desde que seja possível a utilização de diversos *primers* e diferenciação dos *amplicons* em uma única reação, nas mesmas condições de ciclagem.

A *Multiplex-PCR* padronizada nesse trabalho demonstrou ser capaz de diferenciar os isolados de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* apresentando resultados com similaridade de 100% com a identificação pelo sistema automatizado das amostras hospitalares analisadas e aos resultados obtidos em reações PCR *single* das demais amostras hospitalares e da comunidade. Foram testadas diferentes temperaturas de *melting* e um outro par de *primer* para detecção do gene *mecA*, tornando possível a diferenciação dos *amplicons* resultantes. Outros autores já padronizaram a *Multiplex-PCR* para diferenciação de ECPs e do gene *mecA*, mas não foi encontrado na literatura uma *Multiplex-PCR* que abrangesse todos os genes propostos, capaz de detectar simultaneamente a espécie *S. pseudointermedius*, muitas vezes identificado como *S. aureus* [9-10].

A reação de *Multiplex-PCR* pode auxiliar na diferenciação dessas espécies e reduzir, particularmente o subdiagnóstico de *S. pseudointermedius* em humanos, o que poderia induzir a erro no tratamento, pois ECPs apresentam diferentes pontos de corte de sensibilidade à oxacilina. Isolados sensíveis de *S. aureus* possuem uma concentração inibitória mínima (CIM) $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e isolados resistentes CIM $\geq 4 \mu\text{g/mL}$. Enquanto isolados sensíveis de *S. pseudointermedius* possuem CIM de $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ para isolados resistentes CIM de $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ [11].

Outro ponto a ser considerado é que as técnicas de sensibilidade aos antibacterianos podem falhar na detecção de isolados resistentes. O trabalho de Rathore et al. (2018) relata a discrepância entre os resultados dos testes fenotípicos e moleculares para detecção de isolados resistentes. Alguns trabalhos têm relatado nos últimos tempos a detecção de isolados sensíveis à metilicina nos testes de sensibilidade convencionais, mas carreadores do gene *mecA*, sendo denominados de OS-MRSA (do inglês, *oxacillin-susceptible* MRSA) [9,19-20]. Assim, sem a realização dos testes moleculares seria impossível a detecção dos OS-MRSA o que ocasionaria uma prescrição inadequada de antibacterianos. Salientamos, que em nossos resultados, das 25 amostras positivas para o gene *mecA*, seis delas haviam sido previamente caracterizadas como sensíveis à metilicina por métodos fenotípicos. Sugerindo a presença de OS-MRSA nessas amostras, porém novos testes de sensibilidade e moleculares devem ser realizados para melhor caracterização desses isolados.

Embora tenha sido encontrado somente isolado portador do gene codificador de PVL na comunidade, onde geralmente é mais encontrado, o mesmo foi identificado também em amostras hospitalares (4,6%). O que está de acordo com a literatura recente, que vem relatando a presença desse gene em isolados hospitalares, resultando em infecções nosocomiais mais severas e de difícil tratamento [4-5, 21-22].

Sendo assim, a reação *Multiplex-PCR* padronizada nesse trabalho mostrou-se promissora, permitindo a diferenciação dessas importantes espécies de ECPs, podendo ser um complemento benéfico para testes de sensibilidade e determinação da virulência de maneira oportuna e confiável.



5. CONCLUSÃO

A reação *Multiplex-PCR* proposta mostrou-se até agora ser uma ferramenta eficiente e segura para identificação e diferenciação de *S. aureus* e *S. pseudointermedius* dos demais estafilococos coagulase positivas, além de permitir a detecção simultânea dos genes *mecA* e codificador de PVL em amostras de humanos e animais, provenientes do ambiente hospitalar ou da comunidade.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- [1] Mousavi MNS, Mehramuz B, Sadeghi J, Alizadeh N, Oskouee MA, Kafil HS. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in autoimmune diseases. *Microb Pathog.* 2017; 111: 503-7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.028>.
- [2] Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4:18033. 10.1038/nrdp.2018.33.
- [3] Börjesson S, Gómez-Sanz E, Ekström K, Torres C, Grönlund U. *Staphylococcus pseudointermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34: 839-844. 10.1007/s10096-014-2300-y.
- [4] Zhang C, Guo Y, Chu X. In Vitro generation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) in clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its correlation with PVL variant, clonal complex, infection type. *Sci Rep.* 2018; 8:7696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26034-y>.
- [5] Singh-Moodley A, Strasheim W, Mogokotleng R, Ismail H, Perovic O. Unconventional SCCmec types and low prevalence of the Panton-Valentine Leukocidin exotoxin in South African blood culture *Staphylococcus aureus* surveillance isolates, 2013-2016. *PLoS one.* 2019; 14:11.
- [6] Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:2770-8. 10.1128/JCM.00360-07.
- [7] Santos MFSM, Fonseca MG. Estudo comparativo das técnicas de pcr e captura híbrida para o diagnóstico do hpv: revisão de literatura. *Revista Atualiza Saúde. Rev Eletrôn Atualiza Saúde.* 2016; 4: 59-65.
- [8] Haas DJ, Torres ACD. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. *Rev Científica de Medicina Veterinária.* 2016; 14:26.
- [9] Rathore K, Joseph B, Sharma DK, Gaurav A, Sharma, SK, et al. Evaluation of multiplex polymerase chain reaction as an alternative to conventional antibiotic sensitivity test. *Vet world.* 2018; 11: 474.
- [10] Velasco V, Sherwood JS, Rojas-García PP, Logue CM. Multiplex real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes from selective enrichments from animals and retail meat. *PLoS one.* 2014; 9:5.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Twelfth Edition, CLSI Document M02-A1. 2015.
- [12] Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:765-9. 10.1128/JCM.01232-09.
- [13] Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmée M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2864-7.
- [14] Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter M, Gauduchon V, et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin--Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:1128-1132. <https://doi.org/10.1086/313461>.
- [15] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 1987; 19:11-5.
- [16] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* type I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5026-5033. 10.1128/JCM.43.10.5026-5033.2005.
- [17] Zhang, C.; Guo, Y.; Chu, X. In Vitro generation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) in clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its correlation with PVL variant, clonal complex, infection type. *Sci. rep.* 2018; 8:7696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26034-y>.



- [18] Fabri FV, Pereira PM 1, Mattos MSF, Pinto NB, Moreira RRB, Nishiyama SAB, Tognim MCB. Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital isolates and humans isolates and community's pets. *Int J Infect Dis*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.3660>.
- [19] Song Y, Cui L, Lv Y, Li Y, Xue F. Characterisation of clinical isolates of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* in China from 2009 to 2014. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017; 11: 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.009>.
- [20] Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mec A-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol*. 2016; 16: 115. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0733-4>.
- [21] Monteiro ADS, Pinto BL, Monteiro JDM, Ferreira RM, Ribeiro P, Bando SY, et al. Phylogenetic and Molecular Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bloodstream Infections in Northeast Brazil. *Microorganisms*. 2019; 7: 210. 10.3390/microorganisms7070210.
- [22] Brito CSD, Queiroz LL, Campo PAD, Batistão DWDF, Silva HDA., Agostini GGD, et al. The nares as a CA-MRSA reservoir in the healthy elderly. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48: 614-6. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0030-2015>.



FLORICULTURA: UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM UM MUNICÍPIO NO NORTE-CENTRAL DO PARANÁ

Raul Gomes Aguera¹; Renata Sano Lini²; Jéssica Cristina Zoratto Romoli³; Camila da Silva Freires⁴, Luís Otavio de Oliveira⁵, Samuel Botião Nerilo⁶; Simone Aparecida Galerani Mossini⁷

¹Acadêmico (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Acadêmico (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Acadêmico (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁷Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

E-mail: raul1994_gomes@hotmail.com

Palavras-chave: Exposição Ocupacional; Cultivo de flores; Saúde do trabalhador.

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são produtos químicos capazes de controlar pragas e doenças em plantas, há relatos do seu uso há muito tempo, porém foi a partir da década de 1960 que essas substâncias passaram a integrar a rotina do trabalhador rural no Brasil [1]. Os impactos ambientais e socioeconômicos provocados pelos agrotóxicos são bem conhecidos, o seu uso de forma indiscriminada e inadequada é extremamente alarmante, a intensificação do uso tem implicado no aumento dos danos ao meio ambiente e sobretudo em problemas de saúde pública [2].

Dados do departamento de informática do SUS [3] informam que em 2019 houve 5.700 casos de intoxicação por agrotóxico de uso agrícola, desses, 2.465 (43,24%) casos representam exposição no ambiente de trabalho, ou seja, quase metade dos casos de intoxicação esteve relacionada com o contato ocupacional [4]. As intoxicações ocupacionais estão diretamente relacionadas à ausência na utilização ou uso inadequado dos equipamentos de proteção individual (EPI), à falta de cautela durante o manuseio e aplicação dos agrotóxicos e a carência de instrução dos trabalhadores sobre os riscos inerentes na utilização desses compostos [5].

A floricultura exige a utilização intensa de agrotóxicos, afim de garantir que as flores tenham um padrão de qualidade esperado para a comercialização, além disso, esse tipo de cultura não apresenta o mesmo rigor para o controle de resíduos como na produção de alimentos. Ao investigar a cultura de flores, os agrotóxicos mais utilizados para o controle de pragas e doenças nas plantas são os inseticidas e fungicidas. Para ambos os grupos, a grande preocupação está em função da quantidade e frequência da sua utilização [6].

A investigação laboratorial da exposição ocupacional é dificultada em função da multiplicidade dos compostos presentes nas formulações agrotóxicas, sendo disponível, para investigar quadros de intoxicação, os recursos humanos, as avaliações clínicas e laboratoriais, informações fornecidas pelos trabalhadores e apoio técnico [1, 2, 5, 13].

A escolha deste tema deve-se ao reconhecimento da fragilidade da saúde do trabalhador na cultura das flores, devido ao seu próprio sistema de produção. Além disso, os estudos são escassos na literatura sobre a investigação da saúde do trabalhador rural em relação a cultura da flor, desse modo, espera-se compreender as consequências do cultivo de flores na saúde dos trabalhadores. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a exposição da população aos agrotóxicos e investigar os impactos provocados sobre a saúde do trabalhador do município de Marialva-PR.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População do estudo

2.1.1 Grupo exposto aos agrotóxicos

O público alvo foi constituído por trabalhadores dos gêneros masculino e feminino, cadastrados para atendimento pelo Instituto Agrônomo de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Marialva-PR. Todos os trabalhadores foram convidados a participar deste trabalho, de acordo com as normas Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/2012) [7]. Aqueles que consentiram em participar foram entrevistados e submetidos à coleta de material biológico para quantificação de metais no plasma e na urina.

2.1.2 Grupo não exposto aos agrotóxicos

O grupo controle foi constituído por indivíduos não expostos aos agrotóxicos, doadores de sangue atendidos pelo Hemocentro de Maringá. Os indivíduos foram convidados a participar deste trabalho, de acordo com as normas Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/2012). As coletas foram realizadas durante o processo de doação de sangue. As amostras de urina foram coletadas pelo próprio voluntário por micção espontânea.

2.3. Coleta de amostras e análises laboratoriais

Foram obtidas amostras biológicas de sangue total em tubos de 6,0 mL heparinizados para coleta a vácuo da marca VACUETTE® por punção venosa na fossa cubital. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, onde foram processadas e posteriormente submetidas às análises. Quando necessário, as amostras foram submetidas a congelamento a -20 °C. A quantificação dos metais no plasma e urina foi executada na Universidade Federal do ABC Paulista (UFABC – Santo André-SP). O material coletado foi alíquotado em eppendorf's graduados livres de DNases/RNases de 2ml de capacidade, da marca GREINER BIO-ONE®, submetidos ao congelamento, posteriormente transportadas sob refrigeração até a UFABC – Santo André-SP.

Foram quantificados um total de 15 metais: Alumínio (Al), Cromo (Cr), Manganês (Mn), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Arsênio (As), Selênio (Se), Cadmio (Cd), Antimônio (Sb), Bário (Ba), Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb) e Urânio (U). As amostras foram homogeneizadas e diluídas a 1:10 em solução contendo ácido nítrico (HNO₃) a 0,5% v/v e Triton X-100 a 0,02% m/v. Para as soluções de calibração foi utilizada uma combinação de matriz (plasma e urina) em tubos cônicos de 15 mL da marca Falcon®. Para este fim, os analitos (variando de 1 a 200 ng/ml) foram adicionados em HNO₃ 0,5% v/v e Triton X-100 0,02% m/v contendo matriz 1:20. Houve a injeção das amostras no espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS Agilent 7900, Hachioji, Japão). O branco e materiais de referência foram analisados em cada lote de análise [8, 9]

O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (CAAE nº 96370018.0.0000.0104), sob o parecer nº 3.314.720.

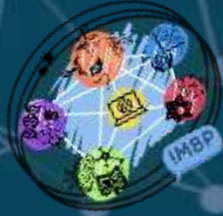
2.4. Análise estatística

Com os dados obtidos e sistematizados, foram realizadas as análises estatísticas, sendo utilizado o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, para verificação da distribuição dos dados, considerando intervalo de confiança de 95% e significância para o valor de $p \leq 0,05$. A comparação dos níveis plasmáticos e urinários dos metais dos trabalhadores expostos aos praguicidas com a população não exposta foi feita pelo teste de Mann Whitney, considerando intervalo de confiança de 95% e significância com valor de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Características sociodemográficos e dados população estudada

A população do estudo foi constituída por 109 participantes, 41 indivíduos expostos aos agrotóxicos e 68 indivíduos não expostos (grupo controle), sendo a maioria homens, 63,41% para o grupo exposto e 57,35% para o grupo controle. Com relação a idade dos participantes, os indivíduos expostos aos agrotóxicos apresentaram média de idade 46,9 anos ($\pm 12,33$) e os do grupo controle apresentaram média de 38,4 anos ($\pm 12,94$). Questionamentos sobre aspectos sociais foram realizados à população exposta, com relação a renda, 29,27% dos entrevistados relataram renda abaixo de R\$ 1.116, no que diz respeito aos anos de estudo, 34,14% da população apresenta apenas 8 anos de estudo.



Quanto ao tipo de exposição aos agrotóxicos ilustrados no Gráfico 1, 78,04% dos entrevistados, relataram contato de forma ocupacional, sendo que 36,59% estão expostos ocupacionalmente há mais de 9 anos. De acordo com as normas de segurança, o trabalhador envolvido com a aplicação e manejo de agrotóxicos deve fazer a utilização de EPI. O uso foi questionado, mostrando os seguintes resultados: 74,19% dos entrevistados fazia uso dos equipamentos de forma parcial, 6,45% de todos os EPI recomendados e 19,35% não utilizavam nenhum EPI

A população do estudo relatou o uso de 15 pesticidas, dispostos pelo nome químico no Gráfico 1, dentre estes, 53,33% são fungicidas, 40,00% são inseticidas e 6,66% são acaricidas.

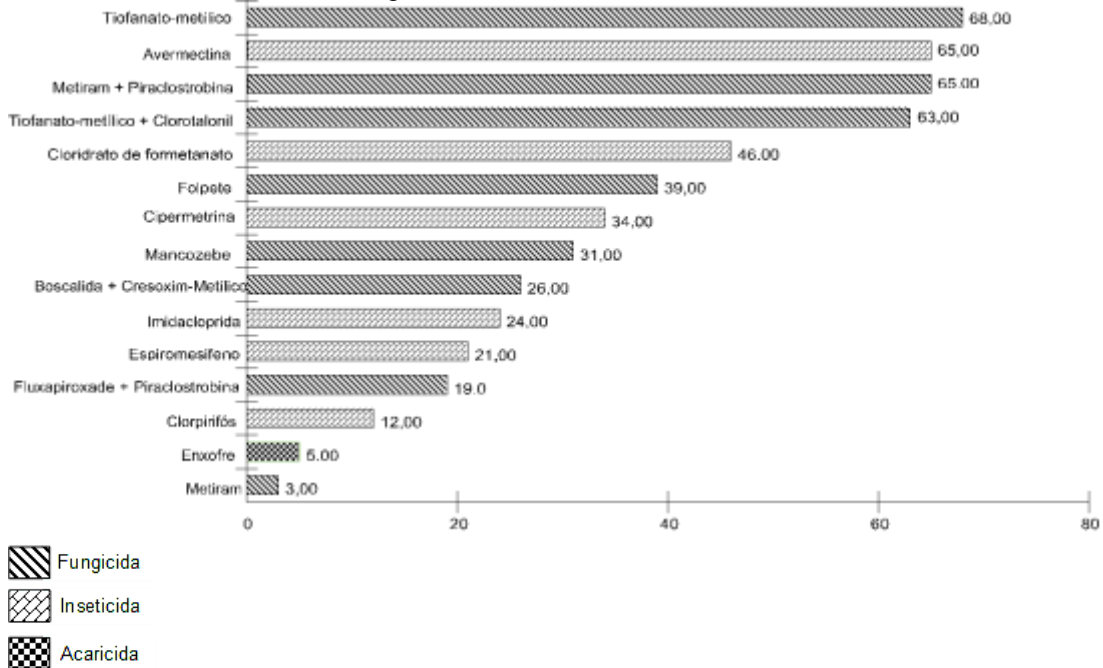


Gráfico 1. Porcentual de agrotóxicos utilizados nas propriedades pelos floricultores - Marialva - PR, 2019.

3.2 Relação de sintomas da população estudada

Na figura 1 esquematizamos os sintomas clínicos relatados pelos floricultores, os dados mostram um predomínio de sintomas (60,40%) envolvendo o sistema nervoso. Dos 41 participantes expostos aos agrotóxicos, destacamos aqui alguns dos sintomas mais expressivos, 56,09% - irritabilidade, 39,02% - diminuição da memória, 39,02% - alteração de humor, 31,70% - dificuldade de concentração, 29,26% - cefaleia e 24,39% - tontura.

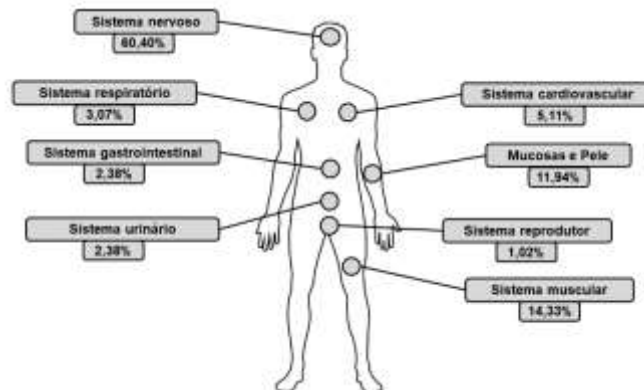


Figura 1. Sintomas clínicos relatados pela população de floricultores. Marialva-PR, 2019.

3.3 Análises laboratoriais

Com relação a quantificação dos níveis plasmáticos e urinários dos metais, destacamos dois metais (manganês e zinco), presentes nos fungicidas: Metiram + Piraclostrobina e Mancozebe, que juntos apresentam maior incidência de uso (gráfico 1). Foi realizada a comparação dos valores obtidos



para a população exposta ocupacionalmente e grupo controle, os resultados foram separados por gênero e estão dispostos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Média geométrica dos níveis plasmáticos de metais da população exposta e grupo controle.

Metal analisado	Grupo Exposto		Grupo controle		p-valor
	MG ¹	95% IC MG ²	MG ¹	95% IC MG ²	
Manganês					
Homens	2,247	[1,687 - 2,992]	1,073	[0,895 - 1,287]	<0,0001*
Mulheres	1,139	[0,890 - 1,457]	0,995	[0,822 - 1,205]	0,258
Zinco					
Homens	875,874	[838,177 - 915,266]	873,135	[832,071 - 916,225]	0,7955
Mulheres	752,219	[702,392 - 805,579]	790,796	[756,305 - 826,859]	0,258

Os níveis plasmáticos foram representados em µg/L. ¹Media geométrica. ²Intervalo de confiança de 95%. *Estatisticamente diferente de acordo com o teste U de Mann-Whitney, quando comparado ao gênero, assumindo p <0,05.

Tabela 2. Média geométrica dos níveis urinários de metais da população exposta e grupo controle.

Metal analisado	Grupo Exposto		Grupo controle		p-valor
	MG	95% IC MG	MG	95% IC MG	
Manganês					
Homens	1,041	[0,722 - 1,500]	0,245	[0,155 - 0,388]	<0,0001*
Mulheres	3,214	[1,579 - 6,539]	0,197	[0,099, 0,389]	<0,0001
Zinco					
Homens	397,240	[320,904 - 491,734]	362,880	[299,979 - 438,970]	0,7479
Mulheres	268,975	[158,382 - 456,790]	343,236	[273,227 - 431,182]	0,1694

Os níveis urinários foram representados em µg/g de creatinina. ¹Media geométrica. ²Intervalo de confiança de 95%. *Estatisticamente diferente de acordo com o teste U de Mann-Whitney, quando comparado ao gênero, assumindo p <0,05.

4. DISCUSSÃO

Existem inúmeros estudos apontando evidências sobre a exposição ocupacional aos agrotóxicos e ao desenvolvimento de patologias, tais como, distúrbios neurológicos, respiratórios, reprodutivos, neoplasias, entre outras [10, 11]. O estudo de uma população de floristas exposta ocupacionalmente aos agrotóxicos, evidenciou que a maioria dos trabalhadores está há mais de 9 anos em contato com os agrotóxicos no plantio de flores (36,59%), evidenciando exposição crônica aos agrotóxicos. Grande parte dos floricultores utiliza os EPI de forma incompleta (74,09%), aumentando o risco de intoxicação. Esse resultado corrobora com um estudo realizado na Grécia, que revelou trabalhadores que utilizavam os equipamentos de proteção de forma inadequada, apresentavam níveis de pesticidas inúmeras vezes mais elevados, quando comparado aos que utilizavam os de forma correta [18]. Ainda destacamos o uso de agrotóxicos (Gráfico 1) de classes variadas, resultados que corroboram com estudos, evidenciando que os trabalhadores de forma geral estão se expondo a risco de intoxicação [16, 17].

Na população de estudo, foi observado a manifestação de sintomas clínicos que podem estar relacionados com quadros de intoxicação por agrotóxicos. Estudos que investigaram populações em constante contato com agrotóxicos, mostram também a presença de sintomas clínicos respiratórios [12, 13].

O manganês é um metal essencial para organismo humano [14], porém em quantidades elevadas pode ser responsável por inúmeras patologias descritas na literatura, merecendo destaque o Parkinsonismo, diminuição da capacidade motora, entre outras patologias neurológicas [14, 16], colaborando com os resultados obtidos no estudo, evidenciado por uma grande parcela dos sintomas relatados pelos trabalhadores estar ligado ao sistema nervoso.



A média geométrica obtida dos níveis plasmáticos e urinários de manganês e zinco nas amostras, mostrou que os indivíduos expostos apresentaram valores superiores de manganês no plasma e urina quando comparados ao grupo não exposto. Os níveis plasmáticos obtidos na população de homens expostos foram aproximadamente duas vezes maiores que os do grupo controle, os níveis urinários mostraram que os homens expostos tinham aproximadamente 4 vezes mais manganês quando comparado ao grupo controle. Outros autores, também avaliando a exposição à agrotóxicos, mediram os níveis plasmáticos e urinários de metais potencialmente tóxicos e encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo [16, 17]. Os dados foram submetidos a comparação estatística pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, mostrando diferença significativa ($p < 0,05$) para o manganês plasmático nos homens e para o manganês urinário nos homens e mulheres.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que os floricultores da região de Marialva-PR estão expostos de forma crônica aos agrotóxicos, podendo apresentar relação com os sintomas clínicos relatados pelos trabalhadores. A quantificação dos níveis plasmáticos e urinários dos metais presentes nos agrotóxicos pode auxiliar no monitoramento biológico do trabalhador, juntamente com o acompanhamento clínico, orientação técnica sobre o uso dos EPI, colaborando para prevenção e proteção dos floricultores à intoxicações futuras.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001).

AGRADECIMENTOS

Ao LaTox/UEM e ao EMATER – Marialva, Pr.

REFERÊNCIAS

- [1] Londres F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011;1.
- [2] Garcia-Garcia CR, Parron T, Requena M, Alarcon R, Tsatsakis AM, Hernandez AF. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sciences*. 2016 Jan; 145(1):274-83.
- [3] Mandic-Rajcevic S, Rubino FM, Vianello G, Fugnoli L, Polledri E, Mercadante R, et al. Dermal exposure and risk assessment of tebuconazole applicators in vineyards. *Med Lav*. 2015 Jul ; 106(4):294-315.
- [4] Silverio ACP, Machado SC, Azevedo L, Nogueira DA, de Castro Graciano MM, Simoes JS, et al. Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas Gerais, Brazil. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017 Aug; 55:99-106.
- [5] Brasil. Ministério Da Saúde. Departamento de informática do SUS. Tabnet Datasus. 2019. [Internet] [Acesso em: 2020 ago 05]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/Intoxbr.def>.
- [6] Rodrigues AP, de Mendonça Júnior AF, de Mesquita HC. Uso de agrotóxicos na floricultura. *AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO*. 2011; 6(4).
- [7] Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. [Internet] [Acesso em: 2019 jun 28]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html.
- [8] Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JA, de Oliveira Souza VC, Barbosa Jr F. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Analytica Chimica Acta*. 2009 Apr; 639(1-2):13-8.



- [9] Batista BL, Rodrigues JL, Tormen L, Curtius AJ, Barbosa Jr F. Reference concentrations for trace elements in urine for the Brazilian population based on q-ICP-MS with a simple dilute-and-shoot procedure. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009 Jul; 20(8):1406-13.
- [10] Brouwer M, Koeman T, Van Den Brandt PA, Kromhout H, Schouten LJ, Peters S, et al. Occupational exposures and Parkinson's disease mortality in a prospective Dutch cohort. *Occup Environ Med*. 2015 Jun; 72(6):448-55.
- [11] Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*. 2011 Jun 26 Suppl 1:S1-58.
- [12] Bayhan I, Yeşilnacar Mi, Akgün M, Arbak P. Respiratory symptoms and pulmonary functions before and after pesticide application in cotton farming. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2018 Jun; 25(4):701-7.
- [13] Raherison C, Baldi I, Pouquet M, Berteaud E, Moesch C, Bouvier G, et al. Pesticides Exposure by Air in Vineyard Rural Area and Respiratory Health in Children: A pilot study. *Environ Res*. 2019 Feb; 169:189-95.
- [14] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for manganese. US Department of Health and Human Services Public Service, Atlanta. 2012.
- [15] García-García CR, Parrón T, Requena M, Alarcón R, Tsatsakis AM, Hernández AF. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sci*. 2016 Jan; 145:274-83.
- [16] Jayasumana C, Gunatilake S, Siribaddana S. Simultaneous exposure to multiple heavy metals and glyphosate may contribute to Sri Lankan agricultural nephropathy. *BMC nephrology*. 2015 Jul;16(1):103.
- [17] Rocha GHO, Lini RS, Barbosa F, Batista BL, de Oliveira Souza VC, Nerilo SB, et al. Exposure to heavy metals due to pesticide use by vineyard farmers. *International archives of occupational and environmental health*. 2015 Dec; 88(7):875-80.
- [18] Tsakirakis AN, Kasiotis KM, Charistou AN, Arapaki N, Tsatsakis A, Tsakalof A, et al. Dermal & inhalation exposure of operators during fungicide application in vineyards. Evaluation of coverall performance. *Sci Total Environ*. 2014 Out; 470-471:282-9.



*Estudos em
cardiopatologia*



RESTRIÇÃO PROTEICA NA ADOLESCÊNCIA E A SUA IMPLICAÇÃO NAS DISFUNÇÕES DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMICO NA HIPERTENSÃO A LONGO PRAZO

Anna Rebeka Oliveira Ferreira; Maria Natália Chimirri Peres; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro; Silvano Piovan; Keilah Valéria Naves Cavalcante; Marcos Divino Ferreira Junior; Rodrigo Mello Gomes; James Andrew Armitage; Kesia Palma Rigo.

^{1,3}Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, GO

⁶Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, GO

⁷Docente, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, GO

⁸Docente, School of Medicine, Deakin University - 3216 Waurm Ponds/VIC, Australia

⁹Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁹Docente, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba, PR
e-mail: anna.rebeka108@gmail.com

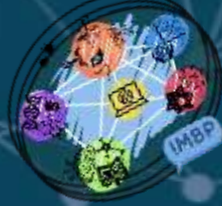
Palavras-chave: dieta com restrição de proteínas; hipertensão; sistema nervoso autônomo.

1. INTRODUÇÃO

O conjunto de desordens incluindo obesidade, dislipidemia, hipertensão, intolerância à glicose, caracterizando a síndrome cardiometabólica (SC), tem alcançado proporções epidêmicas mundiais. Estudos têm sugerido que a prevalência destas doenças pode dobrar até 2030 [1]. Paradoxalmente, a desnutrição e a obesidade vêm sendo apontadas como problemas de saúde pública intimamente correlacionados com a síndrome cardiometabólica; sendo os países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento os principais alvos das consequências dessa injúria [2, 3].

Atualmente o termo Developmental Origins of Health and disease (DOHad) propõe que insultos ou estímulos em fases sensíveis do desenvolvimento, como por exemplo na fase da adolescência contribuem para as condições de saúde ou doença na vida adulta [2]. Nesse contexto, estudos epidemiológicos e experimentais têm mostrado que o estado de desnutrição em fases mais críticas da vida tais como gestação e lactação, são preditores relevantes do desenvolvimento de doenças cardiometabólicas na vida adulta [4, 5].

Estudos publicados recentemente por nosso grupo de pesquisa, demonstraram que a restrição proteica realizada durante a adolescência, também pode causar alterações metabólicas visíveis na idade adulta [6, 7]. Em dados obtidos a partir destes experimentos, foi observado que estes animais apresentaram, aos 120 dias de vida, aumento no acúmulo de gordura, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e aumento da pressão arterial (PA) (dados não publicados). Estas alterações podem ser consequência de uma disfunção autonômica observada nos animais adultos submetidos a restrição de proteína durante adolescência [7]. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a pressão arterial elevada a longo prazo, induzida pela exposição a dieta com baixa proteína durante a adolescência depende de uma hiperatividade simpática e seu papel modulador da pressão arterial.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais, condições experimentais e dieta

Após a aprovação do Comitê de Ética (CEUA nº: 4833210519), foram obtidos ratos Wistar de 25 dias do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Esses permaneceram em adaptação por cinco dias no biotério setorial.

Aos 30 dias de vida foram separados em dois grupos: um grupo recebeu uma ração com baixa proteína (LP; 4% de proteína) durante a adolescência (30 a 60 dias de vida) e o grupo controle que recebeu ração padrão (NP; 20,5% de proteína) durante todo o período experimental. Após o período de dieta especial os animais LP passaram por um período de recuperação dietética, dos 60 aos 120 dias de vida, com ração padrão. Após os 120 dias de vida ambos os grupos foram expostos ao protocolo de avaliação experimental.

2.2. Avaliação da função cardiovascular e sua modulação autonômica

Após a canulação da artéria femoral e veia femoral, os animais foram mantidos em caixas individuais para avaliação cardiovascular após 24 horas de recuperação [8-10].

Esse protocolo foi realizado em um período de três dias: No primeiro e segundo dia realizamos a avaliação da atividade autonômica cardíaca e frequência cardíaca (FC) intrínseca com metilatropina (3 mg/kg) e atenolol (4 mg/kg) [8, 9].

No início do segundo dia, foi analisado a influência autonômica sobre a pressão arterial média (PAM) e intervalo de pulso (IP) em condições basais, através da análise da variabilidade PAM e do IP com o programa (CardioSeries). Através de cálculos podemos estimar a zona de baixa frequência (LF) da pressão arterial média (PAM) que representa a atividade simpática vascular, a zona de alta frequência (HF) do intervalo de pulso (IP) que representa a atividade parassimpática cardíaca. E através da soma das zonas HF, LF e da zona de muito baixa frequência (VLF) estimamos a variabilidade total do intervalo de pulso, na qual podemos inferir o risco cardiovascular. A função do barorreflexo espontâneo na análise espectral foi calculada através do método da sequência (CardioSeries) usado para estimar o índice de efetividade do barorreflexo (BEI) e a sensibilidade do barorreflexo (Ganho).

No terceiro dia foi avaliada a sensibilidade do barorreflexo com injeções intravenosas de fenilefrina (8 µg/kg) e nitroprussiato de sódio (50 µg/kg) [11, 12]. Após a estabilização do sinal de PA foi avaliado o tônus simpático vascular a partir da injeção intravenosa de hexametônio (30 mg/kg) [9, 13].

2.3. Análises histológicas

Para as análises histológicas utilizamos outro lote com 12 animais de cada grupo, para verificar a espessura da túnica média da aorta torácica [14], tamanho dos cardiomiócitos e a fibrose perivascular no coração [15].

2.4. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (SEM). Para análise, utilizamos o Programa GraphPad Prism 6 e para comparação entre os grupos teste *t student*.

3. RESULTADOS

A fig. 1A mostra registros de PA representativos de cada grupo experimental. Animais LP, apresentaram um aumento de 19%, 20% e 22% na pressão arterial sistólica (PAS) (Fig. 1A, $p < 0,0003$), pressão arterial média (PAM) (Fig. 1, $p < 0,0021$) e pressão arterial diastólica (PAD) (Fig. 1C, $p < 0,0059$), respectivamente. Não se observou diferença significativa na FC entre os grupos.

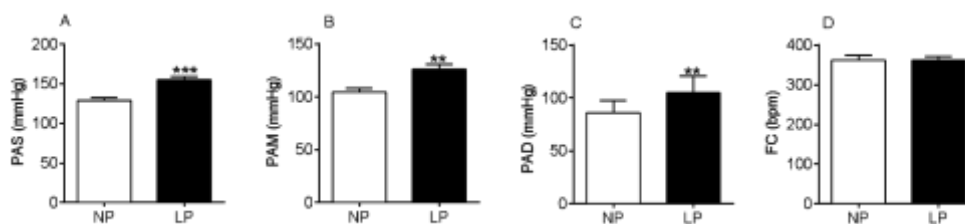


Figura 1. Pressão arterial em animais com 120 dias de vida em condições basais

* NP: Dieta com quantidade normal de proteína normal; LP: Dieta com baixa proteína; Pressão arterial sistólica (A), pressão arterial diastólica (B), pressão arterial média (C), Frequência cardíaca (FC). Valores expostos em média ± SEM*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ indicando significância estatística (Teste T student).



Com relação a análise espectral, os animais LP apresentam 41% de aumento da LF-PAM, apontando para um aumento da atividade simpática vascular (Fig. 2A, $p < 0,0359$), com um aumento de 75% e 37% do balanço autonômico e variabilidade total do IP respectivamente nos animais LP (Fig. 2C, $p < 0,0485$ e Fig. 2D, $p < 0,0116$). Não se observou alteração na zona HF-IP (Fig. 2B).

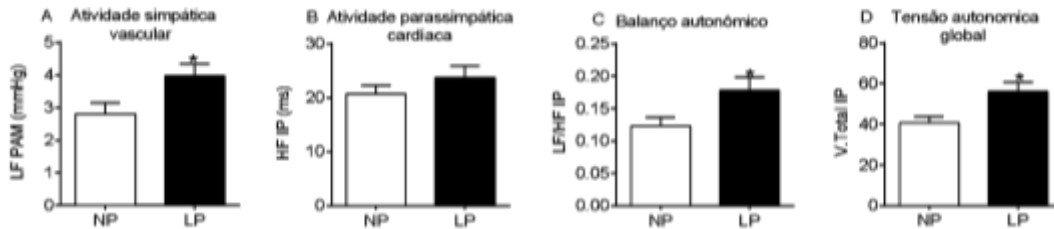


Figura 2. Análise espectral da pressão arterial e do intervalo de pulso em condições basais

* NP: Dieta com quantidade normal de proteína normal; LP: Dieta com baixa proteína; Zona de baixa frequência (LF) da pressão arterial média (PAM) (A), zona de alta frequência (HF) do intervalo de pulso (IP) (B), Zona de baixa frequência (LF) / zona de alta frequência (HF) do intervalo de pulso (IP) (C), variabilidade total do intervalo de pulso (IP) (D). Valores expostos em média \pm SEM*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ indicando significância estatística (Teste T student).

O tônus vagal (metilatropina) e simpático (atenolol) cardíacos foram semelhantes entre os grupos (tabela 1). A FC intrínseca, avaliada após o duplo bloqueio (tabela 1) com atropina e atenolol também não foi alterada pela dieta LP.

Com relação a sensibilidade do barorreflexo cardíaco, o grupo LP não apresentou mudança na resposta bradicárdica reflexa induzida por fenilefrina ou na resposta taquicárdica reflexa após injeção de nitroprussiato de sódio (tabela 1). O barorreflexo espontâneo avaliado pelo BEI e Ganho (tabela 1) foi semelhante entre os grupos.

Tabela 1. Avaliação autonômica cardiovascular após a injeção de drogas

Parâmetros	NP	LP
Atividade parassimpática induzida por metilatropina	83 \pm 10,59	82 \pm 8,11
Atividade simpática induzida por atenolol	-57 \pm 7,73	-46 \pm 4,22
Frequência cardíaca intrínseca	347 \pm 7,52	357 \pm 5,37
Índice de efetividade do barorreflexo (BEI)	0,20 \pm 0,014	0,22 \pm 0,018
Sensibilidade do barorreflexo (Ganho).	7,13 \pm 0,79	6,21 \pm 0,37
Barorreflexo induzido por fenilefrina	-2,21 \pm 0,40	-2,13 \pm 0,25
Barorreflexo induzido por nitroprussiato de sódio	-3,03 \pm 0,60	-3,40 \pm 0,37

*NP: Dieta com quantidade normal de proteína normal; LP: Dieta com baixa proteína; Atividade Parasimpática e simpática induzida do metilatropina e atenolol calculado (Delta FC após estabilização da aplicação – FC basal); Frequência cardíaca intrínseca após o duplo bloqueio com metilatropina e atenolol; Barorreflexo induzido por fenilefrina e nitroprussiato de sódio calculado (Delta FC/ Delta PAM). Valores expostos em média \pm SEM*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ indicando significância estatística (Teste T student).

Na avaliação do tônus simpático vascular, os animais LP apresentaram uma queda 35% maior da PAM (Fig. 3A, $p < 0,0060$) e 57% maior da amplitude da zona LF-PAM após injeção do hexametônio (Fig. 3B, $p < 0,0060$) comparado ao grupo controle.

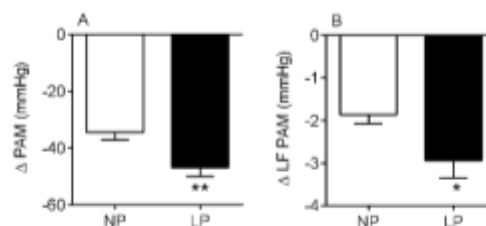


Figura 3. Resposta depressora ao hexametônio

* NP: Dieta com quantidade normal de proteína normal; LP: Dieta com baixa proteína; Delta da pressão arterial média (Diferença entre a PAM após injeção de hexametônio e PAM basal) (A); Delta da zona de baixa frequência da PAM em resposta ao hexametônio (Diferença entre LF-PAM após injeção de hexametônio e LF-PAMPAM basal) (B). Valores expostos em média \pm SEM*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ indicando significância estatística (Teste T student).



Na análise histológica da aorta torácica, os animais LP apresentaram redução de 9% da espessura da camada média da aorta torácica (tabela 2, $p < 0,0001$). No coração, o grupo tratado obteve um aumento de 10% do diâmetro dos cardiomiócitos (tabela 2, $p < 0,044$), no entanto não observou-se alteração na fibrose perivascular em relação aos controles.

Tabela 2. Análises histológicas de coração e aorta torácica

Parâmetros	NP	LP
Espessura da túnica média na aorta torácica (μg)	94,80 \pm 1,401	85,72 \pm 0,5879***
Diâmetro dos cardiomiócitos (μg)	10,44 \pm 0,2637	11,50 \pm 0,4357*
Fibrose perivascular no coração (a.u.)	4,219 \pm 0,1532	4,109 \pm 0,1529

* NP: Dieta com quantidade normal de proteína normal; LP: Dieta com baixa proteína; Valores médios da espessura da artéria torácica (barra de escala = 50 μm); Cardiomiócitos em corte transversal (barra de escala = 10 μm); Fibrose perivascular nos vasos do ventrículo (barra de escala = 50 μm). Valores expostos em média \pm SEM*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ indicando significância estatística (Teste T student).

4. DISCUSSÃO

Os animais LP apresentaram um aumento da (PA) em condições basais e um aumento tanto da atividade simpática vascular como do risco cardiovascular. Estudos com modelos de programação por exposição à dieta LP na gestação e lactação [9, 10, 16] evidenciaram um aumento da PA e um aumento da atividade simpática vascular, sugerindo que a dieta LP em fases críticas contribui para o aumento da simpática [9, 10, 17]. Ao avaliar estes parâmetros logo após o insulto com dieta LP durante a adolescência já observou-se o aumento da PA e atividade simpática [18-21]. Neste contexto, podemos sugerir que a disfunção autonômica e o aumento da PA observados nos presentes animais LP poderia caracterizar uma hipertensão instalada precocemente e mantida até a vida adulta. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR), considerados um modelo neurogênico de hipertensão dependente da hiperatividade simpática, apresentam um perfil semelhante aos animais expostos a dieta LP, com aumento de PA e atividade simpática, inclusive evidenciada pela hiperatividade simpática renal [22, 23]. Adicionalmente, estudos com exposição a dieta LP durante a adolescência sugerem que o aumento da PA pode ser devido uma desorganização da sinalização pelo neurotransmissor Glutamato na região rostro ventrolateral do bulbo (RVLM) [24] ou núcleo do trato solitário (NTS) [25], além de uma maior ativação do SRA [26-28] que podem levar a hiperatividade simpática nesse modelo, contudo estes mecanismos não foram explorados no presente estudo.

O aumento da PA pode ter favorecido as alterações histológicas evidenciadas por uma diminuição da espessura da camada média da aorta dos animais LP. Estudos apontam que a diminuição da espessura da túnica media da aorta [14, 29] pode ser uma das primeiras características que precedem o remodelamento vascular hipotrófico, de forma que quando associado a diminuição das fibras elásticas [14, 30] e um aumento na tensão na parede da artéria [30], pode modificar a distensibilidade vascular, contribuindo para a hipertensão arterial em animais programados por LP.

O aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, sem alteração na fibrose perivascular observado nos animais LP poderia apontar para o início de um processo de remodelamento cardíaco. Estudos de programação com dieta LP durante a gestação apontam para um quadro mais avançado de desorganização morfológica cardíaca aos 60 ou 112 dias de vida, pois observa-se uma deposição de colágeno no coração [31, 32], e diminuição do número de cardiomiócitos [26, 31, 32], além de modificações da expressão de miRNA no coração relacionados a estrutura e função cardíaca [32].

Outra via que poderia estar relacionada ao aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, poderia estar relacionado a alterações nos componentes do sistema renina angiotensina (SRA), visto que o coração também possui componentes locais responsáveis pela produção de angiotensina 2 (ANG 2) [33]. Em modelos de programação com LP ou em ratos SHR também foi encontrado um aumento da ANG 2 tanto plasmática como no ventrículo esquerdo [34] e um aumento da expressão do AT1 no ventrículo esquerdo [26, 35], que podem estar associados a um maior remodelamento cardíaco nesses animais.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a exposição a dieta pobre em proteína durante a adolescência induz à hipertensão na vida adulta, sustentada por uma maior atividade simpática, que pode estar conduzindo a uma alteração estrutural vascular e cardíaca. Tais resultados apontam para a relevância



de uma dieta balanceada na adolescência para o controle da ocorrência de hipertensão, além de indicar o potencial mecanismo fisiopatológico do elevado índice de hipertensão em populações de países subdesenvolvidos e desenvolvidos expostos a dietas de baixa proteína. Tais resultados são importantes para nortear as reflexões sobre as políticas públicas para controle do risco cardiovascular.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- [1] Vernochet C, Peres SB, Farmer SR. Mechanisms of obesity and related pathologies: transcriptional control of adipose tissue development. *FEBS J.* 2009; 276(20): 5729-37.
- [2] Uauy R, Klain J, Corvalan C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries?. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(6 Suppl): 1759-1764.
- [3] Armitage JA, Poston L, Taylor PD. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res.* 2008; 36: 73-84.
- [4] Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 2005; 25(3-4): 251-69.
- [5] de McMullen S, Langley-Evans SC, Gambling L, Lang C, Swali A, McArdle HJ. A common cause for a common phenotype: the gatekeeper hypothesis in fetal programming. *Med Hypotheses.* 2012; 78(1): 88-94.
- [6] de Oliveira JC, de Moura EG, Miranda RA, Moraes AMP, Barella LF, Conceição EPS, et al. Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. *J Endocrinol.* 2018; 237(3): 243-254.
- [7] de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol.* 2013; 216(2): 195-206.
- [8] Simas BB, Nunes EA, Crestani CC, Speretta GF. Cardiovascular and metabolic consequences of the association between chronic stress and high-fat diet in rats. *Stress.* 2018; 21(3): 247-256.
- [9] Barros MAV, Alves JDB, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015; 25(1): 123-30.
- [10] Paulino-Silva KM, Costa-Silva JH. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016; 43(11): 1046-1053.
- [11] Valenti VE, Ferreira C, Meneghini A, Ferreira M, Murad N, Ferreira Filho C, et al. Evaluation of baroreflex function in young spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 92(3): 205-15.
- [12] Valenti VE, Ferreira C, de Abreu LC, Colombari E, Sato MA. The variability of baroreflex sensitivity in juvenile, spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc J Afr.* 2011; 22(1): 14-7.
- [13] Radaelli A, Castiglioni P, Centola M, Cesana F, Balestri G, Ferrari AU, et al. Adrenergic origin of very low-frequency blood pressure oscillations in the unanesthetized rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290(1): 357-64.
- [14] Skilton MR, Gosby AK, Wu BJ, Ho LM, Stocker R, Caterson ID, et al. Maternal undernutrition reduces aortic wall thickness and elastin content in offspring rats without altering endothelial function. *Clin Sci (Lond).* 2006; 111(4): 281-7.
- [15] Junior MDF, Cavalcante KVN, Ferreira LA, Lopes PR, Pontes CNR, de Bessa ADSM, et al. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. *Life Sci.* 2019; 226: 173-184.
- [16] de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GSF, Wanderley AG, Leandro CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr.* 2014; 111(4): 606-15.
- [17] Martins CD, Chianca Jr DA, Fernandes LG. Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011; 38(2): 89-93.
- [18] Murca TM, Magno TSDR, de Maria MLDA, Capuruço CAB, Chianca Jr DA, Ferreira AJ. Cardiac responses of rats submitted to postnatal protein restriction. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012; 37(3): 455-62.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

- [19] Penitente AR, Fernandes LG, Cardoso LM, Silva ME, Pedrosa ML, Silva AL, et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sci.* 2007; 81(7): 609-14.
- [20] Loss IDO, Fernandes LG, Martins CD, Cardoso LM, Silva ME, Dias-da-Silva VJ, et al. Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. *Life Sci.* 2007; 81(11): 944-50.
- [21] Penitente AR, Novaes RD, Silva ME, Silva MF, Quintão-Junior JF, Guatimosim S, et al. Basal and beta-adrenergic cardiomyocytes contractility dysfunction induced by dietary protein restriction is associated with downregulation of SERCA2a expression and disturbance of endoplasmic reticulum Ca²⁺ regulation in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34(2): 443-54.
- [22] Li P, Gong JX, Sun W, Zhou B, Kong XQ. Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med Rep.* 2015; 12(5): 7116-22.
- [23] Lyonaga T, Shinohara K, Mastuura T, Hirooka Y, Tsutsui H. Brain perivascular macrophages contribute to the development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats via sympathetic activation. *Hypertens Res.* 2020; 43(2): 99-110.
- [24] Rodrigues FA, Chianca Jr DA, Fernandes LG. Malnutrition affects the pressor response to microinjection of L-glutamate into the RVLM of awake rats. *Biol Res.* 2012; 45(4): 337-43.
- [25] Rodrigues-Barbosa MC, Carneiro CM, de Oliveira LB, Silva FCS, Xavier CH, Fernandes LG, et al. Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex. *Brain Res.* 2012; 1483: 20-30.
- [26] Silva RB, Mesquita FF, Andreo M, Assalin HB, Ant J, Boer PA. Effect of gestational protein restriction on left ventricle hypertrophy and heart angiotensin II signaling pathway in adult offspring rats. *Health.* 2013; 6(4): 78-84.
- [27] Watanabe IKM, Jara ZP, Volpini PA, Franco M, Jung FF, Casarini DE. Up-regulation of renal renin-angiotensin system and inflammatory mechanisms in the prenatal programming by low-protein diet: beneficial effect of the post-weaning losartan treatment. *J Dev Orig Health Dis.* 2018; 9(5): 530-535.
- [28] Gomide JM, de Menezes RC, Fernandes LG, Silva FC, Cardoso LM, Miranda PH, et al. Increased activity of the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems is required for regulation of the blood pressure in rats fed a low-protein diet. *Exp Physiol.* 2013; 98(1): 57-66.
- [29] Maux DADSX, Araújo TND, Viana MT, Paes ST, Andrade MDA, Moraes SRAD. Influência do treino físico moderado sobre a estrutura da parede arterial de ratos submetidos à desnutrição protéica gestacional e neonatal. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2009; 15(5): 334-337.
- [30] Torres TS, Silva GDO, Aguila MB, de Carvalho JJ, Lacerda CAM. Effects of rosiglitazone (a peroxysome proliferator-activated receptor gamma agonist) on the blood pressure and aortic structure in metabolically programmed (perinatal low protein) rats. *Hypertens Res.* 2008; 31(5): 965-75.
- [31] Rossini KF, Oliveira CAD, Rebelato HJ, Esquisatto MAM, Catisti R. Gestational Protein Restriction Increases Cardiac Connexin 43 mRNA levels in male adult rat offspring. *Arq Bras Cardiol.* 2017; 109(1): 63-70.
- [32] Assalin HB, Gontijo JAR, Boer PA. miRNAs, target genes expression and morphological analysis on the heart in gestational protein-restricted offspring. *PLoS One.* 2019; 14(4): 1- 20.
- [33] Oigman W, Neves MFT. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens.* 2000; 3: 261-7.
- [34] Ren XS, Ling L, Zhou B, Han Y, Zhou YB, Chen Q, et al. Silencing salusin-beta attenuates cardiovascular remodeling and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep.* 2017; 7: 1-11.
- [35] da Costa TSR, Masson GS, Eichler RAS, de Souza JC, Lacchini S, Michelini LC. Training-Induced Deactivation of the AT1 Receptor Pathway Drives Autonomic Control and Heart Remodeling During the Transition From the Pre- to Hypertensive Phase in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ J.* 2020; 84(8): 1294-1303.



CARDIOVASCULAR EVENTS, ALL-CAUSE AND CARDIOVASCULAR MORTALITY WITH LEFT VENTRICULAR GLOBAL LONGITUDINAL STRAIN IN CHRONIC KIDNEY DISEASE PATIENTS: SYSTEMATIC REVIEW

Bárbara Letícia da Silva Guedes de Moura¹; Anderson Gusthavo dos Santos Mucenieks²; Enrico Prajante Bertolino²; Giordanna Chiqueto Duarte²; João Vitor Dudek³; Mariana Amâncio Daniel da Silva²; Izabel Galhardo Demarchi⁴; Rogério Toshio Passos Okawa⁵; Sérgio Seiji Yamada⁵; Jorge Juarez Vieira Teixeira⁶

¹Postgraduate Student (Ph.D.), Postgraduate Program in Biosciences and Physiopathology (PBF), State University of Maringa, Maringa, PR

²Medical undergraduate student, State University of Maringa, Maringa PR

³ Medical undergraduate student, Inga University Center, Maringa, PR

⁴Assistant Professor, Clinical Analysis Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianopolis, SC

⁵Associate Professor, Medical Department, State University of Maringa, Maringa, PR

⁶Associate Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR

e-mail: blsguedes@gmail.com

Keywords: chronic kidney disease; prognosis; speckle tracking echocardiography.

1. INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of morbidity and mortality in patients with advanced chronic kidney disease (CKD), accounting for >50% of all deaths [1]. Although classical Framingham risk factors remain important, there is increasing evidence to support renal-specific and dialytic disturbances increases the cardiovascular risk in this population, such as sodium/fluid balance, hyperuricemia, inflammation, vascular calcification and abnormal bone mineral metabolism [2], and these complex interaction results in a high prevalence of abnormalities of cardiac structure and function in patients with End Stage Renal Disease (ESRD) [3].

Left ventricular (LV) ejection fraction (EF) is widely used as a measure of systolic function. Reduced EF (<50%) is an important prognostic marker, however, less than 15% of ESRD patients have detectable systolic dysfunction [4,5] and the prognostic ability of EF can be limited because it is susceptible to loading conditions, [6] which change dramatically during interdialytic intervals in hemodialysis patients [7].

Global Longitudinal Strain (GLS) derived by Two-dimensional (2D) Speckle-Tracking Echocardiography (STE) is an emerging technique for measuring subtler disturbances in LV systolic function. There is emerging data that GLS is a superior predictor of cardiac events and all-cause mortality compared with EF in the general population with and without heart failure [8,9]. Although studies have demonstrated that patients with moderate-to-severe CKD and dialysis patients have subclinical evidence of impaired strain but preserved EF [10,11] there is evidence that compared with moderate-advanced CKD patients, GLS is better in ESRD group receiving maintenance hemodialysis [12]. Impaired GLS was proved to be associated with microvascular ischemia, interstitial fibrosis and cardiac myocyte hypertrophy caused by urotoxin, hypertension and hemodialysis-related myocardial stunning [13-15], which would all lead to cardiovascular mortality and morbidity.

The mechanism and applications of abnormal GLS in hemodialysis (HD) patients has not been fully clarified. We therefore performed a systematic review of STE as a predictor of total and cardiovascular mortality and morbidity in the ESRD population.

2. MATERIAL AND METHODS

This systematic review was conducted according to a previously protocol [16] undergoing registration with the Open Science Framework (OSF) database [17] and conforms to the PRISMA Statement [18].



2.1. Search strategy, Study selection and data extraction

MEDLINE, Web of Science, Lilacs and Google Scholar (grey literature) were searched until March, 2020 using the keywords 'global longitudinal strain', 'speckle tracking echocardiography', 'chronic kidney disease', 'hemodialysis' 'outcome', 'mortality', and 'prognosis'. The search strategy was developed first for the MEDLINE database and the effectiveness was tested and refined accordingly. Search results from each database were combined and duplicates were removed before screening (EndNote Web [19]). Additional papers were identified by searching the reference lists of relevant articles and their citation metrics. Initial title and abstract screening were performed using Rayyan software [20] and full texts of selected articles were retrieved and double screened for eligibility and data extraction by six researchers working independently (AGSM, BLSG, EPB, GCD, JVD, MADS). Discrepancies were resolved through consensus and data extraction will be validated by methodological and clinical experts (IGM, JJVT, RTPO, SSY).

2.2. Eligibility criteria and outcomes

All longitudinal studies that assessed the prospective association of STE-derived parameters with: (a) at least one of the pre-specified outcomes in ESRD (>18 years) population, (b) reported in English, (c) in accordance with ethical standards, were included and (d) Abstracts, reviews, conference proceedings or letters to the editor were excluded. Due to the characteristics of Doppler and CMR (Cardiovascular magnetic resonance imaging) -based strain, we only included studies that calculated strain by STE. The primary outcome was all-cause mortality whereas secondary outcomes were (1) composite cardiovascular or (2) cardiac endpoints. Any individual secondary endpoints included in 1 or 2 were considered as tertiary outcomes.

2.3. Data extraction

The following data were extracted: (1) citation details; (2) study and participant details; (3) demographics, clinical and laboratory variables; (4) exposure details including the hardware and the software used for the acquisition and analysis as well as details regarding the measured LV strain; (5) details of outcomes, including how these were ascertained; (6) statistical methods used, as well as statistics related to the association of interest, and (7) information related to adjustment for potential confounders.

3. RESULTS

3.1. Search results and study selection

A PRISMA diagram is shown in Figure 1. A total of 863 records were identified. After removing duplicates, 135 records of 258 were excluded by title and abstract. One hundred twenty-three full text articles were assessed for eligibility. One hundred and thirteen not meet the final specific inclusion criteria (wrong outcome: n=69; wrong publication type: n=17; wrong study design: n=16; wrong population: n=12; same cohort: n=2). See details on figure 1. Seven prospective (cohort) studies were eligible for qualitative synthesis. All included papers performed multivariate analysis after adjusting for significant factors to determine the effect of strain parameters on all-cause and cardiovascular mortality.

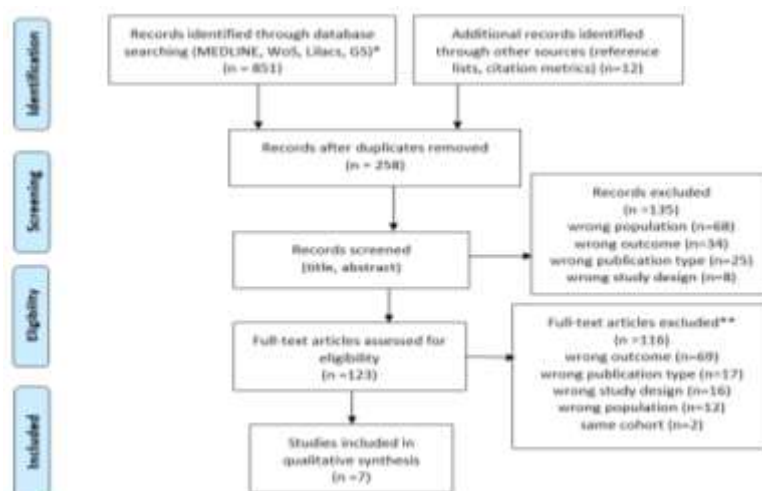


Figure 1. Flow diagram of articles included to the systematic review. PRISMA statement [18] *GS= Google scholar. WoS=Web of Science. ** After assessed full-text articles for eligibility stage: Wrong outcome= ineligible tertiary clinical outcomes. Wrong publication type= abstracts were not available by screening tools. Wrong study design= cross sectional/baseline cohort studies. Wrong population= combined data from predialysis/dialysis patients.



3.2. Characteristics of included papers

Characteristics of included papers are shown in Table 1. Among 1005 patients followed-up ranged between 469–822 days, there were 224 reported deaths (22,3%). There were 590 male participants (58.7%) and most patients were >60 years. Six studies recruited participants with known CVD at baseline [21-26] while one included only participants free of CVD [27]. The most prevalent medical conditions were hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, heart failure and ischemic heart disease.

3.3. Exposures and outcomes of included papers

Mainly characteristics of exposures and outcomes from included papers are shown in Table 1. All used 2DSTE and one also assessed myocardial strain by 3DSTE [31]. One used Philips QLAB 8.1 [25], three used EchoPac [26-28] and three used TomTec CPA [29-31]. All studies (n=7) assessed GLS. Two studies also assessed circumferential strain [24,27] and one study also assessed radial strain [31].

3.4. All cause/cardiovascular mortality and CV events

Five studies found associations between 2DSTE-derived measures and all-cause mortality [21, 24, 26] and three studies found associations with cardiovascular mortality [26,27,31] (Table 1). Two studies reported associations between GLS and a composite cardiovascular endpoint [21,27].

3.5. GLS and tertiary outcomes

Two studies also assessed circumferential strain [24, 27] and one study also assessed radial strain [31] found associations between STE-derived measures and cardiovascular outcomes.

4. DISCUSSION

This systematic review summarizes current evidence about the prognostic value of STE-derived measures in the ESRD patients. Included studies in this systematic review reported associations between STE-derived measures and all-cause and cardiovascular mortality and CV outcomes. There was insufficient evidence in relation to other measures (circumferential strain, radial strain) or 3DSTE-derived indices. Therefore, this systematic review also displayed important knowledge gaps in the current literature regarding the possible utility of myocardial deformation indices in ESRD patients.

The mechanisms of decreased LV function in CKD patients are complex and not thoroughly understood [28] but CKD patients undergo progressive change in myocardial composition and function due to pressure and volume overload, ischemia and CKD-related biochemical abnormalities.

Ejection fraction (EF) measured from conventional echocardiogram is the gold standard for assessment of LV systolic function. However, EF has important technical limitations including load and geometry dependency and lacks sensitivity to detect subtle LV dysfunction [29].

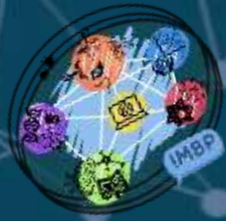
Global longitudinal strain (GLS) is an emerging technique for measuring subtler disturbances in LV systolic function. The two-dimensional strain method uses frame-by-frame tracking of naturally occurring acoustic reflections (speckles) that move with cardiac segments during the cardiac cycle; allowing measurement and characterization of regional and global systolic function. Less negative longitudinal strain (peak global) was associated with an increased cardiovascular mortality. A more positive, and hence more abnormal GLS, was also associated with cardiac death [8,9,30].

Although radial, circumferential, and longitudinal fibers are predominantly in different layers of the myocardium, there are evidence of reduced myocardial deformation in all these orientations when we compared ESRD patient cohort to healthy persons [23]. As heart muscle is incompressible, strain parameters are interrelated in three dimensions, thus, by the time the chamber contracts and shortens in systole (circumferential and longitudinal strain), the wall thickens (radial strain) [31].

The increased risk for cardiovascular morbidity and mortality might be caused by uremic cardiomyopathy (UC), a common complication in patients with ESRD that is characterized by cardiac fibrosis, capillary rarefaction, left ventricular hypertrophy, and both systolic and diastolic dysfunction. [13-15,23]. Therefore, early detection of UC by STE in patients with ESRD might identify patients at risk.

As with systematic reviews of observational studies, variations in the study design, inclusion criteria, follow-up periods and endpoints are all potential sources of heterogeneity among studies. The parameters: ethnicity, comorbidities, medications, laboratories parameters, hemodialysis determinants (vintage dialysis, times per week, cause of renal failure) and dialysis access (Arteriovenous fistula / graft / Catheter) will be adequately assessed in the "Quality assessment and quantitative synthesis" Stage of this systematic review.

A modified version of the Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale of cohort studies will be used to assess the quality of included papers [32]. The degree of heterogeneity will be assessed using Higgins Thompson I² test [33] and Cochran's Q test [34]. If the included studies are sufficiently homogeneous, a quantitative synthesis using fix or random effect meta-analysis will be used to pool the results of the association of interest. For presenting the results, we will likely to use the HR (95%CI) as



an effect estimate and will present the data graphically in forest plots. If data allow, we will perform meta-regression to explore potential sources of between-study heterogeneity: (1) study quality, (2) variation in exposure measurement and (3) variation in CV and cardiac outcomes definition. Possible publication bias will be assessed using a Funnel plot [35].

Although information on potential confounders was limited and inconsistent, there was some evidence that GLS was independent of conventional cardiovascular risk factors and other echocardiographic measures. There was insufficient evidence in relation to other myocardial deformation indices to draw conclusions with respect to outcomes.

5. CONCLUSION

This systematic review synthesized evidence regarding STE-derived measures as prognostic indicators of mortality and CV events in end stage renal disease patients. The clinical implications of this work relate to the current status of diagnosis and treatment of heart disease in patients receiving dialysis.

FINANCIAL SUPPORT

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001). CAPES.

REFERENCES

- [1] USRDS. Annual Data Report 2015: International Comparisons, 2015. Available at: https://www.usrds.org/2015/download/vol2_13_International_15.pdf.
- [2] National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse (NKUDIC). Kidney Disease Statistics for the United States 2012. Available at: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/Pages/kidney-disease-statistics-united-states.aspx>.
- [3] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32(Suppl 3): S112–S119.
- [4] Mele D, Andrade A, Bettencourt P, Moura B, Pestelli G, Ferrari R. From left ventricular ejection fraction to cardiac hemodynamics: role of echocardiography in evaluating patients with heart failure. *Heart failure reviews*, 2020. 25(2), 217-230.
- [5] Ciavarella GM, Altieri S, Limite LR, Russo D, Luciani M, De Biase L, et al. Longitudinal changes of left and right cardiac structure and function in patients with end-stage renal disease on replacement therapy. *European journal of internal medicine*, S0953-6205.
- [6] Severino P, Maestrini V, Mariani MV, Birtolo LI, Scarpati R, Mancone M, et al. Structural and myocardial dysfunction in heart failure beyond ejection fraction. *Heart failure reviews*, 2020. 25(1), 9-17.
- [7] Ibrahim MK, Kamal OMM, Hassan MS, Khalifa MMM. Interdialytic Weight Gain and Its Relation to Outcome among Patients on Maintenance Hemodialysis. *QJM: An International Journal of Medicine*, 2020. 113(Supplement_1), hcaa052-020.
- [8] Patel J, Rikhi R, Hussain M, Ayoub C, Klein A, Collier P, et al. Global longitudinal strain is a better metric than left ventricular ejection fraction: lessons learned from cancer therapeutic-related cardiac dysfunction. *Current Opinion in Cardiology*, 2020. 35(2), 170-177.
- [9] Al Saikhan L, Park C, Hardy R, Hughes A. Prognostic implications of left ventricular strain by speckle-tracking echocardiography in the general population: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag*. 2019;15:229-251. Published 2019 Jul 24.
- [10] Liu YW, Su CT, Huang YY, Yang CS, Huang JW, Yang MT, et al. Left ventricular systolic strain in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2011; 33: 84–90.
- [11] Wang H, Liu J, Yao XD et al. Multidirectional myocardial systolic function in hemodialysis patients with preserved left ventricular ejection fraction and different left ventricular geometry. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 4422–4429.
- [12] Liu YW, Su CT, Huang YY, Yang CS, Huang JW, Yang MT. et al. Left Ventricular Systolic Strain in Chronic Kidney Disease and Hemodialysis Patients. *American Journal of Nephrology*, 2011 33(1), 84–90.
- [13] Lu DY, Ventoulis I, Liu H, Kudchadkar SM, Greenland GV, Yalcin H, et al. Sex-specific cardiac phenotype and clinical outcomes in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *American heart journal*, 2020. 219, 58-69.
- [14] Ishizu T, Seo Y, Kameda Y, Kawamura R, Kimura T, Shimojo N, et al. Left ventricular strain and transmural distribution of structural remodeling in hypertensive heart disease. *Hypertension*, 2014. 63(3), 500-506.
- [15] Sun M, Kang Y, Cheng L, Pan C, Cao X, Yao H, et al. Global longitudinal strain is an independent predictor of cardiovascular events in patients with maintenance hemodialysis: a prospective study using



- three-dimensional speckle tracking echocardiography. The international journal of cardiovascular imaging, 2016. 32(5), 757-766.
- [16] Moura BLSG, Santos TdS, Okawa RTP, Teixeira JJV. Implicações prognósticas em renais crônicos por deformação miocárdica (strain) do ventrículo esquerdo: revisão sistemática e meta-análise. [Anais] COBRAPE-Conferência Brasileira de Pesquisas Baseadas em Evidências. Available on: <https://cobe.paginas.ufsc.br/files/2020/01/COBRAPE-Anais.pdf>
- [17] Foster ED, Deardorff A. Open science framework (OSF). Journal of the Medical Library Association: JMLA, 2011 105(2), 203.
- [18] Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. Ann Intern Med. 2009;151(4):264-269, W64.
- [19] ENDNOTE WEB McKinney, A. EndNote Web: Web-Based Bibliographic Management. Journal of electronic resources in medical libraries, 2013 10(4), 185-192.
- [20] Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. Systematic reviews, 2016. 5(1), 210.
- [21] Chiu D, Abidin N, Johnstone L, · Chong M, · Kataria V, · Sewell J, et al. Novel Approach to Cardiovascular Outcome Prediction in Haemodialysis Patients. Am J Nephrol 2016 43:143-152.
- [22] Huang JC, Tsai YC, Wu PY, Lee JJ, Chen SC, Chiu YW, et al. Independent Association of Overhydration with All-Cause and Cardiovascular Mortality Adjusted for Global Left Ventricular Longitudinal Systolic Strain and E/E'Ratio in Maintenance Hemodialysis Patients. Kidney and Blood Pressure Research, 2018 43(4), 1322-1332.
- [23] Kramann R, Erpenbeck J, Schneider RK, Röhl A B, Hein M, Brandenburg VM, et al. Speckle tracking echocardiography detects uremic cardiomyopathy early and predicts cardiovascular mortality in ESRD. Journal of the American Society of Nephrology, 2014 25(10), 2351-2365.
- [24] Liu YW, Su CT, Sung JM, Wang SP, Su YR, Yang CS, et al. Association of left ventricular longitudinal strain with mortality among stable hemodialysis patients with preserved left ventricular ejection fraction. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2013. 8(9), 1564-1574.
- [25] Obokata M, Kurosawa K, Ishida H, Ito K, Ogawa T, Ando Y, et al. Incremental prognostic value of ventricular-arterial coupling over ejection fraction in patients with maintenance hemodialysis. Journal of the American Society of Echocardiography, 2017. 30(5), 444-453.
- [26] Pressman GS, Rammohan HRS, Romero-Corral A, Fumo P, Figueredo, VM, Gorcsan IIIJ. Echocardiographic strain and mortality in black Americans with end-stage renal disease on hemodialysis. The American journal of cardiology, 2015 116(10), 1601-1604.
- [27] Sun M, Kang Y, Cheng L, Pan C, Cao X, Yao H, et al. Global longitudinal strain is an independent predictor of cardiovascular events in patients with maintenance hemodialysis: a prospective study using three-dimensional speckle tracking echocardiography. The international journal of cardiovascular imaging, 2016. 32(5), 757-766.
- [28] Matsushita K, Selvin E, Bash LD, Franceschini N, Astor BC, Coresh J. Change in estimated GFR associates with coronary heart disease and mortality. J Am Soc Nephrol. 2009 20:2617–2624.
- [29] Marwick TH. Methods used for the assessment of LV systolic function: common currency or tower of Babel? Heart 2013; 99: 1078–1086.
- [30] Miguel LSM, Villarraga HR, Abduch MCD, Lima MF, Cruz CBBV, Sbrano JCN et al. Global Longitudinal Strain or Left Ventricular Twist and Torsion? Which Correlates Best with Ejection Fraction?. Arq. Bras. Cardiol. 2017 July; 109(1): 23-29.
- [31] Abduch MCD, Alencar AM, Mathias Jr W, Vieira MLC. Cardiac Mechanics Evaluated by Speckle Tracking Echocardiography. Arq. Bras. Cardiol. [Internet]. 2014 Apr [cited 2020 Aug 09] ; 102(4): 403-412.
- [32] Wells G, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, et al. Newcastle-Ottawa quality assessment scale cohort studies. 2014. 2015-11-19]. Available on: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp.
- [33] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. BMJ 2003;327:557–60. 45. Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a metaanalysis. Stat Med 2002;21:1539–58.
- [34] Cochran WG. The comparison of percentages in matched samples. Biometrika, 1950. 37(3/4), 256-266.
- [35] Sterne, JA, Sutton AJ, Ioannidis JP, Terrin N, Jones DR, Lau J, et al. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. BMJ, 2011 343.



Table 1. General characterization, exposures, all cause/cardiovascular mortality and events assessed by Speckle tracking myocardial strain.

Study design	n	FU ^a	Age	Gender ^b	LVEF	GLS ^c	All-cause mortality	CV mortality	CV events	GLS prognostic value
[2 1]	UK, HD patients 198	27.6 (17.3– 32.7) months	64.2 (52.8– 72.9)	136 (68.7%)	61.7±10.1% pLVEF (≥50%): 171 (86.4%)	-13.5 ±3.3%	48 (24.25%)	T: 15 MI: 8, SCD: 6; HF secondary to CAD: 1	44	All-cause mortality HR 1.11 (1.02-1.22), p = 0.014
[2 2]	Taiwan, Hydration Status: (a): ΔHS <7% (b): ΔHS ≥7% (fluid overload)	Total(T): 178 2.7±0.5 years	60.9 ±11.6	87 (48.9%)	T: 66.5 ± 1.0 (a): 67.2 ± 9.3 (b): 66.3 ± 10.3	T: -16.6 ±4.0% (a): -17.1 ±3.7% (b): -16.4 ±4.1%	T: 24 (13.5%) Non-CV deaths: 11	T: 11 SCD: 5, MI: 3; Ventricular arrhythmia: 1; Fatal stroke: 1; HF: 1	NR	All-cause mortality Adjusted HR: 1.198 (1.074-1.336) p=0.001 CV mortality Adjusted HR: 1.26 (1.09–1.45) p=0.002
[2 3]	UK, HD: 93% ^d Peritoneal dialysis: 7%	T: 171 2.1±0.9 years	T: 64±14	T: 111 (64.9%)	pLVEF (≥50%)	NR	75 (44%)	42 (25%)	NR	All-cause mortality Adjusted HR: 1.10 (1.03-1.17) p=0.01 CV mortality Adjusted HR: 1.17 (1.07-1.28) p=0.001
[2 4]	Taiwan, (a) (GLS<15%) (b) (GLS<15%)	T: 88 (1) n: 15 (2) n: 73 25.6±9.9 months	67.0±11.2	31 (35%)	pLVEF (≥50%): 88 (100%) 64.3 ± 6.0	T: -18.1 ±4.0	T: 24 (27.3%) (a): 9 (60%) (b): 15 (21%)	T: 9 (a): 4 (27%) (b): 5 (7%)	T: 38 (a): 12 (b): 26	All-cause mortality Model 2: HR: 2.94 (1.24-6.95), p=0.01
[2 5]	Japan, without outcomes (-) with outcomes (+) Subgroup GLS assessed: 207	T: 234 776 (701-964) days	(-) 64±11 (+) 67±9	(-): 143 (70%) (+): 22 (73%)	pLVEF (≥50%): (-) n: 188 (92%) (+) n: 25 (83%) (-) 67% (60-73) (+) 62% (55-66)	(-) -16.7 ±4.9 (+) -14.4 ±4.8	T: 21 (8.97%) Non-CV deaths: 11	10 (4.2%): SCD: 6 MI: 2 HF: 1 Perioperative death: 1	9	CV outcomes Unadjusted HR: 0.91 (0.83–0.99) p=0.044
[2 6]	USA, Black Americans, LVsd: 89%	22.8 months	59.4±13.3	26 (54%)	59% ± 8	-13.4% (-8.6% - 22.0%)	9 (19%)	NR	NR	All-cause mortality Adjusted HR: 1.30, (1.10-1.56), p=0.02
[2 7]	China, -HD -Controls	T: 88 HD: 66 Controls: 22 months	48±14	HD: 34 (38.6%)	2DSTE: C: 67.3±3.5% HD: 66.9 ± 4.5%	C: -18.8 ±2.3% HD: -17.0 ±2.3%	23 (34.8%)	Congestive HF: 1	23	CV outcomes Adjusted HR: 3.94 (1.33-11.66) p=0.013

Values are presented as mean ± SD/median (IQR), number (%). 2DSTE: Two-dimensional Speckle tracking echocardiography. CAD: Coronary Arterial Disease. CV: Cardiovascular. GI: gastrointestinal. HD: Hemodialysis. HF: heart failure. LV: left ventricular. LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction. LVsd: Left Ventricular systolic dysfunction. MI: myocardial infarction. NR: not reported. pLVEF: Preserved LVEF. SCD: Sudden cardiac death. T: total.
^aFU: Follow up. ^bGender, (male, %). ^cGLS: Global longitudinal strain. (Impaired GLS was defined as greater than -16% or -15% (a less negative value reflects a more impaired GLS). ^d31 patients had previously undergone kidney transplantation and had returned to dialysis (4.6±5.3 years before echocardiography)



DISFUNÇÃO CARDIOMETABÓLICA EM RATOS ADULTOS PROGRAMADOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA NA ADOLESCÊNCIA

Maiara Vanusa Guedes Ribeiro¹; Anna Rebeka Ferreira Oliveira¹; Maria Natália Chimirri Peres²; Silvano Piovan³; Paulo César de Freitas Mathias⁴; Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow⁵.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

⁴Docente, Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

⁵Docente, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba, PR.

⁵Docente, Programa de Pós-Graduação de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

e-mail: maiara.vanusa@gmail.com

Palavras-chave: dieta hiperlipídica; hipertensão; metabolismo.

1. INTRODUÇÃO

O conjunto de desordens incluindo obesidade, dislipidemia, hipertensão, glicose em jejum alterada, caracterizando a síndrome cardiometabólica (SC), tem alcançado proporções epidêmicas mundiais. Sua prevalência pode chegar a 85%, dependendo da região, população estudada e critérios de definição utilizados [1]. Adicionalmente, a prevalência desta síndrome pode dobrar até 2030 [2]. Os fatores causadores destas alterações ainda devem ser determinados, mas a mudança no estilo de vida (aumento do sedentarismo, estresse e mudanças no hábito alimentar) observada nas últimas décadas tem sido considerada preponderante contribuindo para a instalação da SC e também aumentando as chances do desenvolvimento de doenças cardíacas (DC), derrames e diabetes Mellitus tipo 2 [3].

Estudos epidemiológicos e experimentais têm mostrado que insultos nutricionais em fases mais críticas da vida, tais como gestação e/ou lactação, são importantes preditores do desenvolvimento da síndrome cardiometabólica na vida adulta [4, 5]. Esses dados indicam para a hipótese de Barker, a qual propõe que insultos, sobretudo nutricionais durante a gravidez, induzem mudanças permanentes na estrutura corporal, função e metabolismo aumentando o risco de morte cardiovascular na vida adulta [6]. Essa programação pode ser associada a alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) [7].

Atualmente o termo *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) agrega informações de várias pesquisas e propõe investigações no sentido de esclarecer a origem das doenças na vida adulta [8]. Contudo, o grande número de dados obtidos evidenciou que o surgimento tardio de doenças não transmissíveis não somente teria origem na vida fetal ou pré-natal, mas também ao longo da infância e adolescência [9,10,11, 12]. No entanto, os limites da plasticidade neuronal ainda não estão bem definidos e a associação entre programação cardiometabólica e doenças tardias na vida não estão necessariamente ligadas somente a vida precoce [13].

Estudos têm mostrado que a dieta rica em gordura (HF) (do inglês *high fat* – HF) ofertada durante a gestação e lactação desencadeia obesidade, alterações no metabolismo de glicose, dislipidemia, hipertensão e disfunção renal observadas na prole durante a vida adulta [14,15,16]. Pesquisas recentes demonstraram que ratos expostos a uma dieta rica em gordura durante a infância e adolescência apresentam, na vida adulta, um aumento da glicemia e insulinemia de jejum, resistência à insulina, elevada secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, bem como aumento do peso corporal e depósitos de gordura [17,18]. Entretanto, os estudos com dieta hiperlipídica durante o período da adolescência, que caracterizam a SC na vida adulta ainda são escassos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da dieta rica em gordura durante a adolescência, período mais tardio de desenvolvimento do SNC, sobre o desenvolvimento da SC na vida adulta.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais, condições experimentais e dieta

Ratos Wistar de 25 dias foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e trazidos para o Biotério Setorial do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Esses permaneceram em adaptação por cinco dias e ao completarem 30 dias iniciaram o tratamento. Os animais ficaram sob condições de temperatura (23 ± 2 °C) e fotoperíodo (07h00min às 19h00minh, ciclo claro/escuro) controlados, com água e ração à vontade. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº: 1527130815). O modelo experimental utilizado constituiu na indução de ingestão em excesso de gordura animal durante a adolescência, usando uma dieta hiperlipídica (5.817 kcal/g e 35% de gordura de porco) [19]. Aos 30 dias de vida os ratos foram divididos em dois grupos experimentais, um que continuou recebendo a dieta normolipídica (grupo NF) e o grupo que passou a receber a dieta rica em gordura dos 30 aos 60 dias de vida (grupo HF). Após o período de tratamento dietético (30 dias) parte dos animais passaram por um período de recuperação dietética (60 dias, com dieta normoproteica). Aos 120 dias de vida, 9 a 24 animais por grupo foram divididos em dois lotes para avaliação, sendo um para avaliação do metabolismo (teste de tolerância a glicose, teste de tolerância a insulina, eutanásia para análises bioquímicas sanguíneas e coleta de tecidos) e outro para avaliação cardiovascular (aferição da pressão arterial (PA)).

2.2. Coleta de parâmetros biométricos

Durante todo o período experimental registrou-se a evolução ponderal a cada sete dias e o consumo de água e ração dos animais três vezes por semana.

2.3. Metabolismo da glicose

Após 6 horas de jejum, os animais de 120 dias de vida foram submetidos ao teste de tolerância a insulina (ipITT). Os mesmos foram pesados e receberam a administração de insulina intraperitoneal (1U/Kg de PC) e nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção de insulina foi coletado 300µL de sangue pela cauda do animal para quantificação da glicemia basal. Posteriormente, a taxa de decaimento da glicose sanguínea (kITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/(t1/2)$. Após dois dias de recuperação e com jejum noturno de 12 horas, o teste de tolerância à glicose oral (OGTT) foi realizado nos mesmos animais submetidos ao ipITT. Os animais foram pesados e em seguida foi realizada a coleta de sangue pela cauda para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0). Após, os animais receberam a dose (2g/Kg) de glicose via oral na concentração de 50%. A glicemia foi verificada aos 15, 30, 45, 60 e 120 min após a administração da glicose [20].

2.4 Dosagem sanguínea em jejum

Valores plasmáticos basais de glicose, colesterol, triglicerídeos, HDL-colesterol e LDL-colesterol foram quantificados a partir das amostras de sangue total coletado após eutanásia dos animais. O plasma foi recolhido e armazenado a 20°C e posteriormente foi mensurada a glicemia pelo método da glicose oxidase, por espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO200FL, Bio Plus®, São Paulo/SP, Brasil), utilizando kit comercial (Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil). O colesterol total foi dosado com o método colorimétrico de colesterol oxidase e os triglicerídeos foram dosados pelo método colorimétrico do glicerol-3-fosfato oxidase utilizando kits comerciais (Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil), ambas leituras foram realizadas em equipamento de espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO200FL, Bio Plus®, São Paulo/SP, Brasil). O HDL-colesterol foi determinado utilizando o mesmo método descrito para dosagem de colesterol, posteriormente a precipitação de quilomícrons e lipoproteínas de baixa densidade com kit comercial (Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil).

2.5 Procedimentos de canulação vascular para registro da pressão arterial

Sob anestesia injetável (Cetamina-Xilazina; 75mg + 15mg/kg de peso corporal via intraperitoneal) inseriu-se uma cânula (P10 -Micro-Renathane conectada a uma cânula P50 - ClearTygon) na artéria femoral para a monitorização da pressão arterial (PA). Ao final das cirurgias os animais receberam anti-inflamatório (Meloxicam, 100mg/kg, IP., 8/8 horas) e antibiótico (Enrofloxacin 5mg/kg, IP., 8/8 horas). Após 24 horas de recuperação, a cânula arterial do rato foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0670, ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) o qual foi conectado a um sistema de registro computadorizado (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) que utiliza o sistema DI 158 da WinDaq para registro da PA, pulso a pulso (WinDaq lite, DataQinstruments, Estados Unidos da América). Os dados foram analisados com software específico Advanced CODAS (Data Q instruments, Estados Unidos da América).



2.6 Análise estatística

Os resultados deste estudo foram apresentados como média \pm desvio padrão da média (SEM). O nível aceitável de erro tipo II foi 5%, portanto os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio do Programa GraphPadPrism 6 (GraphPad softwares, La Jolla, CA, USA) por teste-T ou análise de variância para multifatores (ANOVA) quando adequado, o qual permitiu que cada animal fosse seu próprio controle e também permitiu a comparação entre animais.

3. RESULTADOS

Na Tabela 1 encontram-se os resultados dos parâmetros biométricos como consumo e ingestão calórica, assim como peso de estoques de gorduras e coração. Os animais expostos à dieta hiperlipídica apresentaram uma área sobre a curva do consumo alimentar do período de dieta especial 11% menor que os animais controles ($p < 0,001$). A área sobre a curva da ingestão calórica do período de dieta especial foi 10% maior nos animais expostos a dieta hiperlipídica comparado aos animais controle ($p < 0,01$). Ao final do protocolo, o estoques de gorduras retroperitoneal, mesentérica e marrom foram 34%, 22% e 25% maiores nos animais submetidos à dieta hiperlipídica quando comparados aos animais controle. Não foi observada diferença no peso do coração entre os grupos. Durante o período de exposição à dieta hiperlipídica não houve diferença de peso corporal entre os grupos (figura 1); no entanto, a partir da primeira semana de recuperação dietética os animais do grupo tratado tiveram um aumento de peso corporal, quando comparados ao controle, refletindo em uma maior área sobre a curva do peso corporal ao longo do protocolo dos animais tratados com dieta hiperlipídica (figura1A). Ao final do protocolo experimental o peso corporal dos animais do grupo HF foi 14% maior em relação ao controle ($p < 0,01$; figura1B).

Parâmetros biométricos	NF	HF	Significância P < 0,05
AUC de Consumo alimentar (g)	2526 \pm 40,40	2225 \pm 18,44	0,0001
AUC de Ingestão calórica (Kcal)	1446 \pm 23,01	1598 \pm 29,83	0,0038
G. Retroperitoneal (g/100g)	1,22 \pm 0,06	1,78 \pm 0,08	0,0001
G. Mesentérica (g/100g)	0,81 \pm 0,05	1,17 \pm 0,06	0,0344
G. Marrom (g/100g)	0,09 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,0238
Coração (g/100g)	0,50 \pm 0,01	0,49 \pm 0,02	0,6904

Tabela 1. Parâmetros biométricos.

*HF: Dieta hiperlipídica; NF: Dieta controle. AUC: Área sobre a curva. Consumo em gramas e em Kcal dos 30 aos 120 dias. Gorduras Retroperitoneal, mesentérica e marrom e coração coletadas aos 120 dias.

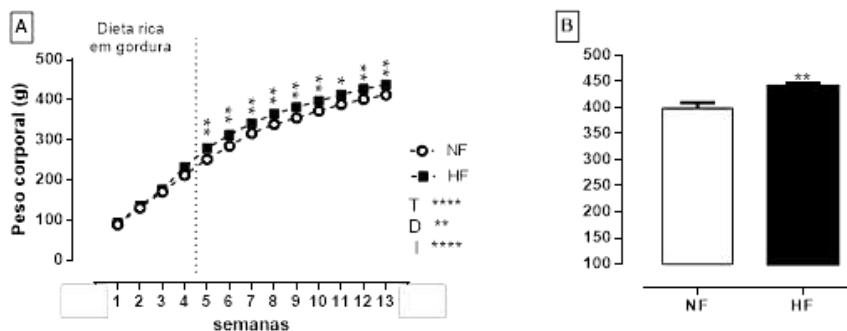


Figura 1. Avaliação de peso corporal dos animais ao longo do protocolo experimental.

*HF: Dieta hiperlipídica; NF: Dieta controle. Peso corporal ao longo do protocolo experimental, T: tempo; D:dieta; I: interação, $p < 0,0001$ para T e I, para D $p < 0,0015$ (A). Peso corporal final $p < 0,0020$ (B).

Os parâmetros de avaliação do metabolismo da glicose estão representados na Figura2. A constante de decaimento da glicemia (Kitt%) foi 30% menor no grupo tratado com dieta hiperlipídica ($p < 0,04$) comparado ao grupo controle. O grupo HF mostrou 20% maior glicemia comparado ao grupo controle ($p < 0,001$; figura2A). No OGTT foi observado um pico de glicemia aos 15 minutos após a injeção de glicose, e a glicemia foi restaurada aproximadamente aos 120 minutos. Nos tempos 0, 15 e 30 minutos os ratos HF exibiram uma glicemia 14%, 15%, 6% maior, respectivamente, comparado aos animais controle ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente (figura2B).

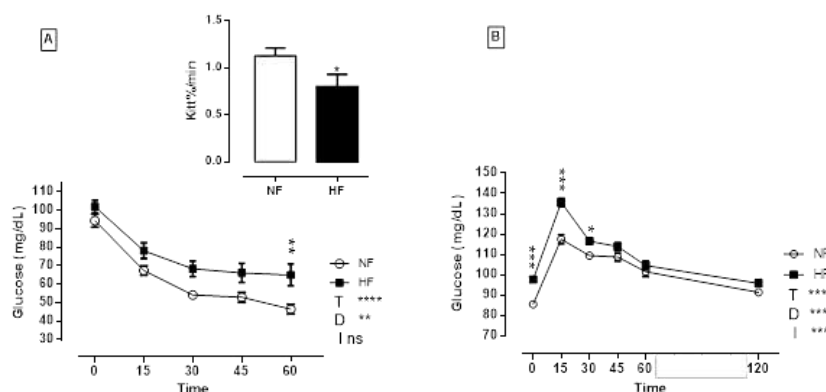


Figura 2. Avaliação dos parâmetros do metabolismo da glicose.

*HF: Dieta hiperlipídica; NF: Dieta controle. T: tempo; D:dieta; I: interação. NS: Não significativo. Glicemia e constante de decaimento da glicemia-Kitt% durante o teste de ITT (A). Glicemia e área sob a curva- AUC durante o teste de OGTT (B).

A glicemia em jejum foi 14% maior, enquanto os triglicerídeos, colesterol LDL e VLDL foram 34%, 35% e 35% maiores, respectivamente, nos animais expostos a dieta hiperlipídica comparados ao grupo controle ($p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,05$, respectivamente; tabela 2). Os colesteróis total e HDL não apresentaram diferença entre os grupos.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos dos animais ao final do protocolo experimental.

*HF: Dieta hiperlipídica; NF: Dieta controle.

Dosagens bioquímicas	NF	HF	Significância P <0,05
Glicose (mg/dL)	96,22 ± 4,02	109,8 ± 3,78	0,0468
Triglicerídeos (mg/dL)	155,90 ± 6,74	209,6 ± 7,41	0,0189
Colesterol total (mg/dL)	90,22 ± 4,17	95 ± 6,15	0,5298
HDL (mg/dL)	52,78 ± 3,04	56 ± 2,94	0,4578
LDL (mg/dL)	6,48 ± 1,94	27,96 ± 3,73	0,0001
VLDL (mg/dL)	31,16 ± 1,34	41,87 ± 3,88	0,0192

Na figura três observa-se que a exposição precoce à dieta hiperlipídica aumentou a pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) em 10% e 4%, respectivamente, comparado ao grupo controle ($p < 0,009$ e $p < 0,015$). A dieta hiperlipídica não afetou a pressão de pulso ou a frequência cardíaca desses animais.

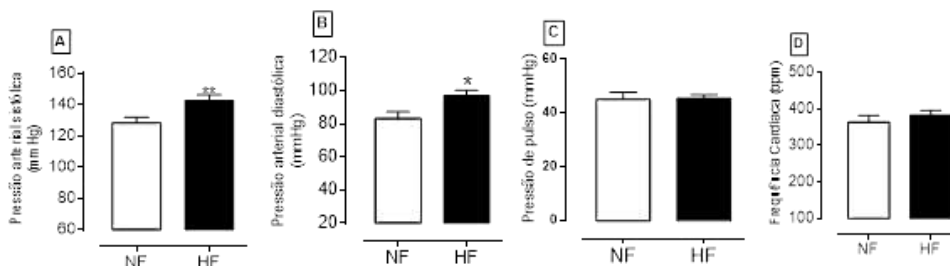


Figura 3. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares.

*HF: Dieta hiperlipídica; NF: Dieta controle.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, ratos adolescentes que ingeriram dieta rica em gordura apresentaram na idade adulta um aumento da ingestão calórica durante o período de dieta HF, maior ganho de peso corporal, aumento de triglicerídeos, colesterol LDL e aumento da pressão arterial. Esses resultados sugerem que a exposição à dieta hiperlipídica durante a adolescência tem consequências a longo prazo na saúde e programa para o desenvolvimento da SC na vida adulta. Assim como a gestação e lactação,



a adolescência é um período importante para o desenvolvimento e organização de estruturas cerebrais. Vários estudos apontam que a exposição a estressores ambientais em cada um desses períodos poderia ser responsável pelo desenvolvimento de doenças metabólicas tardiamente [10,21,19].

O aumento do consumo de calorias e peso corporal nos animais tratados corrobora com um estudo de programação materna por exposição a dieta hiperlipídica em camundongos, o qual mostrou que os filhotes apresentavam aumento da ingestão calórica, bem como aumento do peso corporal na idade adulta [22]. O aumento nos estoques de gordura observado nos animais HF corrobora com estudos prévios em ratos tratados com esta dieta na adolescência, no qual apresentaram maiores estoques de gorduras na vida adulta [17, 19]. Este aumento de peso corporal, principalmente após o período de dieta HF, assim como o aumento dos estoques de gorduras podem ser atribuídos ao menor gasto energético em animais que consumiram dieta hiperlipídica, uma vez que a exposição a essa dieta está relacionada à diminuição da mobilidade [23,24]. Adicionalmente, estudos prévios demonstraram que animais expostos a dieta hiperlipídica na adolescência apresentaram intolerância a glicose e resistência à insulina na vida adulta, podendo estar ligados a obesidade evidenciada pelo aumento do peso e estoques de gorduras, corroborando com nossos achados [18, 19].

O perfil lipídico desses animais corrobora com uma pesquisa anteriormente no qual mães ingeriram dieta rica em gordura durante a gestação e lactação, ao avaliar a prole, demonstraram um aumento dos triglicerídeos, assim como no colesterol LDL e também não houve diferença no colesterol total [25]. O consumo excessivo de ácidos graxos (gorduras saturadas) tem sido associados a níveis elevados de LDL (considerado um biomarcador de doenças cardiovasculares, porém relacionado a sequelas crônicas), no qual pode estar contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose resultando no desenvolvimento de doenças cardiovasculares [26].

Neste estudo, ratos adolescentes submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram aumento da PAS e PAD na idade adulta, corroborando com estudos de programação metabólica pela exposição materna, na gestação e lactação à dieta HF [25,27]. Já é bem discutido na literatura que o sobrepeso resulta no aumento do volume sanguíneo, porém, também podemos especular que esse insulto pode estar provocando alterações nos sistemas de controle periférico da PA que poderia estar contribuindo para a desregulação do controle autonômico e renal PA.

Este estudo aponta para a suscetibilidade da adolescência como uma janela crítica do desenvolvimento, capaz de programar para doenças tardiamente. Os mecanismos fisiopatológicos da SC ainda não estão claros, mas através deste estudo podemos sugerir que a ingestão elevada de dieta rica em gordura afeta a função do sistema cardiovascular e metabolismo a longo prazo. Adicionalmente, esses resultados apontam para a necessidade de estudos experimentais de intervenção e controle de dieta hiperlipídica neste período de vida visando prevenir a SC e DC tardias.

5. CONCLUSÃO

A exposição à dieta hiperlipídica em ratos Wistar na adolescência induz dislipidemia, alterações no gasto energético, obesidade, intolerância à glicose, resistência à insulina e hipertensão na vida adulta caracterizando a síndrome cardiometabólica.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

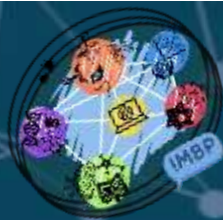
- [1] Kaur, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014 Mar 11; 2014: 1-21.
- [2] Vernochet C, Peres SB, Farmer SR. Mechanisms of obesity and related pathologies: transcriptional control of adipose tissue development. *FEBS Journal.* 2009 Agos 13; 276 (20): 5729-37.
- [3] Buijs, RM, Kreier F. The Metabolic Syndrome: A Brain Disease? *Neuroendocrinology Briefings. Journal of Neuroendocrinology.* 2006 Jul 28; 18 (9): 715–716
- [4] de Moura, EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 2005 Agos; 25 (3-4): 251–269.
- [5] Lopez-Jaramillo PV, Lahera V, Lopez JL. Epidemic of cardiometabolic diseases: a Latin American point of view. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2011 Mar 12; 5(2): 119-131.
- [6] Barker, DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *MRC Environmental Epidemiology Unit.* 1990 Nov 17; 301(67-61): 1111-1111.
- [7] Van den Bergh BR. Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. *Dev Med Child Neurol.* 2011 Feb 28; (53): 19-23.



VII XI *International Meeting of Biosciences and Physiopathology Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

- [8] Uauy R, Kain J, Corvalan C. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am J Clin Nutr.* 2011; (94):1759S–64S.
- [9] Widen E, Silventoinen K, Sovio U, Ripatti S, Cousminer DL, Hartikainen AL, et al. Pubertal timing and growth influences cardiometabolic risk factors in adult males and females. *Diabetes Care.* 2012; 35(4): :850–856.
- [10] De Oliveira, JC Lisboa, PC de Moura, EG Barella, LF Miranda, Malta A, et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol.* 2013; 216(2): 195–206.
- [11] De Belchior ACS, Angeli JK, de O. Faria T, Siman FDM, Silveira EA, Meira EF, et al. Post-weaning protein malnutrition increases blood pressure and induces endothelial dysfunctions in rats. *PLoS One.* 2012 Abr 18; 7(4): e34876.
- [12] Blakemore SJ, Choudhury S. Brain development during puberty: state of the science. *Dev Sci.* 2006; 9(1): 11-14.
- [13] Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, Balachandran AA, Jensen RI, Dekou V. et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol. J Physiol.* 2005 Maio 15; 565 (Pt 1): 171–184.
- [14] Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston, L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol.* 2004 Dez 1; 561 (Pt 2): 355-77.
- [15] Henry SL, Barzel B, Wood-Bradley RJ, Burke SL, Head GA, Armitage, JA. Developmental origins of obesity-related hypertension. *Clin Exp Pharmacol.* 2012 Jul 24; 39 (9): 799-806.
- [16] Wood-Bradley RJ, Henry SL, Vrsejka A, Newman V, Armitage JA. Maternal dietary intake during pregnancy has longstanding consequences for the health of her offspring. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013 Abr 17; 91: 412–420.
- [17] Barella L, de Oliveira J, Branco RC, Camargo R, Gomes R, Mendes FC, et al. Early exposure to a high-fat diet has more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in rats. *Horm Metab Res.* 2012 Mar 29; 44 (06): 458–464.
- [18] Gomes RM, Tófolo LP, Rinaldi W, Scomparin DX, Grassioli S, Barella LF, et al. Moderate exercise restores pancreatic Beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. *Cell Physiol Biochem.* 2013 Ago 5; 32 (2): 310-21.
- [19] Ibáñez, CA, Erthal RP, Ogo FM, Peres MNC, Vieira HR, Conejo C, et al. A High Fat Diet during Adolescence in Male Rats Negatively Programs Reproductive and Metabolic Function Which Is Partially Ameliorated by Exercise. *Front Physiol.* 2017 Nov 2; 8: 807.
- [20] Calegari V, Zoppi CC, Rezende L, Silveira L, Carneiro E, Boschero AC. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *The Journal of endocrinology.* 2011 Mar;208 (3): 257–264.
- [21] Reynolds C, Gray C, Li M, Segovia S, Vickers M. Early Life Nutrition and Energy Balance Disorders in Offspring in Later Life. *Nutrients.* 2015 Set 25; 7 (9): 8090-111.
- [22] Melo AM, Benatti RO, Ignacio-Souza LM, Okino C, Torsoni AS, Milanski M, et al. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism.* Maio de 2014; 63 (5): 682-92.
- [23] Hwang LL, Wang CH, Li TL, Chang SD, Lin LC, Chen CP, et al. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity (Silver Spring).* 2010 Mar; 18 (3): 463-9.
- [24] Wu H, Liu Q, Kalavagunta PK, Huang Q, Lv W, An X, et al. Normal diet Vs High fat diet - A comparative study: Behavioral and neuroimmunological changes in adolescent male mice. *Metab Brain Dis.* 2018 Feb; 33 (1): 177-190.
- [25] Barbosa CM, Figueiredo VP, Barbosa MA, Cardoso LM, Alzamora, AC. Maternal high-fat diet displayed disorders characteristic of metabolic syndrome that were transferred to first-and second-generation offspring. *Journal of Nutrition.* 2019 Out 31; 1-27.
- [26] Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM, et al. Dietary Fats and Cardiovascular Disease. *American Heart Association.* 201; 136 (3): e1-e23.
- [27] Zhang YP, Huo YL, Fang ZQ, Wang XF, Li JD, Wang HP, et al. Maternal high-fat diet acts on the brain to induce baroreflex dysfunction and sensitization of angiotensin II-induced hypertension in adult offspring. *J Physiol Heart Circ.* 2018 Maio 1; 314 (5): H1061-H1069.

*Abordagem imunogenética
em doenças crônicas e
infeciosas*



PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-SSP PARA GENOTIPAGEM DE SNPS NOS GENES *IL33* E *IL1RL1*

Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka¹; Josiane Bazzo de Alencar²; Leticia Cristina de Almeida Silva³; Cléverson de Oliveira e Silva⁴; Ana Maria Sell⁵; Quirino Alves de Lima Neto⁶

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Docente, Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, PR
e-mail: aleiayamanaka@hotmail.com

Palavras-chave: polimorfismo de nucleotídeo único; reação em cadeia da polimerase; padrões de referência.

1. INTRODUÇÃO

Existem vários mediadores imunológicos, dentre eles se destacam as citocinas. Um exemplo é a interleucina 33 (IL-33). A IL-33 é membro da família de interleucina 1 (IL-1) e é expressa em um grande número de células, como os macrófagos, células dendríticas, epiteliais, endoteliais, da musculatura lisa, osteoblastos, entre outra [1]. Essa citocina possui dupla função, atuando como um fator de transcrição e ação pró-inflamatória em caso de lesão nos tecidos. Apesar disso, a citocina sozinha não é capaz de desempenhar essa função, precisando estar ligada ao seu receptor IL1RL1, também conhecido como proteína ST2 [1]. O receptor é codificado pelo gene *IL1RL1*, e pode ser expressa de na forma solúvel (sST2) ou transmembranar (ST2L). Estudos demonstram que a sST2 compete com a proteína ancorada diminuindo a expressão de citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-5, e IL-13; e imunoglobulinas séricas, como IgA e IgE [2].

O SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) é uma variação na sequência do DNA que afeta somente uma base nitrogenada. Dentro de um gene, até milhares de SNPs podem ser identificados. Essas mutações podem alterar a sequência de aminoácidos e quantidade da proteína expressa, caso a mutação esteja em regiões codificantes e não codificantes, respectivamente [3,4]. No gene *IL33* os SNPs rs1929992 e rs7025417 se caracterizam pela troca de timina por citosina (T>C); no gene *IL1RL1*, o rs3821204 corresponde à troca de citosina por guanina (C>G) e rs11685424 à troca de guanina por adenina (G>A). Estes SNPs estão localizados em regiões não codificantes do gene.

Com o advento da biologia molecular, várias técnicas estão disponíveis para a detecção de SNPs. As técnicas mais usuais são PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR-SSP (*Sequence-Specific Primers*), SSOP (*Sequence-Specific Oligonucleotide Probes*), qPCR baseada em *TaqMan* e sequenciamento. Dentre as técnicas citadas, o PCR-SSP parece ser a mais barata, pois não exige enzimas de restrição, reagentes marcados com fluoróforos ou *probes* e equipamentos específicos. Quirino e colaboradores [5] compararam PCR-SSP com PCR-RFLP e concluíram que ambas as técnicas são confiáveis, porém a primeira demanda menos tempo, além de ser mais barata. Pensando nisso, o objetivo desse estudo foi padronizar a técnica de PCR-SSP para a genotipagem de quatro SNPs nos genes que codificam *IL33* e seu receptor *IL1RL1*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Parecer COPEP nº 719/2011 e 1.866.509/2016). As extrações de DNA foram realizadas pela técnica de *salting-out* modificada [6], seguindo Cardozo e colaboradores [7].

2.1. Design de primers:

Para o desenho dos *primers* foi realizado inicialmente a busca pela sequência FASTA para os genes *IL33* e *IL1RL1*, no Banco de Dados de Genomas (GeneBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Para as reações de PCR-SSP, foram desenhados dois *primers* específicos que diferem apenas no último nucleotídeo da posição 3', sendo um para o alelo selvagem



e o outro para o alelo mutado, combinado com um *primer* complementar comum. Já para a reação de sequenciamento os *primers* foram construídos de modo que a mutação de interesse ficasse localizada no meio da sequência amplificada.

Após, as sequências foram verificadas utilizando as ferramentas de bioinformática *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), *Multiple Primer Analyzer* (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>) e *OligoAnalyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>). Essas ferramentas permitem determinar a temperatura de *melting*, proporção de citosina/guanina, possibilidade de ampliações inespecíficas, *self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*. Foram escolhidas as sequências que melhor atendiam aos requisitos.

2.2. Reação de genotipagem por PCR-SSP e visualização do produto de PCR:

As genotipagens foram realizadas pela reação em cadeia da polimerase utilizando *primers* específicos (PCR-SSP). Para cada reação de amplificação foi utilizado um *primer* específico, combinado com um *primer* de uso comum. Além disso, foi adicionado um par de *primers* para o gene do hormônio de crescimento humano (*hGH*) que amplificou um fragmento de 434pb como controle interno da reação. As sequências dos *primers* para cada polimorfismo, bem como o tamanho do fragmento amplificado estão contidos na tabela 1. A amplificação foi realizada em termociclador (System 9700 Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados para as reações de PCR-SSP.

GENE	SNPs	Sequência selvagem / mutado	Alelo selvagem / mutado	Fragmento (pb)
IL33	rs1929992	5'- CATTTCCTCCCAAAATTTCAAT / C - 3'	Alelo T / C	155
		5'- AAGTCATCATCAACTTGGAAACC - 3'	Seq. Comum	
	rs7025417	5'- GTATAACAAAACAGTCTCAGAACT / C - 3'	Alelo T / C	322
		5'- ACTGTAGTCTTTTATCCCTTACC - 3'	Seq. Comum	
IL1RL1	rs3821204	5'- GCATGGTCCGTTCTATACC / G - 3'	Alelo C / G	128
		5'- AGTAGCACCTAGGATTTTCTCAC - 3'	Seq. Comum	
	rs11685424	5'- CAGTAACCTATGGAGGATGC / T - 3'	Alelo G / A	245
		5'- CTCCTGAGTAGCTTGGATTAG - 3'	Seq. Comum	

pb= pares de base

Cada SNPs foi trabalhado de forma independente do outro, porém foram feitas as mesmas etapas. Nos dois primeiros testes foram feitas duas reações simultaneamente, uma contendo apenas os *primers* que amplificam as regiões de interesse; outra reação apenas com *hGH*. Essa separação evita a competição entre *primers* e garante a qualidade do DNA *template*, uma vez que, devido às características da técnica de PCR-SSP o não aparecimento de uma banda pode ser confundido com falha na reação ou uma banda negativa.

A fim de determinar a melhor temperatura de anelamento dos *primers*, em um mesmo termociclador foi realizado um gradiente de temperatura, sendo 58 °C, 60 °C, 62 °C e 64 °C. Em seguida, foram testadas diferentes concentrações finais de MgCl₂, sendo 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM. Após determinar a melhor combinação da concentração de MgCl₂ e temperatura de anelamento foi realizado em uma única reação, agora contendo tanto os *primers* do polimorfismo, quanto o controle interno. Apenas para o rs7025417 foi preciso alterar a concentração dos *primers* utilizados. As melhores condições para cada SNP estão contidas na tabela 3.

Após cada teste, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY).

2.3. Reação de sequenciamento:

Como forma de validação da técnica, foram realizadas reações de sequenciamento para cada um dos quatro SNPs. As sequências dos *primers* para cada polimorfismo, bem como o tamanho do fragmento amplificado estão contidos na tabela 2. Como nas reações de genotipagem por PCR-SSP, cada SNP foi trabalhado de forma separada. Assim, a reação de amplificação teve volume final de 20,0 µL contendo 0,25 mM de *primers forward* e *reverse*, tampão 1 X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM cada dNTP, 0,5 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) e 50 ng de DNA, nas condições de ciclagem a 95 °C – 15 min, seguido de 30 ciclos à 95 °C – 30 s, 62 °C – 30 s, 72 °C – 30 s e a extensão final de 72 °C – 10 min. A visualização dos produtos de PCR se deu por meio de corrida de eletroforese à 150 W, 300 mA, 150 V por 10 min em gel de agarose 2%.



Após a primeira etapa de amplificação, foi realizada a purificação utilizando a enzima ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para esta etapa utilizou-se 0,5 X tampão de reação, 1 mM de cada *primer*, 2 µL de BigDye e 2 µL de DNA tratado, como volume final de 10,0 µL, submetidos nas condições de ciclagem a 95°C – 1 min, seguido de 25 ciclos à 96 °C – 10 s, 50 °C – 5 s, 60 °C – 2 min. A etapa de precipitação para a retirada do ddNTPs não incorporados foi realizada segundo recomendações do fabricante, utilizando solução de EDTA 125 mM (pH=8) e etanol absoluto.

Tabela 2. Sequência de primers utilizados para as reações de sequenciamento.

GENE	SNPs	Sequência	Fragmento (pb)
IL33	rs1929992	5'- AAGTCATCATCAACTTGAAC- 3'	381
		5'- GTAGCAGTCCCAAGTCTGTGTCT- 3'	
IL33	rs7025417	5'- ATATGGGCACACTGATATTG- 3'	460
		5'- ACTGTAGTCTTTTATCCCTTACC- 3'	
IL1RL1	rs3821204	5'- AGTAGCACCTAGGATTTTCTCAC- 3'	368
		5'- TCTGATCTTTGTAGACTGTT- 3'	
	rs11685424	5'- TATCTCAGGTGGTTGTAATA- 3'	514
5'- CTCCTGAGTAGCTTGGATTAG- 3'			

pb= pares de base

2.4. Análise das sequências:

Os genótipos foram determinados pela comparação entre o alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas pelo sequenciamento com as sequências já conhecidas dos genes de *IL33* e *IL1RL1* depositadas no Genbank. Para estas análises foram utilizadas a ferramenta online EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) e o programa FinchTV versão 1.4.0.

2.5. Avaliação do equilíbrio de Hardy-Weiberg (EHW):

Como uma segunda forma de garantir a eficiência da metodologia de PCR-SSP, foi realizado um estudo da frequência dos genótipos observados pela técnica. Para isso, foram testados 103 indivíduos de ambos os sexos, e sem parentesco, utilizado o *software* SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php>) com intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Padronização da reação de genotipagem para SNPs de *IL33*:

Para ambos os SNPs de *IL33*, rs1929992 e rs7025417, o volume final da reação foi de 10,0 µL contendo tampão 1 X, 0,2 mM cada dNTP, 0,5 U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) e 50 ng de DNA. Para rs1929992 foi utilizado 0,25 mM de *primers forward* e *reverse*, 0,1 mM de *primers hGH*, 1,0 mM MgCl₂ (para o alelo T) ou 1,5 mM MgCl₂ (para o alelo C), com ciclagem a 95 °C – 15 min, seguido de 30 ciclos à 95 °C – 30 s, 62 °C – 30 s, 72 °C – 30 s e a extensão final de 72 °C - 10 min. Para rs7025417 utilizou-se 0,5 mM de *primers forward* e *reverse*, 0,08 mM de *primers hGH*, e 1,5 mM MgCl₂. A temperatura de anelamento foi alterada para 64 °C. O resumo das reações de amplificações está contido na tabela 3.

Tabela 3. Concentrações finais dos componentes da PCR para a detecção dos polimorfismos de *IL33* (rs1929992 e rs7025417) e *IL1RL1* (rs3821204 e rs11685424).

Reagentes da PCR	Concentração Final			
	rs1929992	rs7025417	rs3821204	rs11685424
Água de injeção	q.s.p. 10	q.s.p. 10	q.s.p. 10	q.s.p. 10
Tampão de reação	1 X	1 X	1 X	1X
MgCl ₂	1,0 mM ou 1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,0 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
<i>Primer forward/reverse</i>	0,25 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,25 mM
<i>hGH forward/reverse</i>	0,1 mM	0,08 mM	0,1 mM	0,1 mM
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
DNA	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng

q.s.p. 10= quantidade suficiente para 10 µL



3.2. Padronização da reação de genotipagem para SNPs de *IL1RL1*:

Para os SNPs de *IL1RL1*, rs3821024 e rs11685424, o volume final da reação foi de 10,0 µL contendo 0,25 mM de *primers forward* e *reverse*, 0,1 mM de *primers hGH*, tampão 1X, 0,2 mM cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) e 50 ng de DNA, 1,5 mM MgCl₂ (para rs3821204) e 1,0 mM MgCl₂ (para rs11685424). As condições de ciclagem foram 95 °C – 15 min, seguido de 30 ciclos à 95 °C – 30 s, 62 °C – 30 s, 72 °C – 30 s e a extensão final de 72 °C – 10 min. O resumo das reações de amplificações está contido na tabela 3.

A visualização do produto de PCR se deu com a corrida em gel de agarose. Para os SNPs rs1929992, rs3821204, rs11685424, utilizou gel de concentração 2% a 150 V – 300 mA – 150 W por 10 min. Já para o rs7025417 foi usado a mesma concentração do gel, porém à 120 V – 300 mA – 100 W por 20 min. As bandas foram analisadas por comparação com um marcador de tamanho molecular de 100pb. O padrão de bandas para cada SNP está sendo mostrado na figura 1.

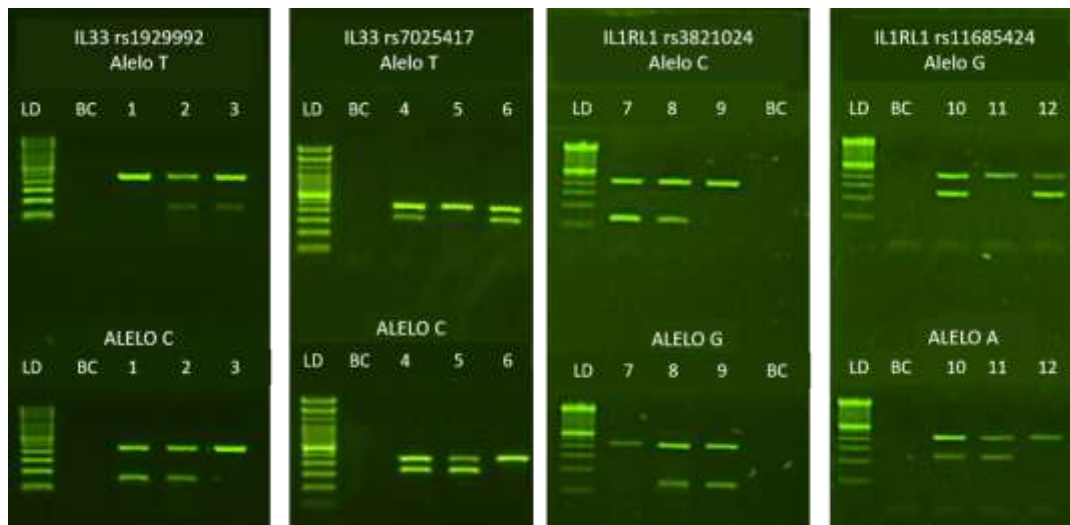


Figura 1. produtos de PCR visualizados por separação eletroforética em gel de agarose. As bandas de maior peso molecular representam o controle interno da reação (*hGH*); seguido dos alelos. Os poços 1,2 e 3 possuem genótipo C/C, T/C e T/T, respectivamente (rs1929992); poços 4,5 e 6 possuem genótipos T/C, C/C e T/T, respectivamente (rs7025417); poços 7, 8 e 9 possuem genótipo C/C, C/G e G/G, respectivamente (rs3821204); poços 10, 11, e 12, possuem genótipos G/A, A/A e G/G, respectivamente (rs11685424). LD= *ladder* 100pb; BC= Reação branco contendo água ao invés de DNA.

3.3. Comparação entre a técnica de PCR-SSP x Sequenciamento:

A validação da técnica de PCR-SSP foi feita usando a metodologia de sequenciamento, o qual utiliza-se de ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados) que impede a incorporação de novos nucleotídeos na porção 3' da fita de DNA, formando cadeias truncadas [8]. Com PCR-SSP foi determinado um representante genotípico de cada SNP, ou seja, amostras que expressam o genótipo homocigoto selvagem, mutante e um heterocigoto. Com base nisso, as mesmas foram sequenciadas. Utilizando *softwares* e programas específicos para essas análises, 100% dos genótipos observados pela técnica de PCR-SSP foram confirmadas com o sequenciamento. Alguns exemplos de eletroferograma encontrados após o sequenciamento estão reunidos na figura 2.

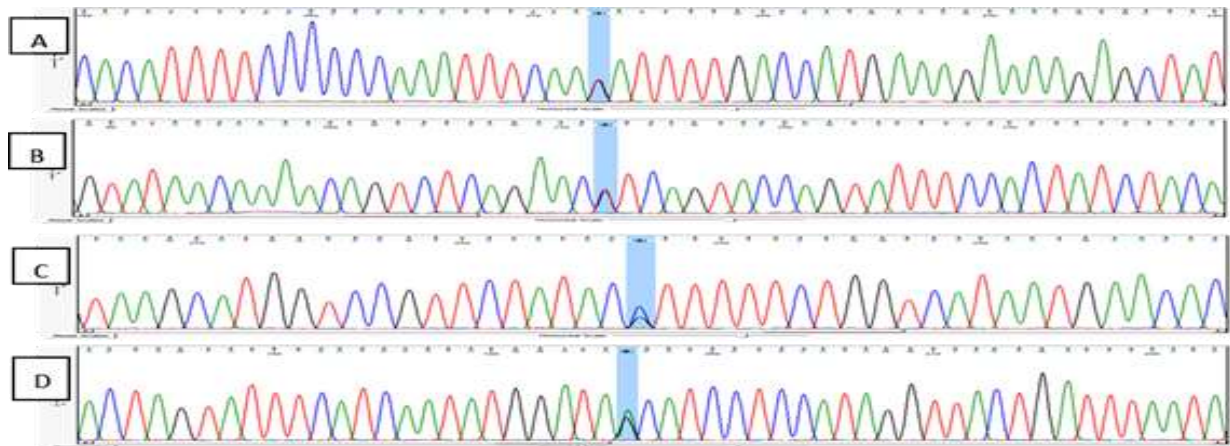
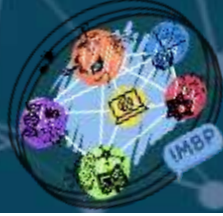


Figura 2. Eletroferogramas mostrando a sequência de nucleotídeos obtidos na reação de sequenciamento utilizando primers forward. Todos com genótipo heterozigoto. As faixas azuis estão marcando o local da mutação de cada polimorfismo. As imagens A, B, C e D correspondem aos SNPs rs1929992, rs7025417, rs3821204, e rs11685424, respectivamente.

3.4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW):

Entre os participantes do estudo, 69 indivíduos pertenciam ao sexo feminino e 34 ao sexo masculino, totalizando 103 participantes (N=103). Para o rs1929992, as frequências dos genótipos, C/C, T/C e T/T foram 16%, 46% e 38%, respectivamente; para o rs7025417 as frequências dos genótipos C/C, T/C e T/T foram 1%, 27% e 72%, respectivamente; para o rs3821204 os genótipos C/C, C/G e G/G foram 64%, 30%, e 6%, respectivamente; para o rs11685424 os genótipos A/A, G/A e G/G foram 21%, 55%, e 24%, respectivamente. A média de idade foi de 45,54 ±8,38. As amostras para os quatro SNPs, rs1929992, rs7025417, rs3821204 e rs11685424 se encontravam em EHW ($P=0,68$; $P=0,69$; $P=0,37$; $P=0,43$, respectivamente).

4. DISCUSSÃO

Polimorfismos genéticos são muito comuns dentro do genoma humano. Essas variantes genéticas podem ser oriundas de STR (*Short Tandem Repeats*), INDELS (*Insertion-Deletion Mutations*), microsatelites, e SNPs. O último é a fonte mais abundante de alterações, por isso é largamente estudada em associação com doenças [9]. Atualmente, com advento da biologia molecular, é possível determinar de forma confiável, as variantes alélicas nos SNPs usando técnicas baseadas em PCR.

Apesar disso, falhas na detecção dessas mudanças são possíveis, sendo as causas mais frequentes: erros humanos durante a manipulação de amostras, reagentes ou equipamento; contaminações; ou amplificação de bandas inespecíficas [10]. O aparecimento de bandas inespecíficas pode ser causado devido à ciclagem incorreta, com baixa temperatura de anelamento ou elevado número de ciclos, construção de primers ineficientes ou alta concentração de $MgCl_2$ [11]. Visto a variedade de fatores que afetam a eficiência da reação, é essencial a padronização de técnicas que estabeleçam e garantam a qualidade e reprodutibilidade dos resultados.

A validação dos genótipos obtidos por PCR-SSP foi feita usando a técnica de sequenciamento baseada em Sanger [12]. Os autores apresentaram umas das primeiras abordagens para desvendar sequências de nucleotídeos de DNA. Atualmente a técnica sofreu algumas modificações, os fragmentos são lidos de forma automatizada por eletroforese capilar. Mesmo com essas melhorias, estudos apontam que fragmentos de até 1000pb podem ser definidos com qualidade, com confiabilidade de 99,99% [13]. Para a validação de nossos resultados, esse fator não foi problemático, pois os tamanhos dos fragmentos dos quatro SNPs não ultrapassaram 514pb (tabela 2).

Devido às características da técnica de sequenciamento, os nucleotídeos das extremidades da sequência são inviabilizados, pois dificulta a leitura de forma precisa. Pensando nisso, os primers utilizados nesse estudo, foram desenhados de forma que o local da mutação permaneça mais ao centro da sequência. Assim, anularia esse fator, dando mais credibilidade aos achados.

Todos os polimorfismos analisados se encontravam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$). A análise do EHW estabelece padrões de comportamento gênico ao longo das gerações. Em estudos do tipo caso-controles é comum a abordagem do EHW, uma vez que o grupo controle deve espelhar a população geral. Xu e colaboradores [14] sugerem que o desvio no EHW pode ser proveniente de erros durante a genotipagem do SNPs, sendo assim a técnica empregada deve ser



evitada. Estudos que relatam populações controles fora do EHW são mais propensos a apresentar falsas associações entre doenças e SNPs [15]. Em vista disso, garantir que as amostras estudadas estão dentro do EWH confirma a confiabilidade da técnica.

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que foi possível padronizar a técnica de PCR-SSP para a determinação dos genótipos nos SNPs de *IL33* rs1929992 e rs7025417; *IL1RL1* rs3821204 e rs11685424. Por este ser um trabalho preliminar poucas amostras foram sequenciadas para cada SNP, desta forma mais testes são necessários. Em uma segunda etapa, escolher de forma aleatória amostras com o genótipo conhecido e confirmar com o sequenciamento será de grande valia

FINANCIADORES

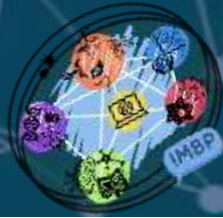
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001) e Laboratório de Imunogenética da UEM (Proc. nº. 1589/2017-CSD-UEM).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os participantes por sua preciosa contribuição ao estudo e a todos os membros do LIG-UEM.

REFERÊNCIAS

- [1] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479–90.
- [2] Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S-I. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*. 2007;282(36):26369–80.
- [3] Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*. 1992;90(1–2):41–54.
- [4] In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, et al. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest*. 1997;99(5):1130–7.
- [5] Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41(1):44–9.
- [6] John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(2):408.
- [7] Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, de Melo FC, Braga MA, De Souza C, et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):651–6.
- [8] Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 4th ed. Garland Science. New York; 2010.
- [9] Franceschi DAS, Viel DO, Sell AM, Tsuneto LT, Visentainer JEL. Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de *tnf* e *IL2*. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(4):241–6.
- [10] Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(2):87–91.
- [11] Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1st ed. London; 1990. 482 p.
- [12] Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463–7.
- [13] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Vol. 26, *Nature Biotechnology*. 2008. p. 1135–45.
- [14] Xu J, Turner A, Little J, Bleeker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: Hint for genotyping error? *Hum Genet*. 2002;111(6):573–4.
- [15] Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol*. 1999;149(8):706–11.



TNF- α and IL-17 CYTOKINES LEVELS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS AFTER ANTI-TNF THERAPY

Fernanda F. Lara-Armi¹, Jeane E. L. Visentainer²; Victor H. Souza¹, Marco A. Rocha-Loures¹, Janisleya S. F. Neves¹, Ricardo A. Moliterno², Matheus Braga¹; Mariana de Souza Terron-Monich²; Ana M. Sell²

¹ Postgraduate student, Post Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR.

² Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR.
e-mail: fernandauem@hotmail.com

Key-words: genetic association studies; polymorphism, genetic; spondylitis, ankylosing.

1. INTRODUCTION

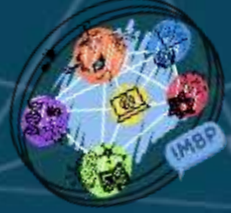
Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory autoimmune disease that affects spine joints, sacroiliac joints and tissues, such as tendons and ligaments [1]. The pathogenesis of AS is still unclear and several mechanisms have been proposed to elucidate it, involving HLA-B27, endoplasmic reticulum aminopeptidases (ERAP) 1 and 2, disorder of the IL-23/IL-17 axis and the abnormality of peptides that induce lymphocyte activation and differentiation. All of these mechanisms lead to the production of cytokines that influence the pathogenesis of AS [1], including TNF- α (tumor necrosis factor alpha) and Interleukin (IL)-17A and IL-17F [2, 3]. Elevated levels of these cytokines have been found in AS patients [4].

The IL-23/IL-17 axis has been widely studied among researchers and considered a key axis in this disease. Th17 cells are induced by IL-23 and are the most common class of IL-17-producing adaptive lymphocytes [2]. The proinflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β is required to Th17 differentiation and studies have demonstrated an increase production of this cytokines in AS patients compared with normal subjects. By binding to the IL-17R, IL-17 stimulates the production of transcription factors that induce the transcription of several genes, including those of inflammatory cytokines such as TNF, IL-6, IL-8 IL1 β , G-CSF, GM-CSF. These cytokines act synergic with IL-17 resulting in a potent inflammatory effect [5, 6]. IL-17 is also produced by CD8 lymphocytes and by tissue-resident innate cells such as NK, NKT, T $\gamma\delta$, and ILC3 lymphocytes after activation. The Th17 cells have also the capability to produce the anti-inflammatory cytokine, IL-10 [5].

The IL-17 family of cytokines consists of 6 proteins (IL-17A to IL-17F) and IL-17A and IL-17F appears to be a crucial pathogenic molecule in chronic inflammatory diseases, including AS [5]. A previous study by our group showed that *IL17A* GA/AA and *IL17F* TC/CC genotypes are associated with AS independent of gender and HLA-B27 [7]. Previous studies also show that genetic polymorphisms of *IL17A* G197A and *IL17F* T7488C affect the production of IL-17A and IL-17F, respectively [8, 9].

TNF- α has been reported to be the main cytokine contributing to the early AS disease [3] and has been associated with AS in several studies [10-12]. Elevated levels of this pro-inflammatory cytokine are associated with tissue destruction and cachexia, being considered the major mediator of acute and chronic inflammation [3]. The single nucleotide polymorphism of the promoter region of the TNF gene, *TNF-308 G>A* (rs18000629), have been associated with AS patients, and it appears to influence their TNF serum level [13, 14]. It was also previously demonstrated by our group that this polymorphism is associated to AS, where higher frequency of *TNF-308 GA/AA* genotype were found in AS patients. This association was independent of *HLA-B*27* [7].

Improvements in our understanding of the pathogenesis of AS have allowed the development of drugs aimed at specific biological targets that can interfere with different stages of the immune cascade. The treatment involves nonsteroidal anti-inflammatory medications (NSAIDs), anti-TNF- α drugs (anti-TNF), non-TNF biologics inhibitors, methotrexate, and sulfasalazine. Anti-TNF drugs, such as infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab and certolizumab are widely used to treatment of this disease by binding to both TNF- α , membrane-bound and soluble [12, 15]. Although successful, 30-40% of patients with spondyloarthropathies do not respond or respond inadequately to this therapy [16].



Even though the pathogenesis of AS involves mainly immune T cells, research continues to explore the role of different cytokine levels to predict disease occurrence, development and severity [1]. Therefore, the aim of this study was to evaluate TNF- α , IL-17A and IL-17F levels in the serum of AS patients after anti-TNF therapy.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sample selection

A total of 65 patients with AS were included in this case-control study. The AS patients were diagnosed through clinical, laboratory and radiological criteria according to the ASAS 2009/2011 criteria [17, 18] by the rheumatologists from the Maringá University Hospital and all patients had a follow-up with the same rheumatologists. The use of anti-TNF therapy was previously considered for 51 patients with an active and severe disease, clinically defined as BASDAI ≥ 4 , and with therapeutic failure, with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) or disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) as methotrexate, sulphasalazine, or leflunomide. These patients were classified according to the clinical response to treatment in two groups. Those who had BASDAI < 4 after anti-TNF therapy were classified as responder and those who were classified as BASDAI ≥ 4 after at least six months using anti-TNF therapy were classified as non-responders. Fourteen AS patients with BASDAI < 4 and without NSAIDs, DMARDs or biologics treatments were classified as AS control group. Afterwards, responders, non-responders and AS control groups were further stratified in *HLA-B*27* positive and *HLA-B*27* negative groups. The evaluation of the clinical disease activity index BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) was performed by the same rheumatologists according to criteria previously defined [19]. The scores were defined from the visual analogical scale as 0 to 10 (0 = good; 10 = bad): scores < 3.99 indicated good clinical activity and > 4.0 high clinical activity. In addition, fifteen individuals without AS were included in the control group who was selected by the same rheumatologists after clinical, laboratory and radiological analyses. The non-inclusion criteria for patients and controls were individuals with chronic diseases such as diabetes and other inflammatory and autoimmune diseases. The number of individuals were different for the analyzed cytokines. All participants were from the northwestern region of Paraná, southern Brazil (22°29'30"-26°42'59"S and 48°02'24"-54°37'38"W) and classified as mixed ethnicity, with predominantly European origin, based on ethnic constitution of Paraná, as previously described [20] and confirmed for our region [21]. This study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Maringá (UEM), number CAEE 27723114. All participants signed the consent form.

2.2. Sample collection

The peripheral blood was collected from individuals in 5 ml tubes without anticoagulants and the serum samples were kept at -80°C until analysis. Serum levels of TNF-alpha (tumor necrosis factor alpha) were determined in patients and controls using Luminex technology with the ProcartaPlex™ Immunoassay (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Inc., Burlington, Ontario, Canada) and the serum levels of IL-17A and IL-17F were performed by the immunoenzymatic assay method (ELISA), with the Human IL-17 platinum ELISA kit (affymetrix eBioscience, North America, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Samples were performed in duplicate. The minimum detectable concentrations for cytokines were: TNF- α , 8.59 pg/ml; IL-17A, 0.5 pg/ml; and IL-17F, 3.3 pg/ml.

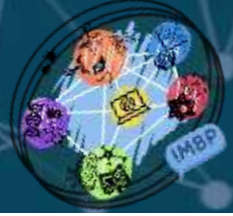
The *TNF-308* (rs1800629), *IL17A* (rs2275913) and *IL17F* (rs763780) genotyping was previously described and validated [7].

2.3. Statistical analyses

The data were analyzed by the software R using the Shapiro Wilk test for normality testing and Mann-Whitney *U* test for comparison of cytokines concentrations between groups. The analyses were done between: responders vs. non-responders, responders vs. AS controls, responders vs. healthy controls, non-responders vs. AS controls and AS controls vs. healthy controls. The correlations between *TNF308* (rs1800629), *IL17A* (rs2275913) and *IL17F* (rs763780) genotypes and cytokines concentration were made for responders, non-responders, AS controls and healthy controls. Samples with cytokine concentrations below of the sensitivity level of the test were excluded from analyses, consequently the number of samples is different for each analyzed cytokine. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS

The cytokine levels in serum of AS patients and controls were shown in table 1. The cytokine levels in serum of patients who were stratified in *HLA-B*27* positive responders, non-responders and AS control groups were shown in table 2, and those who were stratified as *HLA-B*27* negative were shown in table 3.



The non-responders group presented higher TNF- α serum levels (median=5.05 pg/ml) than AS controls (median=1.39 pg/ml) ($P=0.01$) and healthy controls (median=1.39 pg/ml) ($P=0.01$). Although lower TNF- α concentration was found for the responders group (median=2.14 pg/ml) when compared to AS non-responders, statistical difference was not found. The stratification of AS responders group into *HLA-B*27* positive and negative resulted in a low sample numbers making impossible to apply statistical analysis. In AS *HLA-B*27* positive group, we observed a trend toward higher TNF- α concentrations in non-responders group (median=5.00 pg/ml) compared to healthy control (median=1.39 pg/ml) ($P=0.08$). For AS *HLA-B*27* negative patients no statistical difference in cytokine concentration was found.

Regarding IL-17A cytokine, the non-responders group presented lower IL-17A serum levels (median=6.81 pg/ml) than healthy controls (median=26.41 pg/ml) ($P=0.04$). The IL-17A serum levels were similar in the AS responder group (median=26.66 pg/ml), AS controls (median= 14.06 pg/ml) and healthy controls. After stratifying AS patients in *HLA-B*27* positive and negative, IL-17A presented similar serum levels in the groups.

Table 1. Cytokine levels in serum of AS patients after anti-TNF therapy and controls

Cytokines	Responders	Non-responders	AS controls	Healthy controls	P value
TNF- α	N=5 2.14 (1.39- 2.89)	N=15 5.05 (1.39 - 31.14)	N=14 1.39 (1.00 - 11.30)	N=15 1.39 (0.33 - 7.24)	0.01 ^{ab}
IL-17A	N=22 26.66 (0.18 - 198.29)	N=23 6.81 (0.29 - 191.55)	N=13 14.06 (1.61 - 247.38)	N=15 26.41 (0.18 - 179.72)	0.04 ^b
IL-17F	N=9 429.23 (0.59 - 1978.32)	N=9 37.41 (1.5 - 1742.86)	N=7 411.50 (1.95 - 1833.77)	N=11 71.05 (1.5 - 1969.68)	0.23

Data are expressed as median (range: minimum-maximum) and pg/mL. N: number of individuals. NP: not performed, insufficient N for statistical analysis. AS: Ankylosing spondylitis

^aNon-responders vs. AS control; ^bNon-responders vs. Healthy controls;

Table 2. Cytokine levels in serum of AS *HLA-B*27* positive patients after anti-TNF therapy and controls

Cytokines	Responders	Non-responders	AS controls	Healthy controls	P value
TNF- α	NP	N=8 5.00 (1.39- 25.94)	N=8 1.39 (1.39- 2.89)	N=15 1.39 (0.33- 7.24)	0.08 ^a
IL-17A	N=4 14.49 (0.75 - 48.23)	N=11 32.69 (0.29- 191.55)	N=6 16.38 (22.12 - 247.38)	N=15 26.41 (0.18- 179.72)	0.60
IL-17F	NP	N=7 21.96 (1.5- 1742.86)	N=4 861.27 (37.41- 1833.77)	N=10 161.05 (1.5- 1969.68)	0.10

Data are expressed as median (range: minimum—maximum) and pg/mL. N: number of individuals. NP: not performed, insufficient N for statistical analysis.

^aNon-responders vs. Healthy controls.

IL-17F cytokines presented similar levels in responders, non-responders, AS controls and healthy control groups. The stratification of AS responder group into *HLA-B*27* positive resulted in a low sample numbers making impossible to apply statistical analysis. The non-responders, AS controls and healthy controls group presented the similar levels of IL-17F. The stratification of AS non-responder and AS controls group into *HLA-B*27* negative resulted in a low sample numbers making impossible to apply statistical analysis. The responders *HLA-B*27* negative group presented similar levels to Healthy control group.

The *TNF-308* (rs18000629) *IL17A* (rs2275913) and *IL17F* (rs763780) genotyping for all individuals was previously performed (7). The correlation between *TNF-308* (rs18000629) genotypes and TNF- α serum levels was conducted for non-responders, AS control, and healthy control and were



shown in table 4. No correlation was found between genotypes and cytokine levels. The correlation between *IL17A* (rs2275913) and *IL17F* (rs763780) genotypes with IL-17A and IL-17 serum levels were conducted for responders, non-responders, AS control, and healthy control. No correlation was found between genotypes and cytokine levels for *IL17A*. For *IL17F* the responders and AS control group presented insufficient number of individuals for statistical analysis and for healthy control group the T/T genotype presented lower serum levels than T/C + C/C genotypes.

Table 3. Cytokine levels in serum of AS *HLA-B*27* negative patients anti-TNF therapy and controls.

Cytokines	Responders	Non-responders	AS controls	Healthy controls	P value
TNF- α	NP	N=7 5.05 (1.39 - 31.14)	N=6 1.39 (1.00 - 11.30)	N=15 1.39 (0.33 - 7.24)	0.13
IL-17A	N=18 31.69 (0.18 - 198.29)	N=12 6.43 (0.75 - 62.86)	N=7 14.06 (4.75 - 170.98)	N=15 26.41 (0.18 - 179.72)	0.08
IL-17F	N=8 460.14 (9.23 - 1978.32)	NP	NP	N=10 161.05 (1.5- 1969.68)	0.32

Data are expressed as median (range: minimum—maximum) and pg/mL. N: number of individuals. NP: not performed, insufficient N for statistical analysis. AS: Ankylosing spondylitis

Table 4. Correlation between *TNF-308* (rs18000629), *IL17A* (rs2275913) and *IL17F* (rs763780) genotypes and TNF- α , IL-17A and IL-17F serum levels in AS patients after anti-TNF therapy.

Groups	Allele genotype						P value
	<i>TNF-308</i> (rs18000629)		<i>IL17A</i> (rs2275913)		<i>IL17F</i> (rs763780)		
	G/G	G/A + A/A	G/G	G/A + A/A	T/T	T/C + C/C	
Responders	NP	NP	N=7 4.46 (0.18- 123.61)	N=15 27.32 (0.75- 198.29)	N=6 386.27 (0.59- 1978.32)	NP	0.24
Non-responders	N=7 4.32 (1.39- 31.14)	N=8 6.11 (1.39-15.34)	N=7 42.98 (1.26- 72.35)	N=16 6.43 (0.29- 191.55)	N=4 29.68 (1.5-45.14)	N=5 100.14 (5.14- 1742.86)	0.28
AS control	N=8 1.39 (1.00- 2.88)	N=5 1.39 (1.39-11.29)	N=8 15.63 (1.89- 188.35)	N=5 14.06 (1.61- 247.38)	N=6 224.45 (1.95- 1771.95)	NP	0.66
Healthy control	N=8 1.39 (0.33- 7.24)	N=7 2.00 (0.33-6.90)	N=5 22.35 (0.52-57.32)	N=10 67.86 (0.41- 179.72)	N=5 6.05 (1.5- 251.04)	N=5 570.14 (71.04- 1969.68)	0.02 ^a

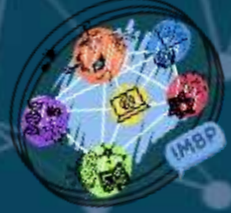
Data are expressed as median (range: minimum-maximum) and pg/mL. N: number of individuals. NP: not performed, insufficient N for statistical analysis.

^a *IL17F* (rs763780) T/T vs. T/C + C/C.

4. DISCUSSION

There is a great interest in elucidating the possible pathways that lead to the pathogenesis of AS, leading to the discovery of new targets and therapeutic agents for its treatment [22].

Our results suggest that the TNF- α could be involved in the immunopathogenesis and clinical course of the AS disease because higher levels of this cytokine were found in patients with worse disease activity. The anti-TNF therapy did not contribute to reducing TNF- α levels in some patients, especially in AS non responder group. Moreover, we observed a trend toward higher TNF- α concentrations in *HLA-B*27* positive in non-responder group compared to healthy control. Early stages of AS are featured by a strong inflammatory process and TNF- α is believed to be the main cytokine contributing to the early disease [3]. TNF- α has been associated with AS in several studies. Gonzalez-Lopez et al. (2017) found that AS patients with BASDAI >4 presented elevated levels of TNF- α compared to controls; and 29% of them were undergoing anti-TNF therapy [10]. Limón-Camacho et al. (2012) found that TNF- α was elevated in AS patients with BASDAI \geq 6 in comparison with responders patients



to anti-TNF therapy and controls [11]. It is known that the use of anti-TNF therapy in AS patients reduced the severity of disease symptoms [3], however, a considerable number of patients do not perceived clinical benefit [12]. Our finds are in agreement with these studies because we find higher concentration of TNF- α in patients with BASDAI >4 (non-responders group) and also some patients do not enter in disease remission when treated with anti-TNF, suggesting that TNF- α may play a pathogenic role in AS.

The *TNF-308 G>A* single nucleotide polymorphism occurs when there is a substitution of guanine (G) for adenine (A) within this regulatory region [14, 23, 24] and this alteration leads to increased production of TNF- α [14, 23]. A previously study of our group have demonstrated that the *TNF-308* genotypes related to the higher production of TNF- α cytokine (GA/AA) were associated with AS, independent of *HLA-B*27* [7]. In this study we evaluated *TNF-308* genotypes with cytokine serum level in patients with AS after anti-TNF therapy, but no correlation was found probably due to small number of samples.

Although serum levels of IL-17A and IL-17F were apparently elevated in responders and AS control compared to controls, no statistical difference was observed. The non-responders group presented lower levels of IL-17A compared to controls and similar levels of IL-17F when compared to controls. Contrary to expectation, IL-17A and IL-17F were not elevated in non-responders group, patients with active AS. The analyze of these data should be made with care and we should consider that IL-17 is a TNF inducer that could lead to increased TNF production and a possible better response to TNF blockade [25]. The levels of IL-17A appears not be influenced by *HLA-B*27*. This analysis could not be performed for IL-17F because after stratification in *HLA-B*27* positive there was insufficient number of individuals for statistical analysis for responders group and the same occurs with non-responder and AS control group after stratification in *HLA-B*27* negative.

A previously study of our group have demonstrated that the *IL17A GA/AA*, and *IL17F TC/CC* genotypes, related to influence IL-17A and IL-17F production [8, 9], were associated with AS, independent of *HLA-B*27* [7]. In our study no correlation was found for *IL17A G197A* and IL-17A levels in the analyzed groups. The correlation of *IL17F T7488C* and IL-17F levels was not performed for responder and AS control group because the number of individuals were insufficient for statistical analysis. The genotype influenced cytokine production only in the control group that the *IL17F T/T* genotype presented lower levels of IL-17F compared to T/C + C/C genotype.

5. CONCLUSIONS

The anti-TNF therapy did not contribute to reducing TNF- α levels in some patients. TNF- α was found in higher concentration in AS patients with higher disease activity index, even after anti-TNF therapy. The cytokines IL-17A and IL-17F were not influenced by TNF blockade in AS patients.

FUNDING STATEMENT

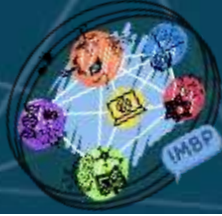
This work is supported by the Laboratory of Immunogenetics of State University of Maringá (LIG-UEM; 1589/2007-CSD-UEM).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank everyone for participating in the study: patients and controls, the Laboratory of Immunogenetics of the State University of Maringá, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária do Estado do Paraná (#2015/0310).

REFERENCES

- [1] Zhu W, He X, Cheng K, Zhang L, Chen D, Wang X, et al. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone Res.* 2019;7:22.
- [2] Ranganathan V, Gracey E, Brown MA, Inman RD, Haroon N. Pathogenesis of ankylosing spondylitis - recent advances and future directions. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(6):359-67.
- [3] Lata M, Hettinghouse AS, Liu CJ. Targeting tumor necrosis factor receptors in ankylosing spondylitis. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1442(1):5-16.
- [4] Park MC, Lee SW, Choi ST, Park YB, Lee SK. Serum leptin levels correlate with interleukin-6 levels and disease activity in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 2007;36(2):101-6.
- [5] Ruiz de Morales JMG, Puig L, Dauden E, Canete JD, Pablos JL, Martin AO, et al. Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: An updated review of the evidence focusing in controversies. *Autoimmun Rev.* 2020;19(1):102429.
- [6] Wen JT, Zhang DH, Fang PF, Li MH, Wang RJ, Li SH. Role of Th1/Th2 cytokines in the diagnosis and prognostic evaluation of ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res.* 2017;16(1).



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

- [7] Rocha Loures MA, Macedo LC, Reis DM, Oliveira CF, Meneguetti JL, Martines GF, et al. Influence of TNF and IL17 Gene Polymorphisms on the Spondyloarthritis Immunopathogenesis, Regardless of HLA-B27, in a Brazilian Population. *Mediators of inflammation*. 2018;2018:1395823-.
- [8] Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2011;6(10):e26229.
- [9] Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(4):795-801.
- [10] Gonzalez-Lopez L, Fajardo-Robledo NS, Miriam Saldaña-Cruz A, Moreno-Sandoval IV, Bonilla-Lara D, Zavaleta-Muñiz S, et al. Association of adipokines, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α concentrations with clinical characteristics and presence of spinal syndesmophytes in patients with ankylosing spondylitis: A cross-sectional study. *The Journal of international medical research*. 2017;45(3):1024-35.
- [11] LimÓN-Camacho L, Vargas-Rojas MI, VÁZquez-Mellado J, Casasola-Vargas J, Moctezuma JF, Burgos-Vargas R, et al. *In Vivo* Peripheral Blood Proinflammatory T Cells in Patients with Ankylosing Spondylitis. *The Journal of Rheumatology*. 2012;39(4):830.
- [12] Pedersen SJ, Maksymowych WP. Beyond the TNF- α Inhibitors: New and Emerging Targeted Therapies for Patients with Axial Spondyloarthritis and their Relation to Pathophysiology. *Drugs*. 2018;78(14):1397-418.
- [13] Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 2000;12(2):110-9.
- [14] Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3195-9.
- [15] Rubbert-Roth A, Atzeni F, Masala IF, Caporali R, Montecucco C, Sarzi-Puttini P. TNF inhibitors in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis: Are they the same? *Autoimmun Rev*. 2018;17(1):24-8.
- [16] Menegatti S, Bianchi E, Rogge L. Anti-TNF Therapy in Spondyloarthritis and Related Diseases, Impact on the Immune System and Prediction of Treatment Responses. *Frontiers in immunology*. 2019;10:382-.
- [17] Rudwaleit M, Landewe R, Van der Heijde D, Listing J, Brandt J, Braun Jv, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(6):770-6.
- [18] Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewé R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):25-31.
- [19] Torres TM, Ciconelli RM. Instrumentos de avaliação em espondilite anquilosante. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2006;46:52-9.
- [20] Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de ODMM, Visentainer JE, Tsuneto LT, et al. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. *Hum Biol*. 2000;72(4):597-617.
- [21] Reis PG, Ambrosio-Albuquerque EP, Fabreti-Oliveira RA, Moliterno RA, de Souza VH, Sell AM, et al. HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 profile in a population from southern Brazil. *Hla*. 2018;92(5):298-303.
- [22] Tutuncu ZN, Bilgie A, Kennedy LG, Calin A. Interleukin-6, acute phase reactants and clinical status in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53(6):425-6.
- [23] Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol*. 1999;66(4):562-6.
- [24] Banday MZ, Balkhi HM, Hamid Z, Sameer AS, Chowdri NA, Haq E. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-308G/A promoter polymorphism in colorectal cancer in ethnic Kashmiri population - A case control study in a detailed perspective. *Meta gene*. 2016;9:128-36.
- [25] Milanez FM, Saad CGS, Viana VT, Moraes JCB, Périco GV, Sampaio-Barros PD, et al. IL-23/Th17 axis is not influenced by TNF-blocking agents in ankylosing spondylitis patients. *Arthritis research & therapy*. 2016;18:52-.



PROFILES OF KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS AND HLA CLASS I LIGANDS IN PATIENTS WITH ZIKA VIRUS

Laise Nayana Sala Elpidio¹, Amarilis Giaretta de Moraes¹, Ieda Bernadete Volkweis Langer², Greicy Cezar do Amaral³, Maria Luiza Moretti⁴, Márcia Teixeira Garcia⁵, Rodrigo Angerami⁶, José Luiz Proença Módena⁷, Ana Maria Sell¹, Jeane Eliete Laguilha Visentainer^{1,8,*}

¹Postgraduate Program in Biosciences and Physiopathology at the State University of Maringá, Paraná, Brazil

² Pharmacist responsible for the Laboratory of the central unit of Nova Prata do Iguacu, Paraná, Brazil

³15^o Regional of Health of Paraná, Paraná, Brazil

⁴Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

⁵Division of Hospital Epidemiology, Clinics Hospital, State University of Campinas, Campinas, Brazil

⁶Department of Public Health Surveillance of Campinas, Campinas, Brazil

⁷Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, Brazil

⁸Laboratory of Immunogenetics, State University of Maringá, Paraná, Brazil

E-mail: laise_nayana@hotmail.com

Keywords: genetic association studies; KIR receptors; Zika virus infection.

1. INTRODUCTION

Brazil experienced a Zika virus (ZIKV) epidemic between 2015 and 2016, reporting 1,673,272 suspected cases of ZIKV infection and 1,950 confirmed cases of microcephaly, which resulted from ZIKV infection [1]. ZIKV belongs to the family Flaviviridae and the genus *Flavivirus* and is transmitted mainly by the bite of an infected female *Aedes* mosquito [2]. After virus transmission, inflammatory responses are initiated with the recruitment of leukocyte and natural killer (NK) cells [3]. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are expressed on the surface of NK cells [4]. These receptors interact with human leukocyte antigen (HLA) class I and are fundamental in the biology and function of human NK cells [4,5].

KIR molecules are encoded by 16 genes on chromosome 19q13.4 (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, including pseudogenes *KIR2DP1* and *KIR3DP1*) [6]. HLA class I molecules are encoded by genes located within the chromosomal region 6p21.3 [6]. *KIR* genes encode molecules with long cytoplasmic tails with either one or two tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) that send inhibitory signals to NK cells or molecules with short cytoplasmic tails that send activating signals to NK when associated with DAP-12 protein, which contains tyrosine-based activation motifs (ITAMs) (Figure 1A) [4,7].

NKs play an early and fundamental role in the immune response against species of *Flavivirus*, through cytokine synthesis and cytotoxic functions [3,8]. Moreover, increased levels of NKs are produced in the acute phase of ZIKV infection [9]. It is noteworthy that some viruses evade the immune system by negatively regulating the expression of HLA class I on the surface of infected cells, and thus, prevent NK cell-mediated responses. In contrast, Dengue induces ligand expression, increasing binding to inhibitory receptors and reducing NK cell mediated lysis [10].

To the best of our knowledge, the influence of *KIR* genes and their *HLA* ligands in patients with ZIKV has not been evaluated. Therefore, it is well known that both human *KIR* and *HLA* genes are polymorphic [5]. In addition, studies have indicated that these genes may determine susceptibility or resistance to Flaviviral infection, such as Dengue and West Nile fever [11–14]. The aim of this study was to evaluate a possible association between *KIR* genes and their *HLA* class I ligands in the susceptibility and resistance to Zika infection.



2. MATERIALS AND METHODS

The study was performed and conducted according to the standards of the Ethics Committee of the State University of Maringá (nº. 2.364.256/2017).

2.1 Research Subjects

Eighty-seven patients (68 women and 19 men, mean age 38.6 ± 15.4 years) with a positive diagnosis for ZIKV and 87 individuals (59 women and 28 men, mean age 34.8 ± 16.7) controls ZIKV negative participated in the study. Of the total participants, seventy-eight individuals were residents of northwest of Paraná diagnosed with ZIKV using the Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) technique performed at the Central Laboratory of Paraná State and Clinical Analysis Teaching and Research Laboratory of Maringá State University. Ninety-six participants were from Campinas, São Paulo and were diagnosed using the QuantiNova Probe RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), conducted by the Laboratory of Emerging Viruses in the Institute of Biology at the State University of Campinas, as described previously [15]. We emphasize that patients and controls were age matched. The population included in the study was considered mixed as a result of the high degree of heterogeneity of the Brazilian population [16].

2.2 Genotyping of *KIR* and *HLA* class I genes

DNA from peripheral blood samples was extracted using the QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Genotyping of *KIR* and *HLA-A*, *-B* and *-C* genes was performed through Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides (PCR-SSO) using the Luminex® rSSO Kit (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA). HLA Fusion 4.2, One Lambda was used for interpretation of the results. HLA class I, ligands of *KIR*, were those described previously in the literature [17–21]. Genotypes AA and Bx were grouped according to information available at Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net/kir6001a.asp>).

2.3 Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated using Arlequin 3.5.1.3 software, after data was organized using Convert 1.31 software. The frequencies of the *KIR* and *HLA* class I genes were obtained by direct counting. Comparisons of gene frequencies between patients and controls were performed using either the chi-square statistic with Yates's correction or the Fisher's exact test. To calculate the odds ratio (OR), considering a 95% confidence interval, Open Epi software (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) was used. $P < 0.05$ was considered significant and was corrected by the Bonferroni method by multiplying P by the number of comparisons performed [22].

3. RESULTS

The distribution of the genotype frequencies of *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-C*, and *KIR* in the population studied was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). In the control group, the genotype frequency distribution of the *KIR* genes was consistent with results observed in different populations from the same geographic region (Allele Frequency Net Database, available at <http://www.allelefrequencies.net/kir6002a.asp>).

The *KIR* gene and genotype (AA and Bx) frequencies among patients and controls are presented in Table 1. The *KIR2DS2* occurred in a higher frequency in patients with ZIKV than in controls (57.5% vs. 41.4%, $P = 0.048$, $P_c = 0.779$; OR = 1.914 and 95% CI = 1.04–3.49). *KIR2DL2* (55.2% vs. 40.2%, $P = 0.068$) also had a higher frequency in patients when compared to controls, but differences were not significant. The Bx genotype (73.6% vs. 64.4% of Zika patients and controls, respectively) was more frequent than the genotype AA (26.4% vs. 35.6% for patients and controls, respectively). No significant difference was found in the distribution of gene and genotype frequencies for *KIR* among the patients with ZIKV and controls.

No statistical differences were observed in the distribution of HLA ligands between patients and controls (Table 2). The *Bw4-80I* had a lower frequency in patients compared to controls (58.6% vs. 72.4%, $P = 0.08$), but not significant.

Regarding *KIR* genes and their HLA ligands, the *2DL2-C1* (46.0% vs. 31.0%, $P = 0.061$) and *2DS2-C1* (46.0% vs. 32.2%, $P = 0.087$) had higher frequency in patients when compared to controls, while a lower frequency for *3DS1-Bw4-80I* (19.5% vs. 32.2%, $P = 0.083$) was observed in patients than in controls. However, without statistical significance (Table 3).

4. DISCUSSION

The contribution of *KIR* genes and their *HLA* class I ligands in ZIKV infection has not been fully elucidated. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the influence of *KIR* and *HLA* class I genes in ZIKV infection. It is known that NK cells are activated in the acute phase of infection with Zika virus and the immune response profile is inflammatory [9,23].



Table 1. Distribution of *KIR* genes and genotypes in ZIKV patients and controls.

<i>KIR</i> genes	Patients (N = 87)		Controls (N = 87)	
	n	Frequency (%)	n	Frequency (%)
<i>KIR2DL1</i>	83	95.4	84	96.6
<i>KIR2DL2</i>	48	55.2	35	40.2 ^a
<i>KIR2DL3</i>	75	86.2	79	90.8
<i>KIR2DL4</i>	87	100.0	87	100.0
<i>KIR2DL5</i>	47	54.0	42	48.3
<i>KIR2DP1</i>	83	95.4	84	96.6
<i>KIR2DS1</i>	33	37.9	34	39.1
<i>KIR2DS2</i>	50	57.5	36	41.4 ^b
<i>KIR2DS3</i>	27	31.0	21	24.1
<i>KIR2DS5</i>	30	34.5	29	33.3
<i>KIR3DL1</i>	85	97.7	82	94.3
<i>KIR3DL2</i>	87	100.0	87	100.0
<i>KIR3DL3</i>	87	100.0	87	100.0
<i>KIR3DP1</i>	87	100.0	87	100.0
<i>KIR3DS1</i>	33	37.9	35	40.2
<i>KIR2DS4</i>	85	97.7	82	94.3
Full	65	74.7	63	72.4
Full/Full	8	9.2	13	14.9
Del	77	88.5	69	79.3
Del/Del	20	23.0	19	21.8
Full/Del	57	65.5	50	57.5
AA	23	26.4	31	35.6
Bx	64	73.6	56	64.4

N: number of individuals

n: number of individuals who had the gene

^aP = 0.068

^bP = 0.048, P_c = 0.779; OR = 1.914 e 95%IC = 1.04-3.49

KIR2DS4-full (*003, *004, *006, *007, *008, *009, *010, *012, *013)

KIR2DS4-del (*001, *011, *014, *015)

Table 2. Frequencies for HLA class I in ZIKV patients and controls.

<i>HLA CLASS I</i>	Patients (N = 87)		Controls (N = 87)	
	n	Frequency (%)	n	Frequency (%)
A3 and/or A11	27	31.0	24	27.6
Bw4	68	78.2	72	82.8
Bw4/Bw4	33	37.9	30	34.5
Bw4-80I	51	58.6	63	72.4 ^a
BW4-80T	26	29.9	26	29.9
C4	28	32.2	27	31.0
C1	69	79.3	68	78.2
C2	59	67.8	59	67.8
C1C2	41	47.1	40	46.0
C1C1	28	32.2	28	32.2
C2C2	18	20.7	19	21.8

N: number of individuals

n: number of individuals who had the gene

^aP = 0.08



Table 3. Comparison of the frequencies of *KIR* genes in the presence of their respective HLA class I ligands between ZIKV patients and controls.

<i>KIR</i> - HLA CLASS I	Patients (N =87)		Controls (N = 87)	
	n	Frequency %	n	Frequency (%)
2DL1-C2	57	65.5	57	65.5
2DL2-C1	40	46.0	27	31.0 ^a
2DL3-C1	59	67.8	63	72.4
3DL2-A*03/A*11	27	31.0	24	27.6
3DL1-Bw4	65	74.7	68	78.2
3DL1-80I	49	56.3	60	69.0
3DL1-80T	25	28.7	23	26.4
2DS1- C2	23	26.4	26	29.9
2DS2-C1	40	46.0	28	32.2 ^b
3DS1-Bw4	26	29.9	32	36.8
3DS1-Bw4-80I	17	19.5	28	32.2 ^c
3DS1-Bw4-80T	9	10.3	15	17.2
KIR2DL2/KIR2DL2-C1	10	11.5	5	5.7
KIR2DL2/KIR2DL3-C1	30	34.5	22	25.3
KIR2DL3/KIR2DL3-C1	29	33.3	41	47.1
2DL2/2DL2-C1/C2	5	5.7	2	2.3
2DL2/2DL3-C1/C2	17	19.5	13	14.9
2DL3/2DL3-C1/C2	19	21.8	25	28.7
2DL2/2DL2-C1/C1	5	5.7	3	3.4
2DL2/2DL3-C1/C1	13	14.9	9	10.3
2DL3/2DL3-C1/C1	10	11.5	16	18.4
2DS4-C*04	27	31.0	26	29.9

N: number of individuals

n: number of individuals who had the gene

Group C1: HLA-C*01, *03, *07, *08, *12, *14, *16 ligands for KIR2DL2, 2DL3 and 2DS2

Group C2: HLA-C*02, *04, *05, *06, *15, *17, *18 ligands for KIR2DL1 and KIR2DS1

Bw4: HLA-A*23, A*24, A*25, A*32, B*13, B*27, B*37, B*38, B*44, B*49, B*51, B*52, B*53, B*57, B*58 ligands for KIR3DL1 and KIR3DS1

Bw4-80I: HLA-A*23, *24, *25, *32, *15:17, *27:02, *38:01, *49:01, *51, *52:01, *53:01, *57, *58 ligands for KIR3DL1 and KIR3DS1

Bw4-80T: HLA-B *13, *27:05, *37:01, *44 ligands for KIR3DL1 and KIR3DS1

HLA-A*03 and *11 ligands for KIR3DL2

HLA-C*04 ligands for KIR2DS4

^aP = 0.061

^bP = 0.087

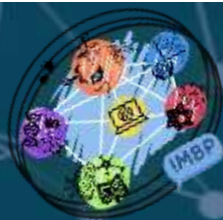
^cP = 0.083

The activation of NK cells may be the result of the inhibitor KIRs and activator KIRs present on the surface of their cells.

The balance between interactions with inhibitor and activator KIRs and their ligands influence NK cell activation. When the activator signal is larger than the inhibitor, NK cells are activated, and they remain inactive when the opposite scenario occurs. The **Figure 1B** hypothetically represents this balance of signals for NK cells in ZIKV infection. Therefore, the strength of signals sent to NK cells is affected by the number of KIR receptors present as well as the presence or absence of HLA class I ligands. In addition, activation of NK cells results in the synthesis of inflammatory cytokines, which in excess, may result in the onset of clinical manifestations of the disease, as has previously been described regarding Dengue [8,24].

These receptors are encoded by the *KIR* genes and the individual genetic can be related to susceptibility and resistance to diseases, beside of influence on the number of KIR receptors present on the surface of NK cells [6]. In our study, we found an increase in the frequency of *KIR2DS2* in patients when compared to controls. However, the result lost its significance after Bonferroni's correction. The general results of studies are conflicting, but the *KIR2DS2* has been associated to susceptibility in symptomatic patients with the herpes virus [25]. Previous studies comparing Dengue patients and controls also did not found significant differences in *KIR2DS2* frequencies [11,12]. Other *KIR* genes were significantly associated to Dengue, *KIR2DL5* gene that was associated with susceptibility to Dengue development and the frequency of the *KIR3DL1* and *KIR2DL2* genes was decreased in patients [11,14].

Regarding KIRs and their ligands, in our study we observed an increase in the frequency of *2DL2-C1* and *2DS2-C1* and a decrease in the frequency of *3DS1-Bw4-80I* in patients when compared to controls. However, no significance was found. In this sense, higher frequency of *2DL1-C2*, *3DL1-Bw4*, *2DS1-C2*, *3DS1-Bw4* was observed in Dengue patients, but results were not significant after the Bonferroni correction [11].



The limitation of this study was the small sample size. Further, other genes encoding NK cell receptor, such as Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors and NKG2, has not been evaluated either. Studies with larger samples will be needed to better understand the immunopathogenic mechanisms of ZIKV infection.

Although, *KIR* genes and their HLA ligands were not associated with ZIKV infection in this population, the evaluation of these genes in different regions of Brazil and other countries that are at risk of experiencing ZIKV epidemics may provide more information about the pathophysiology of ZIKV infection.

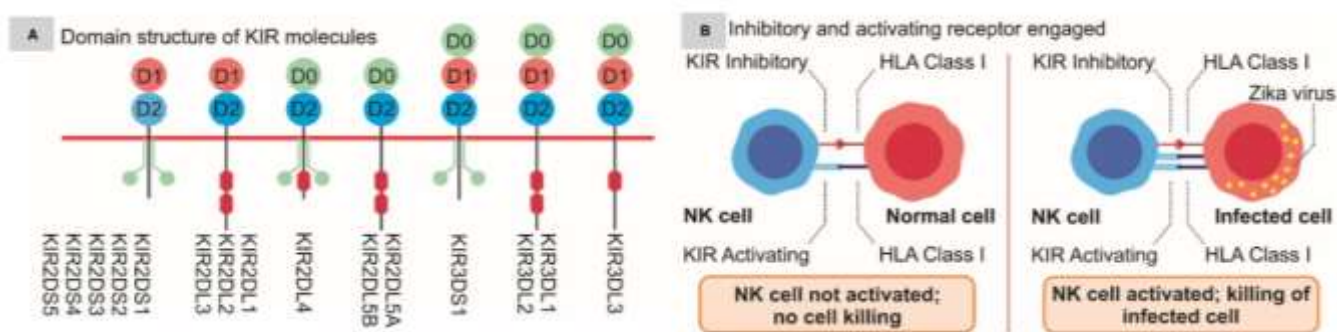


Figure 1. Structure of KIR molecules and balance of signals for NK cells in ZIKV infection. In A, it is possible to understand the structure of KIR receptors. They have 2 or 3 domains on the outer portion. Inside, they have long (L) cytoplasmic tails with either one or two tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) illustrated in red, that send inhibitory signals to NK cells or molecules with short cytoplasmic tails that send activating signals to NK when associated with DAP-12 protein, which contains tyrosine-based activation motifs (ITAMs) illustrated in green. An exception is the KIR2DL4 receptor which is known as the only one with ITIM and ITAM and therefore has an inhibitory and activating function. In B, we hypothetically represent the balance of signals for NK cells in ZIKV infection.

5. CONCLUSION

In this preliminary study, the results showed that the *KIR2DS2*, *KIR2DL2*, *Bw4-80I*, *2DL2-C1*, *2DS2-C1* and *3DS1-Bw4-80I* had a tendency of association to ZIKV outcome. However, additional studies with a larger number of samples should be carried out to better understand the contribution of *KIR* genes and their ligands in ZIKV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all study participants, the 15th Regional Health of Paraná, the Laboratory of Emerging Viruses of the Institute of Biology at the State University of Campinas, and the Laboratory of Immunogenetics of UEM.

FUNDING

This research was funded by the Laboratory of Immunogenetics of the State University of Maringá (Proc. nº. 1589/2017-CSD-UEM), the Araucaria Foundation (Proc. nº. 10929/2016), and the National Council for Scientific and Technological Development (Process nº. 315124/2018).

REFERÊNCIAS

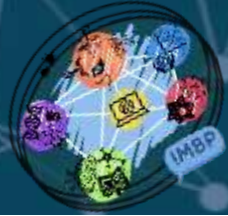
- [1] de Oliveira WK, de França GVA, Carmo EH, Duncan BB, de Souza Kuchenbecker R, Schmidt MI. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *Lancet*. 2017;390:861–70.
- [2] Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880–96.
- [3] Maucourant C, Petitdemange C, Yssel H, Vieillard V. Control of Acute Arboviral Infection by Natural Killer Cells. *Viruses*. 2019;11(2).
- [4] Rajalingam R. Diversity of Killer Cell Receptors and Disease. *Clin Lab Med*. 2018;38:637–53.
- [5] Colucci F, Traherne J. Killer-cell immunoglobulin-like receptors on the cusp of modern immunogenetics. *Immunology*. 2017;152(4):556–61.
- [6] Levinson RD. Killer Immunoglobulin-like Receptor Genes in Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2011;19(3):192–201.
- [7] Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:277–300.



VII XI

**International Meeting of
Biosciences and Physiopathology
Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia**

- [8] Petitdemange C, Wauquier N, Rey J, Hervier B, Leroy E, Vieillard V. Control of acute dengue virus infection by natural killer cells. *Front Immunol.* 2014;5:209.
- [9] Lum F-M, Lee D, Chua T-K, Tan JJJ, Lee CYP, Liu X, et al. Zika Virus Infection Preferentially Counterbalances Human Peripheral Monocyte and/or NK Cell Activity. *mSphere.* 2018;3(2).
- [10] Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. Vol. 31, *Vaccine.* 2013;31:461–71.
- [11] Beltrame LM, Sell AM, Moliterno RA, Clementino SL, Cardozo DM, Dalalio MM, et al. Influence of *KIR* genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. *Tissue Antigens.* 2013;82(6):397–404.
- [12] Alagarasu K, Bachal R V, Shah PS, Cecilia D. Profile of killer cell immunoglobulin-like receptor and its human leucocyte antigen ligands in dengue-infected patients from Western India. *Int J Immunogenet.* 2015;42(6):432–8.
- [13] Spiroski M, Milenkovic Z, Petlichkovski A, Ivanovski L, Topuzovska IK, Djulejic E. Killer cell immunoglobulin-like receptor genes in four human West Nile virus infections reported 2011 in the Republic of Macedonia. *Hum Immunol.* 2013;74(3):389–94.
- [14] Ramanathan T, Krishna CI, Purushottaman SA, Paluru V. Killer cell immunoglobulin like receptors gene polymorphism in patients with dengue infection, Andaman Islands, India. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2015;5(1):47–50.
- [15] Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.
- [16] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):177–82.
- [17] Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM. Studies on the Expression of the Deleted *KIR2DS4*003* Gene Product and Distribution of *KIR2DS4* Deleted and Nondeleted Versions in Different Populations. *Hum Immunol.* 2007;68(2):128–34.
- [18] Dorak MT. C1 and C2 Epitopes. Available from: <http://www.dorak.info/hla/c1c2.html>. Accessed 20 July 2020
- [19] Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* 2011;132(3):315–25.
- [20] Martin MP, Gao X, Lee J-H, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between *KIR3DS1* and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002;31(4):429–34.
- [21] Katz G, Markel G, Mizrahi S, Arnon TI, Mandelboim O. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol.* 2001;166(12):7260–7.
- [22] Svejgaard A, Jersild C, Nielsen LS, Bodmer WF. HL-A Antigens and Disease Statistical and Genetical Considerations. *Tissue Antigens.* 2008;4(1):95–105.
- [23] Naveca FG, Pontes GS, Chang AYH, da Silva GAV, do Nascimento VA, Monteiro DC da S, et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(6).
- [24] Masood KI, Jamil B, Rahim M, Islam M, Farhan M, Hasan Z. Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in dengue disease severity. *Iran J Microbiol.* 2018;10(3):202–7.
- [25] Estefanía E, Gómez-Lozano N, Portero F, De Pablo R, Solís R, Sepúlveda S, et al. Influence of *KIR* gene diversity on the course of HSV-1 infection: Resistance to the disease is associated with the absence of *KIR2DL2* and *KIR2DS2*. *Tissue Antigens.* 2007;70(1):34–41.



CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- α , IL-17A e IL-17F COM OS GENÓTIPOS DESSAS CITOCINAS EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Matheus Braga¹; Mariana de Souza Terron-Monich³; Fernanda Formaggi Lara-Armi²; Marco Antonio Rocha-Loures⁴; Janisleya Silva Ferreira Neves²; Ana Maria Sell³; Quirino Alves de Lima Neto³; Jeane Eliete Laguila Visentainer³

¹Acadêmico de Pós-Graduação [Mestrado], Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Acadêmico de Pós-Graduação [Doutorado], Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Docente Reumatologista do Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

E-mail: matheus.bragga@hotmail.com

Palavras-chave: *Doença autoimune; Interleucinas; polimorfismo genético.*

1. INTRODUÇÃO

A espondilite anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica autoimune que acomete, principalmente, as articulações axiais e sacro-ilíacas causando dor crônica intensa. Nos casos mais avançados, essa inflamação pode levar à fibrose e calcificação, resultando na fusão da coluna e, consequentemente, na perda de flexibilidade. Como características de doenças autoimunes, a EA se desenvolve por meio de interações entre fatores genéticos e ambientais [1]. Um dos fatores genéticos mais importantes está o alelo *HLA-B*27* do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, embora vários outros polimorfismos genéticos também estejam associados à EA [2].

Ainda que a patogênese da doença ainda não tenha sido totalmente elucidada, várias linhas de evidência sugerem que as respostas imunes mediadas pela Interleucina 17 (IL-17) desempenham um papel central [3]. A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória que contribui para a patogênese de diversas doenças inflamatórias. Nas doenças reumatológicas, foi verificada com base em uma descoberta que essa interleucina promove dano a cartilagem em um modelo experimental com animais [4]. A família IL-17 consiste de 6 citocinas estruturalmente relacionadas (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) [5].

A IL-17 é codificada pelo gene que recebe o mesmo nome, localizado no cromossomo 6. Vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) foram detectados nesse gene, entre eles (IL17A rs2275913) que está em uma região promotora do gene onde pode afetar o nível de transcrição deste [6] e (IL17F rs763780) o qual gera a substituição de um aminoácido de histidina por uma arginina [H161R], pela mutação do alelo C, o que leva a perda da capacidade da IL-17F de induzir a expressão de certas citocinas [7]. Ambos os polimorfismos foram associados à EA em estudos anteriores no nosso laboratório [8].

Outro polimorfismo associado no estudo foi o polimorfismo no gene *TNF*, da posição -308 (rs1800629). O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é um componente chave do sistema imunológico e uma potente citocina pró-inflamatória que é altamente produzida depois de uma infecção ou um dano tecidual, sendo conhecida por estar presente em altas concentrações em pacientes com espondiloartrites (EpAs) [9].

Atualmente, o anti-TNF- α junto com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) têm sido os fármacos mais indicados no tratamento para pacientes com alto índice de atividade da doença [10]; contudo, nem todos os pacientes respondem ao tratamento e com isso a importância de se estudar as citocinas envolvidas na patologia [11]. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o nível de TNF- α , IL-17A e IL-17F no soro em pacientes e controles e compara os níveis de citocinas com seus respectivos genótipos dos polimorfismos (*TNF* rs1800629), (*IL17A* rs2275913) e (*IL17F* rs763780).



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Pacientes e controles

Para este estudo caso-controle, os indivíduos foram selecionados de acordo com seus genótipos. Para a dosagem do TNF- α e comparação com o polimorfismo [rs1800629] foram selecionados 36 pacientes (16 GG, 17 GA, 3 AA) e 15 controles (8 GG, 5 GA, 2 AA), para dosagem de IL-17A e comparação com o polimorfismo (rs2275913) foram selecionados 64 pacientes (26 GG, 21 GA, 17 AA) e 15 controles (5 GG; 5 GA; 5 AA), para dosagem de IL-17F e comparação com o polimorfismo (rs763780) foram selecionados 62 pacientes (32 TT, 25 TC, 3 CC) e 17 controles (8 TT; 8 TC; 1 CC). Os pacientes ainda foram estratificados considerando a presença ou não do alelo *HLA-B*27*.

Os pacientes com EA foram diagnosticados através de critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos, de acordo com os critérios *Assessment of SpondyloArthritis International Society (ASAS)* [12]. Os polimorfismos dos pacientes e controles foram determinados em um estudo anterior em nosso laboratório [8]. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade estadual de Maringá (UEM) nº CAAE 27723114 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento.

2.2. Determinação dos níveis séricos das citocinas

O sangue periférico foi coletado dos indivíduos em tubos de 5 mL sem anticoagulantes e as amostras de soro foram mantidas a -80 °C até a análise. A determinação dos níveis séricos das citocinas TNF- α realizada utilizando o Kit *Luminex technology* com o *ProcartaPlex™ Immunoassay* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Inc., Burlington, Ontario, Canada). As dosagens das citocinas IL-17A e IL-17F foram realizadas pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA), com os kits *Human IL-17A platinum ELISA* (affymetrix eBioscience, North America, USA) e *Human IL17F ELISA* (affymetrix eBioscience, North America, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do programa BioEstat 5.0. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para calcular a normalidade das amostras e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação das amostras.

3. RESULTADOS

Os níveis das citocinas TNF- α , IL-17A e IL-17F em pacientes e controles estão representados na Tabela 1. Não houve diferença estatística entre pacientes e controles. Os níveis das três citocinas não apresentaram diferenças estatísticas na concentração mediana em pacientes sem *HLA-B*27*, comparados aos B*27 positivos.

A correlação dos níveis de TNF- α como polimorfismo (rs1800629) está representada na Tabela 2, dos níveis de IL-17A com o polimorfismo (rs2275913) está representada na Tabela 3 e dos níveis de IL-17F com o polimorfismo está representada na Tabela 4. As Interleucinas TNF- α e IL17A não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos genótipos analisados. Houve uma maior concentração mediana de IL17F nos genótipos TC+CC no grupo dos controles.

Tabela 1. Níveis de IL-17A, IL-17F e TNF- α em pacientes com EA e controles

Citocina	EA	EA <i>HLA-B*27+</i>	EA <i>HLA-B*27-</i>	Controles	p valor
TNF- α	2,14 pg/ml	1,39 pg/mL	2,89 pg/mL	1,39 pg/mL	ns
IL-17A	12,81 pg/ml	11,55 pg/mL	22,12 pg/mL	26,41 pg/mL	ns
IL-17F	68,32 pg/ml	37,41 pg/mL	100,14 pg/mL	161,05 pg/mL	ns

pg/mL – picogramas por mL; ns – não significativo; EA – espondilite anquilosante

Tabela 2. Correlação entre o polimorfismo (rs1800629) (G>A) do gene *TNF* com os níveis de TNF- α

	GG	GA+AA	p valor
EA	2,51 pg/mL	1,70 pg/mL	ns
EA <i>HLA-B*27+</i>	2,14 pg/mL	1,39 pg/mL	ns
EA <i>HLA-B*27-</i>	2,89 pg/mL	5,05 pg/mL	ns
Controles	1,39 pg/mL	2,00 pg/mL	ns
Todos os indivíduos	2,07 pg/mL	2,00 pg/mL	ns

pg/mL – picogramas por mL; ns – não significativo; EA – espondilite anquilosante



Tabela 3. Correlação entre o polimorfismo (rs2275913) (G>A) do gene *IL17A* com os níveis de *IL-17A*

	GG	GA+AA	p valor
EA	15,63 pg/mL	12,81 pg/mL	ns
EA HLA-B*27+	22,12 pg/mL	18,98 pg/mL	ns
EA HLA-B*27-	9,15 pg/mL	12,81 pg/mL	ns
Controles	22,35 pg/mL	67,86 pg/mL	ns
Todos os indivíduos	22,12 pg/mL	16,55 pg/mL	ns

pg/mL – picogramas por mL; ns – não significativo; EA – espondilite anquilosante

Tabela 4. Correlação entre o polimorfismo (rs763780) (C>T) do gene *IL17F* com os níveis de *IL-17F*

	CC	TC+TT	p valor
EA	41,27 pg/mL	100,14 pg/mL	ns
EA HLAB*27+	37,41 pg/mL	796,05 pg/mL	ns
EA HLAB*27-	68,32 pg/mL	264,68 pg/mL	ns
Controles	6,05 pg/mL	570,14 pg/mL	0,01
Todos os indivíduos	37,41 pg/mL	414,91 pg/mL	ns

pg/mL – picogramas por mL; ns – não significativo; EA – espondilite anquilosante

4. DISCUSSÃO

A espondilite anquilosante é uma doença inflamatória crônica autoimune que acomete em torno 0,1% a 1,4% da população mundial [13]. Ainda que a patogênese da doença não tenha sido totalmente elucidada, o perfil inflamatório da doença tem obtido uma melhora com o uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides e anti-TNF- α [10], contudo nem todos os pacientes respondem ao tratamento [11]. O estudo das citocinas na EA é um ponto importante no processo de elucidação da patologia da doença, estudos já mostraram um aumento de citocinas inflamatórias como a IL-17 e TNF- α [9, 14]. Neste presente estudo não encontramos diferenças estatísticas entre os níveis de TNF- α , IL-17A e IL-17F entre pacientes e controles. Vale considerar que alguns pacientes estavam sob o uso de AINES e que estes podem afetar o nível de citocinas pró-inflamatórias [15].

Nosso principal objetivo foi avaliar o nível das três citocinas (TNF- α , IL-17A e IL-17F) e fazer uma comparação com os genótipos (rs1800629), (rs2275913) e (rs763780), respectivamente. Os genótipos GA/AA do polimorfismo do *TNF*, associados ao risco de EA, também já foram relatados como maiores produtores de TNF- α [16, 17], os estudos em questão foram realizados *in vitro*. Nosso presente estudo não mostrou diferença nos níveis de produção de TNF- α em relação aos genótipos. Os genótipos associados ao risco de EA, GA/AA no polimorfismo na *IL17A* (rs2275913), também já foram relatados estar associados à maior produção de IL-17A em um recente estudo [18]; contudo, nosso estudo não encontrou diferença de produção entre os genótipos.

A avaliação da correlação entre os níveis de IL-17F e o polimorfismo (rs763780) (C>T) para o gene *IL17F* mostrou uma associação de maior produção de IL-17F com os genótipos CT/TT no grupo dos controles. Os outros grupos apresentaram uma maior concentração mediana de IL-17F naqueles com os genótipos CT/TT, porém não apresentaram diferenças estatísticas. Outro artigo com psoríase também já havia relatado um nível maior de IL-17F em portadores dos genótipos CT/TT [19].

A natureza da EA é poligênica, por isso polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à doença devam ser analisados cautelosamente. Nosso estudo comparou os polimorfismos genéticos associados à EA com os níveis de citocinas com o objetivo de melhor compreensão da sua influência sobre a doença e, observamos que o polimorfismo (rs763780) teve correlação com os níveis de IL-17F e, sendo assim, tem melhor potencial entre os analisados para ser um futuro marcador genético. Entretanto, devemos levar em consideração algumas limitações do nosso trabalho, alguns pacientes estavam sob o uso de medicamentos, o que podem influenciar nos níveis das citocinas, a falta de quantificação de citocinas no tecido também foi um fator negativo, uma vez que células autorreativas estão em maior concentração nos tecidos do que no sangue [21].

5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostraram uma maior concentração mediana de IL-17F em controles, naqueles com os genótipos CT/TT do polimorfismo rs763780 do gene *IL17F*. Esses genótipos já foram associados ao risco de EA e são promissores marcadores genéticos, contudo mais estudos são necessários para confirmarmos essa hipótese.



FINANCIADORES

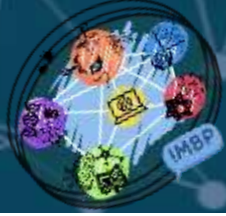
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES, Laboratório de Imunogenética – UEM [Proc. no. 1589/2017-CSDUEM].

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores e colaboradores do Laboratório de Imunogenética da UEM.

REFERÊNCIAS

- [1] Zhu W, He X, Cheng K, Zhang L, Chen D, Wang X, et al. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone Research*. 2019;7[1]:1-16.
- [2] Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis—insights into pathogenesis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12[2]:81.
- [3] McGonagle DG, McInnes IB, Kirkham BW, Sherlock J, Moots R. The role of IL-17A in axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis: recent advances and controversies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2019;78[9]:1167-78.
- [4] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11[10]:763.
- [5] Chang YT, Chou CT, Yu CW, Lin MW, Shiao YM, Chen CC, et al. Cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 2007;156[5]:899-905.
- [6] Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PloS one*. 2011;6[10]:e26229.
- [7] Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, et al. IL-17F sequence variant [His161Arg] is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117[4]:795-801.
- [8] Rocha Loures MA, Macedo LC, Reis DM, Oliveira CF, Meneguetti JL, Martines GF, et al. Influence of TNF and IL17 Gene Polymorphisms on the Spondyloarthritis Immunopathogenesis, Regardless of HLA-B27, in a Brazilian Population. *Mediators of inflammation*. 2018;2018.
- [9] Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine & growth factor reviews*. 2011;22[5-6]:311-9.
- [10] Ward MM, Deodhar A, Akl EA, Lui A, Ermann J, Gensler LS, et al. American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network 2015 recommendations for the treatment of ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 68 [2]: 282–298. 2016.
- [11] Menegatti S, Bianchi E, Rogge L. Anti-TNF therapy in spondyloarthritis and related diseases, impact on the immune system and prediction of treatment responses. *Frontiers in immunology*. 2019;10:382.
- [12] Rudwaleit M, Van Der Heijde D, Landewé R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis [part II]: validation and final selection. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68[6]:777-83.
- [13] Akkoc N. Are spondyloarthropathies as common as rheumatoid arthritis worldwide? A review. *Current rheumatology reports*. 2008;10[5]:371.
- [14] Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clinical rheumatology*. 2011;30[2]:269-73.
- [15] Yan Y, Guo T-M, Zhu C. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on serum proinflammatory cytokines in the treatment of ankylosing spondylitis. *Biochemistry and Cell Biology*. 2018;96[4]:450-6.
- [16] Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the- 308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 2000;12[2]:110-9.
- [17] Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000;114[6]:1180-3.
- [18] Ghaznavi H, Soltanpour MS. Association study between rs2275913 genetic polymorphism and serum levels of IL-17A with risk of coronary artery disease. *Molecular Biology Research Communications*. 2020;9[1]:35-40.
- [19] Choi BG, Hong JY, Hong JR, Hur MS, Kim SM, Lee YW, et al. The IL17F His161Arg polymorphism, a potential risk locus for psoriasis, increases serum levels of interleukin-17F in an Asian population. *Scientific Reports*. 2019;9[1]:1-7.



VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*
XI *Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

- [20] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S-K. IL-17 cytokine family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114[6]:1265-73.
- [21] Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*. 2015;278[4]:369-95.



ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENE VARIANTS IN ZIKA VIRUS INFECTION

Amarilis Giaretta de Moraes^{1,2}; Christiane Maria Ayo³; Laise Nayana Sala Elpídio²; Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka²; Maurício Lacerda Nogueira⁴; Cinara de Cássia Brandão de Mattos³; Luiz Carlos de Mattos³; Jeane Eliete Laguila Visentainer^{1,2,5}.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá -PR

³Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

⁴Laboratório de Pesquisa em Virologia, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP),

⁵Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: amarilisgiaretta@gmail.com

Keywords: Zika virus; genetic association studies; Toll-like receptors; SNPs.

1. INTRODUCTION

Zika (ZIKV) is a mosquito-borne virus, a member of the remarkable *Flaviviridae* family [1]. ZIKV has globally emerged in early 2015 causing an outbreak with significant, unexpected consequences, among which, congenital Zika Syndrome (CZS) and ZIKV-associated Guillain–Barré syndrome are the most impacting manifestations [2, 3]. The arise of this virus in Brazil has drastically affected around 3267 children with impaired growth and/or development [4]. Nonetheless, more than 2 billion people live in countries of risk for ZIKV transmission [3]. For this reason, ZIKV is still considered a global health threat [5, 6].

Similar to other *Flavivirus*, ZIKV is a 50nm virus of positive-sense single-stranded RNA, close-related to Dengue virus (DENV) [1]. The ~11kb long genome encodes a polyprotein which is cleaved into three structural proteins and seven non-structural proteins (NS) [1, 7]. The structural proteins are involved in virus assembly and viral entry into the host cell. The envelope (E) is the main viral protein to mediate the entry process. Besides, the NS proteins contribute to virus replication and modulation of host immune response [1, 4, 7, 8]. Among the several targets of the immune system used by ZIKV and other flaviviruses to invade, replicate and escape the host immune response, Toll-like receptors (TLRs) are considered essential to signal cells and initiate an antiviral response through the release of inflammatory mediators [8, 9]. In humans, are known ten functional TLRs, six of which are expressed in the cell surface (TLR1, -2, -4, -5, -6, and 10) and sense a diverse range of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Moreover, four TLRs are localized intracellularly in endosome vesicles (TLR3, -7, -8, and -9) and are specialized in detecting genetic material [8, 10].

Literature data on TLRs and DENV, although controversial, indicate the immunopathogenesis role of TLR2, TLR4, and -6 in the development and progression of the disease [9, 10, 11]. Importantly, experiments within different human cell lineages, like primary human astrocytes and human embryonic stem cell, have reported interesting findings linking TLR3 and ZIKV replication event through activation of inflammatory responses, but also this TLR is associated to early brain cell fate, triggers apoptosis and diminishes neurogenesis, similar to microcephaly development [12, 13]. Similarly, genetic studies have found that mutations in *TLR* genes can provoke an impaired immune response to pathogens by affecting cell signaling, receptor expression and sense, therefore causing altered susceptibility to diseases.

Given the important role played by TLRs in antiviral host immune response among flaviviruses, we aimed to investigate the influence of variants within the *TLR* genes, *TLR3* rs3775291, *TLR4* rs4986790, *TLR4* rs4986791, and *TLR7* rs179008 in ZIKV infection in a case-control study.

2. MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Human Research and Ethics Committee (CAAE 55805516.2.0000.5415)



2.1. Subjects

The studied population included patients of both sexes, from São José do Rio Preto, São Paulo, who sought medical care during the ZIKV outbreak, within the period of 2015 and 2016, at the Children's and Maternity Hospital of Rio Preto. The cases (ZIKV+) comprised a total of 95 individuals including children, adolescents, and adults with positive serology tests for ZIKV and/or tested positive for ZIKV RNA by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The control group (ZIKV-) was formed by 108 subjects, including children, adolescents and adults tested negative for ZIKV serology test. Serodiagnosis for ZIKV was performed using the ELISA method based on anti-ZIKV NS1 IgG3 (ZIKA-v IgG, Advangen Biotech, Itu-SP, BR). All patients tested positive for the ELISA test, were further confirmed by Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) for ZIKV. Patients and controls were also subdivided into four groups according to the DENV serology test profile. Thus, the respective subgroups were analyzed: 1) Individuals tested negative for both, ZIKV and DENV (ZIKV-/DENV-); 2) Individuals negative for ZIKV, but positive for DENV (ZIKV-/DENV+); 3) Individuals tested positive for both ZIKV and DENV (ZIKV+/DENV+), and 4) Subjects positive for ZIKV but negative for DENV (ZIKV+/DENV-). DENV classification was based on anti-DENV IgG detection using ELISA kit (ELISA IgG Kit, Abcam, Cambridge, UK). All eligible individuals or responsible adults were invited to participate in this study and signed the written consent form.

2.2. DNA Extraction and Genotyping

Genomic DNA was isolated from leukocytes of peripheral blood samples using sílica columns according to the manufacturer's Instruction (QIAamp DNA purification Mini Kit, QIAGEN, Netherlands). *TLR* polymorphisms were defined based on previous studies on *TLRs* and flavivirus, and primers for four functional Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were selected: *TLR3* rs3775291 (1234C/T, Leu412Phe), *TLR4* rs4986790 (896A/G, Asp299Gly), *TLR4* rs4986791 (1196C/T, Thr399Ile) and *TLR7* rs179008 (17961A/T, Gly11Leu) (Table 1). Genotyping was performed by polymerase chain reaction based on restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

2.3. Genotyping of *TLR3* and *TLR7*

The PCR for each SNP was performed using 12.5 µL of the premixed ready-to-use solution GoTaq® Green Master Mix (Thermo Scientific®) with ~100 ng of DNA, 2.4 pmol of each primer and MilliQ water up to a final volume of 24 µL. PCR cycles were performed in the Veriti thermal cycler (Applied Systems®) as described in Table 2. PCR products were digested using specific fast digest restriction enzymes for each *TLR* variant (Table 1) in a final volume of 30 µL following the manufacture's instruction (Thermo Scientific®). The genotyping bands were observed on 2% agarose gel with SYBR Safe (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and visualized under UV light.

2.4. Genotyping of *TLR4*

PCR was performed in a final volume of 10 µL, 100 ng of DNA, 1.0 ng of primer sense and anti-sense, 3.33 mM of MgCl₂, 0.16 mM of dNTP (Invitrogen®, Frederick, MD, USA), 1X PCR buffer (5X Green GoTaq® Flexi Buffer, Promega, USA), and 0.75 U of Taq Polymerase (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, USA). Cycles were performed in the Veriti thermal cycler (Applied Biosystems) as described in table 1. PCR products were digested according to specific restriction enzymes, for each SNP (Table 1). Bands were visualized on 3.5% agarose gel with SYBR Safe (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and visualized under UV light.

2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>) [15]. Allele and genotype frequencies were calculated and compared by chi-square test with Yates or Fisher's correction. Analysis of association between SNP and the disease were obtained through logistic regression analysis adjusted by age. To estimate the risk, odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) was obtained. The values were considered statistically significant for $p < 0.05$. Genotype distribution was estimated and tested for the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

Table 1. Primer sequences, restriction enzymes used and restriction digestion patterns for genotyping of *TLRs* genes

SNP	Primer sequence (5'→3')	R.E.	R.T.	Product Size	Length of the Restriction fragments
rs4986790	F:AGCATACTTAGACTACTACCTCCATG R:GAGAGATTTGAGTTTCAATGTGGG	<i>Nco</i> I	37°C	188pb	A: 188pb G: 168pb + 20pb
rs4986791	F:GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA R:GGAAATCCAGATGTTCTAGTTGTTCTAAGCC	<i>Hinf</i> I	37°C	124pb	C: 124pb T: 98pb + 26pb
rs3775291	F:GGCTAAAATGTTTGGAGCAC R:TGAGATTTTATTCTTTGGTTAGGCTGA	<i>HpyF31</i>	37°C	200pb	T: 200pb C: 169pb + 31pb
rs179008	F:TAACAACGAATAGGAAAATGC R:GTTTTAGGAAACCATCTAGCC	<i>Xap</i> I	37°C	421pb	T: 247pb + 174pb A: 174pb + 116pb + 64pb

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; R.E.: Restriction Enzyme; R.T.: Restriction Temperature; bp: base pair



Table 2. Thermocycling conditions for *TLRs* genotyping.

Gene	SNP	Initial Denaturation	Denaturation / Tm / Extension	Final Extension
N° Cycles		1x	35x	1x
<i>TLR4</i>	rs4986790	95°C - 5min	95°C - 30s / 60°C - 45s / 72°C - 30s	72°C - 10min
	rs4986791	95°C - 5min	95°C - 30s / 62°C - 45s / 72°C - 30s	72°C - 10min
<i>TLR3</i>	rs3775291	95°C - 5min	95°C - 45s / 56°C - 15s / 72°C - 30s	72°C - 7min
<i>TLR7</i>	rs179008	94°C - 5min	94°C - 30s / 52°C - 30s / 72°C - 1min	72°C - 7min

Tm: Melting Temperature; *TLRs*: Toll-like receptors; SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

3. RESULTS

The data presented in this study are preliminary results. The characteristics of patients and controls are described in **Table 3**. The mean age of the control group was 46.7 years, formed by 53.7% of men. The patient group, the overall mean age of the 95 individuals was 41.7 years, was composed by 16.9% of men. The allelic and genotypic frequencies of all the analyzed *TLR* SNPs are shown in **Table 4**. The genotype distribution for *TLR3* and *TLR4* variants were in HWE. Interesting, *TLR7* was not in HWE, and for this reason, was excluded from the association analysis.

For *TLR3* rs3775291, a higher allele frequency was observed for the C allele (73% vs. 65% for controls and patients, respectively). The C/C genotype was less frequent in patients when compared to controls (41% vs. 55%). For *TLR4* rs4986790, the A allele (96% vs. 95%) and genotype A/A (92% vs. 89%) showed a higher frequency in control and patients. For *TLR4* rs4986791, a higher frequency of C allele (97% vs. 96%) and C/C genotype (94% vs. 93%) was observed in both, control and patients. In these preliminary results, the association analysis of allele and genotypes indicated no significant association of protection or susceptibility among *TLR3* rs3775291, *TLR4* rs4986790, *TLR4* rs4986791, and ZIKV infection in the investigated population. Interestingly, the mutant allele for both *TLR4* polymorphisms was present at a very low frequency.

Excitingly, when performing the logistic regression analysis for *TLR3* polymorphism, adjusted by age, a significant association of risk for ZIKV infected patients was observed in the dominant model (OR: 1.85; CI: 1.04-3.30; $P=0.036$).

Table 3. Characteristics of ZIKV infected patients and Controls

	ZIKV- N=108	ZIKV+ N=95
Age		
Mean ± SD	46.7 ± 16.0	41.7 ± 19.6
Gender		
Female n (%)	50 (46.3%)	79 (83.1%)
Male n (%)	58 (53.7%)	16 (16.9%)

Table 4. *TLRs* allele and genotype distribution in controls, ZIKV patients and subgroups.

dbSNP	Alleles & Genotypes	ZIKV- N=108	ZIKV+ N=95	ZIKV-		ZIKV+	
				DENV- N=57	DENV+ N=51	DENV- N=18	DENV+ N=36
<i>TLR3</i> rs3775291	1234C>T						
	C*	157 (0.73)	122 (0.65)	88 (0.77)	69 (0.68)	25 (0.69)	39 (0.56)
	T	59 (0.27)	66 (0.35)	26 (0.23)	33 (0.32)	11 (0.31)	31 (0.44)
	C/C	59 (0.55)	39 (0.41)	34 (0.60)	25 (0.49)	8 (0.44)	11 (0.31)
	C/T	39 (0.36)	44 (0.47)	20 (0.35)	19 (0.37)	9 (0.5)	17 (0.49)
	T/T	10 (0.09)	11 (0.12)	3 (0.05)	7 (0.14)	1 (0.06)	7 (0.2)
<i>TLR4</i> rs4986790	896A>G						
	A*	203 (0.96)	180 (0.95)	109 (0.97)	94 (0.94)	33 (0.92)	67 (0.93)
	G	9 (0.04)	10 (0.05)	3 (0.03)	6 (0.06)	3 (0.08)	5 (0.07)
	A/A	97 (0.92)	85 (0.89)	53 (0.95)	44 (0.88)	15 (0.83)	31 (0.86)
	A/G	9 (0.08)	10 (0.11)	3 (0.05)	6 (0.12)	3 (0.17)	5 (0.14)
	G/G	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
<i>TLR4</i> rs4986791	1196C>T						
	C*	206 (0.97)	183 (0.96)	108 (0.96)	98 (0.98)	34 (0.94)	69 (0.96)
	T	6 (0.03)	7 (0.04)	4 (0.04)	2 (0.02)	2 (0.06)	3 (0.04)
	C/C	100 (0.94)	88 (0.93)	52 (0.93)	48 (0.96)	16 (0.89)	33 (0.92)
	C/T	6 (0.06)	7 (0.07)	4 (0.07)	2 (0.04)	2 (0.11)	3 (0.08)
	T/T	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

dbSNP: nomenclature according to the Single Polymorphism database; *: ancestral allele; *TLR*: toll-like receptor. Subgroups analyzed: ZIKV-/DENV- vs ZIKV+/DENV-; ZIKV-/DENV+ vs ZIKV+/DENV+.



Lastly, in order to verify if previous infections by other related flavivirus, patients, and controls were divided into two subgroups according to the presence or absence of IgG antibodies for DENV. However, no significant association was observed among *TLR*s variants and the subgroups analyzed, previously mentioned in the material and methods section (**Table 4**).

4. DISCUSSION

The scientific community has been demonstrating and predicting that different Zika virus molecules are used as PAMPs to enter the host cell and trigger host immune response [8, 9]. On the other hand, host cells are well equipped with a wide variety of pattern-recognition receptors (PRRs) to sense different virus antigens. TLRs are a family of PRRs and important for the appropriate function of the innate immune response against pathogens, therefore, the presence of genetic mutations on *TLR* genes can potentially diminish response, either by disturbing cell signaling, receptor expression or weaken appropriate recognition, consequently causing altered susceptibility to diseases. In this sense, we aimed to investigate the influence of variants within *TLR* genes in ZIKV infection.

Among the different receptors used by ZIKV to enter the host cell, *TLR4* is one that can broadly interact with ZIKV structural protein E (envelope) [8]. *TLR4* can also sense flaviviruses soluble nonstructural protein 1 (NS1), which is strongly associated with disease severity and progression [8, 12]. Mutations in the cell surface *TLR4*, Asp299Gly, and Thr399Ile, are known to impair receptor recognition due to conformational changes of the extracellular portion of the receptor [16, 17]. The mutant *TLR4* 299Gly can also disturb protein folding and stability [17]. In this sense, it has been reported that *TLR4* SNPs and the related DENV are associated with the risk of the infection, and a minor role in complicated dengue disease [18, 19]. Differently from DENV, our partial results showed no association of protection or risk was found in this study between *TLR4* polymorphisms and Zika infection. Although, lack of association, it is still important to investigate the role of these genetic variants in a population with ZIKV related syndromes, like microcephaly and Guillain-Barré.

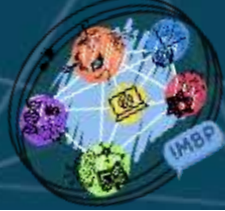
Upon entry into the host cell and inside the endosome vesicle, the virus is uncoated for further RNA release into the cytosol [20]. In the endosomes, *TLR3* and *TLR7* senses virus double and single-stranded RNA, respectively. The receptor-ligand recognition triggers the immune response to produce pro-inflammatory molecules as well as type I interferons to control infection [20]. However, polymorphisms in these receptor genes can impair their function. The missense mutation in *TLR3* rs3775291 results in a minor capacity of the receptor to bind double-stranded RNA compared to the wild-type, thus diminishing activation of nuclear factors [19, 20]. This fact might explain the association of risk observed in the dominant model of this SNP. In this case, the dominant model assumes that a single copy of the allele C of this gene is sufficient to change the risk and for this reason, both genotypes, heterozygous (C/T) and homozygous (CC) is expected to have the same risk and is comparable to the T/T genotype. Therefore, it is suggestive that carriers of the wild-type allele can recognize more the amount of ZIKV RNA which might over-activate the antiviral immune response. Differently, a recent study has shown an association of the mutant T allele of *TLR3* rs3775291 with pregnant women who delivered babies with ZIKV-congenital syndrome, suggesting that this SNP increase susceptibility to CZS [22].

From a different perspective and based on literature evidence, we also verified whether if prior exposure to other related flaviviruses (DENV) could influence the role of genetic variations in *TLRs* and contribute to the risk of ZIKV disease. Since the ZIKV outbreak, scientists have hypothesized whether prior DENV antibodies could worsen ZIKV severity or whether DENV immunity could protect individuals against ZIKV [23]. In our first results, only a small number of individuals could be tested for DENV IgG and this could be the reason for the absence of association within the groups analyzed.

TLRs play an important role in early and late immune events in a wide variety of immune and nonimmune cells and for this reason, have been predicted to be a promising therapeutic target for diseases. Together with published data, our preliminary findings give a partial glimpse of the possible behavior of genetic variations in *TLR* genes in a Brazilian population tested positive for ZIKV virus. Thus, complementary data and other studies should be performed.

5. CONCLUSION

In conclusion, although genetic variations in *TLR3* and *TLR4* do not appear to play a major role in protection or susceptibility to ZIKV infection, this study already provided a weak association of risk of *TLR3* in a dominant model suggesting that a role of these receptors cannot be excluded. Additional genetic studies on *TLRs* must be performed to provide sufficient evidence of association and comprehend the influence of *TLR* polymorphisms in ZIKV pathology and related syndromes.



FUNDING

This research was funded by the Laboratory of Immunogenetics of the State University of Maringá (Proc.nº.1589/2017-CSD-UEM), the Araucaria Foundation (Proc.nº.10929/2016), the National Council for Scientific and Technological Development (Proc.nº.315124/2018), Coordination for higher Education Staff Development (funding code 001) and São Paulo Research Foundation (FAPESP – 16/05115-9).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all participants for their precious contribution to the study and all members of LIG-UEM and FAMERP collaborators.

REFERENCES

- [1] Sirohi D, Kuhn RJ. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis.* 2017;216:S935–44.
- [2] Ojha CR, Rodriguez M, Lapierre J, Karuppan MKM, Branscome H, Kashanchi F, et al. Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus. *Front Immunol.* 2018;9(OCT).
- [3] Musso D, Ko AI, Baud D. Zika virus infection — After the pandemic. *N Engl J Med.* 2019;381(15):1444–57.
- [4] Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;69(November 2018):22–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>
- [5] Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020;5(6):796–812. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- [6] Bailey MJ, Duehr J, Dulin H, Broecker F, Brown JA, Arumemi FO, et al. Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07008-0>
- [7] Tan TY, Fibriansah G, Kostyuchenko VA, Ng TS, Lim XX, Zhang S, et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- [8] Esteves E, Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Barros M. New Targets for Zika Virus Determined by Human-Viral Interactomic: A Bioinformatics Approach. *Biomed Res Int.* 2017;
- [9] Guo HY, Zhang XC, Jia RY. Toll-like receptors and RIG-I-like receptors play important roles in resisting flavivirus. *J Immunol Res.* 2018;2018.
- [10] Shaily S, Upadhy A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev Med Virol.* 2019;29(4):1–16.
- [11] Chen J, Ng MML, Chu JJH. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2015;11(7):1–34.
- [12] Modhiran N, Watterson D, Blumenthal A, Baxter AG, Young PR, Stacey KJ. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2017;95(5):491–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2017.5>
- [13] Ojha CR, Rodriguez M, Karuppan MKM, Lapierre J, Kashanchi F, El-Hage N. Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. *PLoS One.* 2019;14(2):1–26.
- [14] Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell.* 2016/05/11. 2016;19(2):258–65.
- [15] Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22(15):1928–9.
- [16] Ferwerda B, McCall MBB, Verheijen K, Kullberg BJ, Van Der Ven AJAM, Van Der Meer JWM, et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med.* 2008;14(5–6):346–52.
- [17] Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40611–7.
- [18] Sharma S, Singh SK, Kakkar K, Nyari N, Dhole TN, Kashyap R, et al. Analysis of TLR4 (Asp299Gly and Thr399Ile) gene polymorphisms and mRNA level in patients with dengue infection: A case-control study. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016;43:412–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.027>
- [19] Djamiatun K, Ferwerda B, Netea MG, Van Der Ven AJAM, Dolmans WMV, Faradz SMH. Short report: Toll-like receptor 4 polymorphisms in dengue virus-infected children. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(2):352–4.

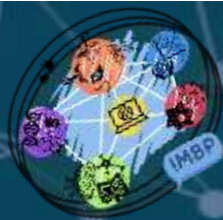


VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*
XI *Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

- [20] Savidis G, McDougall WM, Meraner P, Perreira JM, Portmann JM, Trincucci G, et al. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep* [Internet]. 2016;16(1):232–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.028>
- [21] Zhou P, Fan L, Yu K, Zhao M, Li X. Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *FASEB J*. 2011;25(10):3489–95.
- [22] Santos CNO, Ribeiro DR, Cardoso Alves J, Cazzaniga RA, Magalhães LS, De Souza MSF, et al. Association between Zika Virus Microcephaly in Newborns with the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *J Infect Dis*. 2019;220(11):1797–801.
- [23] Whitehead SS, Pierson TC. Crosstalk between dengue and Zika. *Nature*. 2019;567:467–8.



*Descobertas em
neurogastroenterologia*



INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* PROMOVE ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS NO ÍLEO E CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS

Aline Aguiar¹, Andressa Sulamita Siqueira Menezes de Brito¹, Lucimara Rodrigues Carobeli¹, Lainy Leiny de Lima², Lucas Casagrande³, Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁴, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁵, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁶.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Doutora, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, PR

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Pós Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, PR
e-mail: alineaguiarbm@gmail.com

Palavras-chave: Inflamação; Colágeno; Toxoplasmose.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das doenças mais difundidas em todo o mundo. Estima-se que 30% da população mundial esteja infectada pelo *Toxoplasma gondii*, que é um parasito intracelular obrigatório [1]. Na população brasileira a prevalência da infecção pelo *T. gondii* é de aproximadamente 20 a 90% [2]. A principal forma de infecção pelo parasito ocorre por meio da ingestão de água ou vegetais contaminados com oocistos ou carnes contendo cistos teciduais. Os oocistos ou cistos ao chegar no intestino liberam os esporozoítos ou bradizoítos que invadem as células intestinais e são convertidos em taquizoítos. Esses se multiplicam rapidamente na fase aguda, atingindo outros órgãos onde formam cistos, caracterizando a fase crônica da infecção [3].

Nos indivíduos imunocompetentes a infecção pode ser assintomática ou manifestar-se com diferentes sintomas [4]. Porém, em imunocomprometidos a toxoplasmose tende a se apresentar de forma mais grave, levando a coriorretinite, lesão cerebral, encefalite intensa, convulsões, dentre outras patologias [5]. Já na transmissão vertical da mãe para o feto pode desencadear retardo mental, hidrocefalia, nistagmo e até mesmo levar a um aborto [4].

Durante a infecção há o desenvolvimento de inflamação intestinal [6] com a ativação do sistema imune do hospedeiro, atraindo para o local da inflamação várias células como os macrófagos, neutrófilos, monócitos e linfócitos. Essas células secretam citocinas, mediadores inflamatórios e substâncias microbicidas na tentativa de tentar eliminar o parasito [7].

Vários mecanismos celulares no intestino protegem o hospedeiro dos patógenos e colaboram com a resposta imune da mucosa. Entre as células epiteliais, as células caliciformes secretam diferentes tipos de mucinas, que compõem o muco com finalidade de manter a lubrificação e proteção da mucosa [8]. As células de Paneth contêm grânulos e fazem a secreção de peptídeos antimicrobianos [9] e os linfócitos intraepiteliais (LIE) que são células imunes que migram para o epitélio intestinal e liberam citocinas importantes contra patógenos [10]. Dentre as células, os mastócitos são encontrados nos locais mais vascularizados do trato gastrointestinal podendo secretar proteases, quinases, histaminas, citocinas [11,12] quando necessário.

Além das células do epitélio intestinal, a matriz extracelular fornece suporte físico e elasticidade aos tecidos celulares. É formada por várias proteínas como o tropocolágeno, um dos seus principais componentes [13].

Apesar dos diferentes mecanismos de defesa do hospedeiro, estes não são suficientes para eliminar o parasito, no qual se dissemina por todo organismo e permanece no estágio de cistos por toda a vida de seu hospedeiro, caracterizando a fase crônica da infecção pelo *T. gondii* [14].

Segundo a literatura, animais C57BL/6 desenvolvem um grave processo inflamatório intestinal na fase aguda da toxoplasmose podendo levar a morte dos camundongos. Devido a isso, há poucos



estudos da fase crônica da infecção nesse modelo animal [15]. Em experimentos anteriores nosso grupo de pesquisa observou que a infecção aguda em camundongos C57BL/6 com oocistos de *T. gondii* desencadeia inflamação intestinal, sem causar a morte dos animais. Ratos infectados cronicamente, um modelo mais resistente à infecção pelo *T. gondii*, também desenvolve alterações inflamatórias no intestino. Diante desses achados isso nos leva a questionar a relação da soroprevalência da infecção pelo parasito e o desenvolvimento de doença inflamatória intestinal. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar os efeitos da infecção crônica por *T. gondii* sobre o íleo e cólon de camundongos C57BL/6.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº 4092040517.

2.1 Animais

Foram utilizados 14 camundongos fêmeas da linhagem C57/BL6 com 28 semanas de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Inflamação, da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=7) um grupo controle (GC) e grupo infectado (GI). Os pertencentes ao GI receberam por gavagem 1.000 oocistos de *T. gondii* cepa ME49, enquanto os pertencentes ao GC receberam apenas solução salina. Os animais foram mantidos por 60 dias em biotério setorial com temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período de 12 horas (6h - 18h) controlados, recebendo ração e água *ad libitum*.

3. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

3.1 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino

Após a coleta, o material de 0,5 cm do íleo e cólon foram armazenados em nitrogênio líquido em seguida em freezer a -80°C até a análise. O material foi mantido em PBS em seguida passou em banho maria a 60°C para inibição da catalase por 2 horas, então foi centrifugado e seu sobrenadante foi separado para as técnicas de MPO e NO. A dosagem de MPO foi realizada utilizando o dianisidina (4,2mg o-dianisidina; 22,5 ml água destilada; 2,5 ml PBS; 12,5 μl peróxido de hidrogênio 1%) por 5 minutos e realizamos o bloqueio da reação com solução de acetato de sódio (2,23 g de acetato de sódio anidro; 20 ml de água destilada). Realizada a leitura em leitor de Elisa em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em Densidade Óptica (DO).

3.2 Quantificação de Nitrito Total no Intestino

A dosagem de NO foi realizada utilizando da reação de Griess (0,1g N-Naftil; 1g sulfanilamida; 2,5 ml de ácido ortofosfórico; 100ml água destilada) com uma curva padrão de Nitrito de sódio. A leitura foi realizada em um leitor de ELISA com comprimento de onda de 550nm. Os resultados foram expressos em micro molar (μM).

4. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

4.1 Processamento histológico

Foi coletado 1 cm do íleo e cólon de todos os animais e fixados em paraformaldeído 4% tamponado. Depois de fixados, diafanizados e embebidos em parafina foram cortados transversalmente de forma semi seriada em 5 μm para realização das colorações: Hematoxilina e Eosina (HE) a fim de quantificar os linfócitos intra-epiteliais e células de Paneth, azul de toluidina para quantificação de mastócitos totais; ácido periódico de Schiff (PAS) para contagem de células calciforme produtoras de mucinas neutras; Alcian-Blue (AB 2,5) pH 2,5 células calciforme produtoras mucinas ácidas não sulfatadas ou sialomucinas; Alcian-Blue (AB 1,0) pH 1,0 para contagem de células calciformes produtoras de mucinas ou sulfomucinas sulfatadas e a coloração de Picro Sirius red contra-corados com hematoxilina de Harris para quantificação do colágeno total para a mensuração da área ocupada pelas fibras colágenas tipo I e tipo III.

4.2 Contagem de Mastócitos Totais

Foram utilizadas lâminas com 4 cortes de cada animal e foram contados os mastócitos presentes em 100 campos utilizando microscopia óptica, na objetiva de 100x totalizando 9,96 mm^2 , após foi calculada a proporção de mastócitos presentes em 1 mm^2 . Os resultados foram expressos em mm^2 .

4.3 Contagem de células calciformes e linfócitos intra-epiteliais (LIE)

Cada corte foi dividido em 4 quadrantes e em microscopia óptica na objetiva de 100x foram contadas 160 células por quadrante no epitélio da túnica mucosa, totalizando 2.500 células do epitélio intestinal de cada animal e quantificadas as células calciformes e os LIEs presentes. Posteriormente foi calculada a proporção de células calciformes/100 e LIE/100 células epiteliais (CE).



4.4 Contagem de células de Paneth

Foram utilizados 4 cortes de cada animal divididos em quatro quadrantes e na objetiva de 100x. Foram contadas as células de Paneth presentes na base de 4 criptas de cada quadrante, totalizando 64 criptas. Foram capturadas imagens através de microscopia óptica (Motic®) na objetiva de 100x e mensuradas 10 células de Paneth por quadrante, totalizando 160 células. As áreas das células de Paneth foram medidas utilizando o software Image Pro Plus®.

4.5 Análise das fibras colágenas tipo I e III

Foram capturadas imagens de microscopia óptica associada a um polarizador de luz e o colágeno total sem luz polarizada, na objetiva de 40x, foi quantificado em área corada na tela submucosa em μm^2 com o auxílio do software Image Pro Plus®. As fibras colágenas tipo I e III foram quantificadas pela área corada em vermelho ou verde em imagens polarizadas usando a mesma coloração no mesmo software.

5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

5.1 Técnica imunohistoquímica

Após a microdissecção foi obtido o preparado total contendo o plexo mioentérico de cada animal de ambos os grupos. O preparado total foi incubado por 48 horas em solução contendo anticorpos primários anti- β tubulina (1:100), para marcação de neurônios mioentéricos. Após, os preparados totais foram lavados e incubados em solução contendo o anticorpo secundário conjugado com fluoresceína AlexaFluor® 488 anti-chicken (1:400), à temperatura ambiente protegidos da luz durante 2 horas, sob agitação.

5.2 Análise quantitativa

Foi quantificado o número total de neurônios mioentéricos em 32 imagens, objetiva de 20x, capturadas por uma câmera digital de alta resolução acoplada a um microscópio de fluorescência. As imagens foram transferidas para microcomputador e analisadas com o software Image-Pro Plus®. O resultado desta contagem para cada animal foi calculado em mm^2 .

5.3 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente à medida que foram sendo obtidos. Os testes foram definidos de acordo com a distribuição de dados, assim o teste D'Agostino-Pearson verificou a distribuição dos dados. Por meio do software GraphPadPrism® 5.0 os dados com distribuição normal foram aplicados ao teste T de Student, apresentados pela média \pm erro padrão. Naqueles onde houveram distribuição livre, foram aplicados o Mann-whitney e também apresentados pela média \pm erro padrão. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

A infecção de camundongos C57BL/6 com oocistos de *T. gondii* (ME-49) não alterou o número das células de Paneth no íleo (GI: 133,9 \pm 5,2) em relação ao (GC) 121,8 \pm 6,9). Através de mensurações

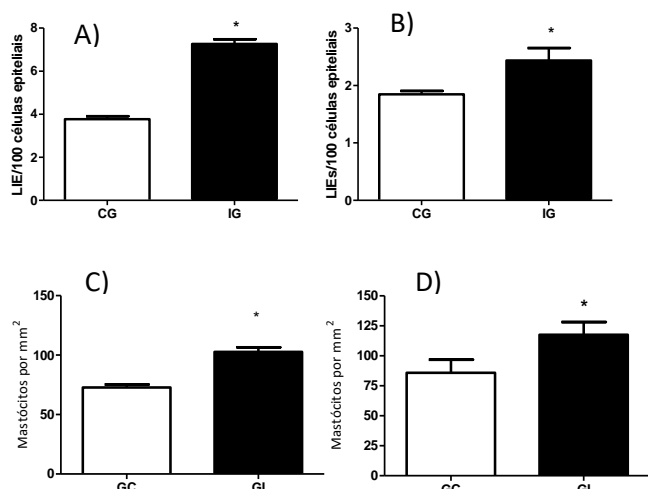


Figura 1. Proporção de LIE/100 células epiteliais (A) no íleo e no (B) cólon e número de mastócitos totais em mm^2 (C) no íleo e no (D) cólon de camundongos C57BL/6 controles ou infectados cronicamente por *T. gondii* cepa ME-49. * $p < 0,05$. GC: grupo controle, GI: grupo infectado.

também não foi observada diferença na área das células de Paneth entre os grupos (GC: 103,4 \pm 4,8 e GI: 93,69 \pm 3,5 μm^2). Em relação aos LIEs os resultados demonstraram que houve diferença significativa da proporção dos LIEs no íleo (GI: 7,26 \pm 0,22* LIE/100 CE) e no cólon (GI: 2,43 \pm 0,21* LIE/100 CE) dos animais infectados em relação aos seus respectivos controles (íleo GC: 3,77 \pm 0,13 LIE/100 CE; cólon 1,84 \pm 0,05 LIE/100 CE). Houve aumento expressivo dos mastócitos totais no íleo (GI: 102,7 \pm 3,9/ mm^2) e cólon (GI: 117,1 \pm 105,9*/ mm^2) relação aos seus respectivos controles (íleo - GC: 72,79 \pm 2,58 mm^2 ; cólon - GC: 85,1 \pm 108,0 mm^2) (Figura 1).



Os resultados da mensuração do colágeno da matriz extracelular demonstraram um aumento significativo de fibras colágenas totais (GI: $19,05 \pm 3,06^*$; GC: $10,96 \pm 1,33 \mu\text{m}^2$) e do tipo I (GI: $9,84 \pm 1,18^*$; GC: $6,18 \pm 1,18 \mu\text{m}^2$) apenas no cólon, sem alterações significativas no íleo (colágeno total (GI: $11,62 \pm 0,65$; GC: $11,34 \pm 0,69 \mu\text{m}^2$) e tipo I (GI: $3,89 \pm 0,40$; GC: $3,03 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$). Os resultados obtidos para as fibras colágenas tipo III para o íleo (GI: $1,27 \pm 0,11$; GC: $1,09 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$) e no cólon (GI: $2,10 \pm 0,19$; GC: $1,94 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$) não foram diferentes significativamente entre os grupos (Figura 2).

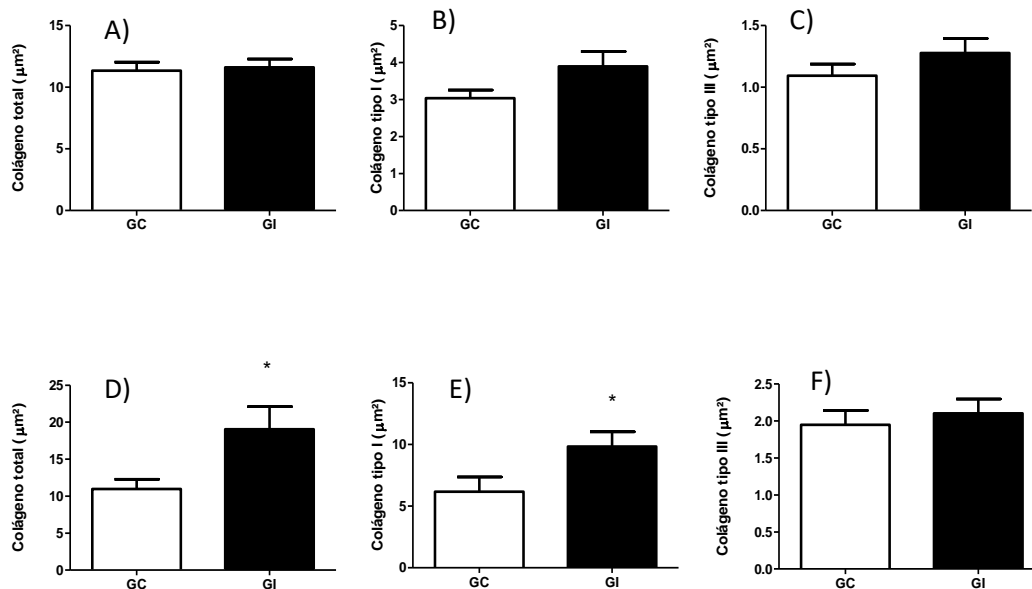


Figura 2. Área μm^2 ocupada pelas fibras colágenas presente no epitélio intestinal do íleo e cólon de camundongos C57BL/6 controles ou infectados cronicamente por *T. gondii*. A-C: íleo, D-F: cólon, sendo (A e D) fibras colágenas totais, (B e E) fibras colágenas tipo I, (C e F) fibras colágenas tipo III. * $p < 0,05$. GC: grupo controle, GI: grupo infectado.

Após a dosagem bioquímica de mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO) não foram observadas alterações sobre o íleo. No entanto foi observada uma diminuição significativa de MPO no cólon, os dados encontram-se na tabela I.

Tabela 1. Atividade de mieloperoxidase e concentração de nitrito na parede do íleo e cólon de camundongos C57BL/6 controles ou infectados com *T. gondii* (ME-49)

	Íleo		Cólon	
	GC	GI	GC	GI
Nitrito (μM)	$24,86 \pm 4,89$	$31,21 \pm 4,80$	$7,31 \pm 0,55$	$11,77 \pm 1,78$
Mieloperoxidase (DO)	$0,0258 \pm 0,0022$	$0,0229 \pm 0,0017$	$0,0367 \pm 0,0024$	$0,0264 \pm 0,0017^*$

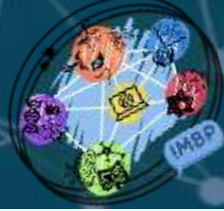
Média \pm erro padrão seguido de * (asterisco) indica diferença significativa ($p < 0,05$, T-Student) em comparação do grupo GI em relação ao GC. GC – grupo controle; GI – grupo infectado com 1000 oocistos de *T. gondii* (gavagem) por 60 dias.

Após processamento histológico não foram observadas alterações das células caliciformes sobre o íleo e cólon, os resultados podem ser observados na tabela II.

Tabela 2. Proporção de células caliciformes/100 células epiteliais do íleo e cólon de camundongos C57BL/6 controles ou infectados de *T. gondii* (ME-49)

	Íleo		Cólon	
	GC	GI	GC	GI
PAS 100/CE	$13,29 \pm 0,58$	$13,85 \pm 0,65$	$19,75 \pm 1,10$	$21,38 \pm 1,15$
AB 1,0 100/CE	$12,01 \pm 0,64$	$12,58 \pm 0,32$	$15,00 \pm 0,64$	$17,03 \pm 0,77$
AB 2,5 100/CE	$11,46 \pm 0,42$	$12,22 \pm 0,49$	$19,93 \pm 0,86$	$16,09 \pm 1,10$

Média \pm erro padrão seguido de * (asterisco) indica diferença significativa ($p < 0,05$, Mann-whitney) em comparação do grupo GI em relação ao GC. GC – grupo controle; GI – grupo infectado com 1000 oocistos de *T. gondii* (gavagem) por 60 dias.



Após a quantificação dos neurônios entéricos do plexo mioentérico não observamos alterações significativas sobre o íleo (GI: 139.8 ± 17.61 ; GC: $124.5 \pm 4.11 \text{ mm}^2$) ou no cólon (GI: 189.7 ± 4.52 ; GC: $163,6 \pm 17,53 \text{ mm}^2$) (Figura 3).

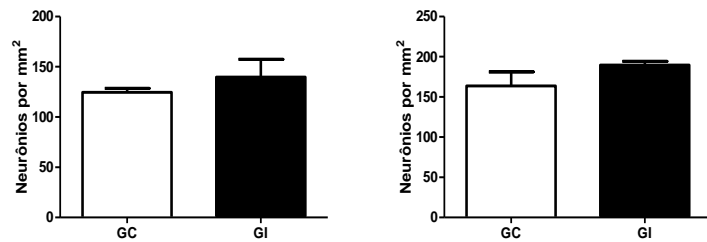


Figura 3. Densidade por área (mm^2) de neurônios anti- β tubulina presente sobre o plexo mioentérico de camundongos C57BL/6 controles ou infectados cronicamente por *T. gondii*. A) íleo B) cólon. * $p < 0,05$. GC: grupo controle, GI: grupo infectado.

7. DISCUSSÃO

Após a infecção oral pelo *T. gondii* o trato gastrointestinal (TGI) é o primeiro a interagir com o parasito, pois eles invadem o epitélio intestinal para se multiplicar e disseminar por outros órgãos, persistindo pela vida toda em seu hospedeiro [6].

No contexto de infecção aguda há desenvolvimento de uma resposta inflamatória e imune em que células são recrutadas para o local da injúria. Células protetoras e imunorreguladoras como os LIEs e mastócitos se proliferam no local de inflamação podendo persistir a longo prazo sobre o tecido inflamado [12,16]. Nossos dados demonstraram um aumento de LIEs e mastócitos totais que pode nos indicar alguma lesão direta ou indireta da infecção sobre este órgão mesmo após 60 dias de infecção o que pode caracterizar a manutenção de uma leve resposta inflamatória.

Com a inflamação e aumento de células imunes sobre o local há um remodelamento da matriz extracelular, causando alterações das fibras colágenas [17] como o aumento observado das fibras de colágeno total e tipo I apenas no cólon.

Células inflamatórias e imunes realizam a secreção de enzimas como a mieloperoxidase (MPO) e NO que possuem papel microbicida e ajuda no controle de multiplicação do *T. gondii* durante a infecção [18,19]. Nossos dados mostraram que a infecção crônica levou uma diminuição de MPO apenas no cólon. Por outro lado, não foram observadas alterações na concentração de nitrito no íleo e cólon dos animais infectados. Similarmente, também não foram observadas alterações quantitativas significativas das células calciformes produtoras de mucinas neutras, sialomucinas lábeis, sulfomucinas no íleo e cólon dos animais infectados. Da mesma forma, as células de Paneth, encontradas apenas no íleo, não estavam alteradas em número ou morfologia. Esses resultados podem estar relacionados com a fase crônica da infecção onde não há multiplicação ativa do parasito e ainda ao fato dos tecidos que sofreram danos inflamatórios serem rapidamente renovados [16].

Estudo realizado em nosso grupo de pesquisa com ratos *Wistar* a infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* durante a fase aguda levou ao aumento de moléculas citotóxicas como o NO que promovem alterações significativas sobre os neurônios entéricos [20]. Porém em nossos dados não houve alterações significativas sobre os neurônios ou concentração de nitrito, podendo-se sugerir que a fase crônica da infecção nesse modelo experimental é caracterizada por reação branda que não causa toxicidade sobre os neurônios ou outros tipos celulares do intestino. Contudo, nossos resultados demonstraram que a resposta à infecção por *T. gondii* permanece por 60 dias desencadeando alterações quantitativas de células imunes e de fibras colágenas no intestino o que sugere a resposta do hospedeiro com a presença de uma resposta inflamatória leve.

8. CONCLUSÃO

Diante dos dados, concluímos que a infecção crônica por *T. gondii* causa alterações inflamatórias leves no íleo e no cólon de camundongos C57BL/6, sendo essas alterações mais expressivas no cólon. É importante realizar outros estudos utilizando esse modelo experimental para elucidar a relação parasito-intestino, pois a grande maioria da população humana que é soropositiva para antígenos *T. gondii* também é assintomática, mas pode desencadear uma resposta semelhante à que é observada em doenças inflamatórias intestinais.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (001).

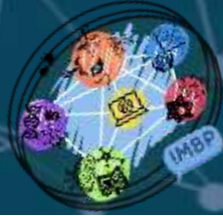


AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todo o grupo de neurogastroenterologia da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

- [1] Betancourt ED, Hamid B, Fabian BT, Klotz C, Hartmann S, Seeber F. From entry to early dissemination-Toxoplasma gondii's Initial Encounter with Its Host. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00046>.
- [2] Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. vol. 139. 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>.
- [3] Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. Toxoplasma gondii: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30:1217–58.
- [4] Kota AS, Shabbir N. Congenital Toxoplasmosis. 2020.
- [5] Ene L, Marcotte TD, Umlauf A, Grancea C, Temereanca A, Bharti A, et al. Latent toxoplasmosis is associated with neurocognitive impairment in young adults with and without chronic HIV infection. *J Neuroimmunol* 2016;299:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.08.003>.
- [6] Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan WJ. A latent ability to persist: differentiation in Toxoplasma gondii. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:2355–73. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-x>.
- [7] Mennechet FJD, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D, et al. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol* 2002;168:2988–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2988>.
- [8] Lee HK, Kwon MJ, Seo J, Kim JW, Hong M, Park HR, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in ALK-positive lung cancer: Comparison with EGFR-mutated lung cancer. *Pathol Res Pract* 2019;215:459–65. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.12.011>.
- [9] Bel S, Pendse M, Wang Y, Li Y, Ruhn KA, Hassell B, et al. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science* (80-) 2017;357:1047–52. <https://doi.org/10.1126/science.aal4677>.
- [10] Mayassi T, Jabri B. Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol* 2018;11:1281–9. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0016-5>.
- [11] Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol* 2019;152:253–69. <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01803-6>.
- [12] Ravanbakhsh N, Kesavan A. The role of mast cells in pediatric gastrointestinal disease. *Ann Gastroenterol* 2019;32:338–45. <https://doi.org/10.20524/aog.2019.0378>.
- [13] Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
- [14] Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:766–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>.
- [15] Heimesaat MM, Dunay IR, Bereswill S. Comprehensive kinetic survey of intestinal, extra-intestinal and systemic sequelae of murine ileitis following peroral low-dose toxoplasma gondii infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00098>.
- [16] Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using Toxoplasma gondii as an infectious trigger. *Immunol Cell Biol* 2012;90:668–75. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.93>.
- [17] Shelley-Fraser G, Borley NR, Warren BF, Shepherd NA. The connective tissue changes of Crohn's disease. *Histopathology* 2012;60:1034–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03911.x>.
- [18] Strzepa A, Pritchard KA, Dittel BN. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell Immunol* 2017;317:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.002>.
- [19] Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii. *J Exp Med* 1997;185:1261–73. <https://doi.org/10.1084/jem.185.7.1261>.
- [20] Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, da Silva Watanabe P, Góis MB, de Melo G de AN, Garcia JL, et al. Kinetics of acute infection with Toxoplasma gondii and histopathological changes in the duodenum of rats. *Exp Parasitol* 2016;165:22–9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.015>.



IMPACTO DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO *Toxoplasma gondii* SOBRE O DUODENO E JEJUNO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS C57BL/6

Andressa Sulamita Siqueira Menezes de Brito¹; Aline Aguiar¹; Layne Laine de Lima²; Gessilda Alcântara Nogueira de Melo³; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴; Jaqueline De Carvalho Rinaldi³;

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

³Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

⁴Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
e-mail: andressambrito@hotmail.com

Palavras-chave: toxoplasmose; infecção crônica; plexo mientérico.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, causada por um protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), pertencente ao filo Apicomplexa, este possui três formas de vida: esporozoito, bradizoito e taquizoito. Seu ciclo biológico envolve as fases sexuada e assexuada e necessita de dois tipos de hospedeiro: o intermediário (o homem, aves, mamíferos domésticos e silvestres) e o definitivo (felídeos) (1). A principal via de infecção do hospedeiro ocorre por meio da ingestão de bradizoítos através de cistos, ou por oocistos contendo esporozoítos. E os taquizoítos podem causar infecção via transplacentária em gestantes sob infecção aguda (2).

Estima-se que a infecção crônica da doença pelo mundo, varie de 10% a 90% dependendo da região do globo e dos hábitos alimentares do lugar. No Brasil, essa prevalência é de 50 a 80% (3). Na maioria das vezes, a infecção pelo *T. gondii* é assintomática, mas quando sintomática, os sinais clínicos ocorrem com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos (4).

A ingestão das formas infectantes de *T. gondii* podem desencadear perturbações no trato gastrointestinal (TGI) e acarretar alterações intestinais semelhantes a doenças inflamatórias intestinais (DII) (5). Após a ingestão, a mucosa intestinal é o primeiro local de contato do *T. gondii* no organismo, provocando a ativação de componentes celulares do sistema imune ao ultrapassar essa barreira (1). Estudos mostram que a associações entre o parasito e a resposta do sistema imune podem causar danos ao epitélio, possibilitando a ruptura de células epiteliais intestinais (6). O epitélio intestinal é composto por uma camada unicelular que formam uma barreira física e bioquímica frente ao *T. gondii*. Para isso, o epitélio conta com células especializadas como células caliciformes (CCs) secretoras de mucinas que compõem o muco intestinal, linfócitos intraepiteliais (LIEs) que migram da lâmina própria, travessam o epitélio em direção ao lúmen e células de Paneth (CP), produtoras de defensinas e outros peptídeos antimicrobianos (7,8)

Já na lâmina própria encontramos células de defesa como os mastócitos (MCs), que são ativados na imunidade para proteção contra microrganismos invasores e patógenos, e que expressam receptores para neurotransmissores que respondem a estímulos externos atuando não só na regulação da mucosa, como também do sistema nervoso entérico (SNE) (9). O SNE é um importante componente também presente no TGI. Seu plexo mientérico, localizado entre a túnica muscular longitudinal externa e túnica muscular circular interna controla a motilidade intestinal e estudos do nosso grupo já mostraram que a infecção por *T. gondii* pode causar alterações no mesmo (10).

Estudos em camundongos C57BL/6 revelam que altos inóculos de *T. gondii* podem superar as defesas do intestino, levando a grandes lesões teciduais mostrando sua alta susceptibilidade á inóculos do parasito, por isso pouco se sabe sobre essa linhagem em infecções crônicas. Além disso, machos e fêmeas respondem de forma diferente á infecção crônica da toxoplasmose, pois os hormônios esteroides sexuais influenciam diretamente no sistema imunológico e, portanto, na suscetibilidade a agentes infecciosos (11,12).



Nosso grupo de pesquisa ainda não caracterizou a infecção crônica por *T. gondii* em camundongos, e existem poucos estudos que utilizem esse modelo nessa fase de infecção, dessa forma nosso objetivo é conhecer melhor os efeitos desencadeados no epitélio intestinal pelo parasito, bem como sua relação com o SNE no modelo experimental camundongos fêmeas C57BL/6

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº 4092040517. Foram utilizados 16 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 60 dias de vida, provenientes do Biotério do Laboratório de Inflamação, localizado sala 106 do bloco K68 da UEM. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (n=8, GC) e infectado (n=8, GI). Os pertencentes ao GI receberam 1.000 oocistos de *T. gondii* cepa ME49 por gavagem, enquanto os pertencentes ao GC receberam apenas solução de tampão fosfato salina (PBS) 0,5 M. Os animais foram mantidos por 60 dias em biotério com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período de 12 horas (6h – 18h), recebendo ração e água *ad libitum*.

2.2. Eutanásia e Coleta de Amostras

Após o período experimental, os camundongos foram anestesiados com nebulização com vapor de halotano, submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico, em seguida foram realizadas a laparotomia e foram coletados o duodeno e jejuno para realização das técnicas bioquímicas, histológicas e de imunohistoquímica.

2.3. Dosagens de MPO e nitrito

A quantificação do óxido nítrico foi realizada utilizando a reação de Griess (13), na qual é quantificado o subproduto nitrito. Foram utilizados 50 μL do homogenato em triplicata em microplaca de 96 poços, adicionando solução de Griess à temperatura ambiente. Após, foi realizada leitura em leitor de placa de ELISA ajustado a 550 nm e os resultados expressos em μM . Para determinar a atividade enzimática da MPO, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 6,5. O precipitado resultante foi ressuscitado em tampão fosfato de potássio (0,08 M) com hexadeciltrimetilamônio (HTAB) em pH 5,4. A amostra foi novamente centrifugada e adicionada tetrametilbenzidina (TMB). A atividade enzimática foi observada sob leitura em espectrofotômetro a 620 nm, e os resultados foram expressos em unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína.

2.4. Processamentos histológicos

O duodeno e jejuno dos animais foram fixados em paraformaldeído 4% e submetidos à rotina histológica. Cortes semi-seriados de 5 μm foram cortados transversalmente e foram realizados coloração de hematoxilina e eosina (HE) a fim de quantificar LIEs e células de Paneth; PAS (ácido periódico de Schiff) para contagem de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e sialomucinas lábeis; Alcian-Blue (AB 2,5) pH 2,5 para contagem de células caliciformes produtoras de sialomucinas; Alcian-Blue (AB 1,0) pH 1,0 para contagem de células caliciformes produtoras de sulfomucinas e Picrosirius para quantificação do colágeno total e, por meio de fotomicrografias com luz polarizada, a quantificação do colágeno tipo I e tipo III.

2.5. Contagem de Linfócitos Intraepiteliais (LIE)

Foram utilizadas lâminas com 4 cortes de cada animal e contadas 2560 células do epitélio intestinal corada em HE e os LIEs presentes entre estas células. Posteriormente foi calculada a proporção de LIEs/100 células epiteliais.

2.6. Contagem de Células Caliciformes (CC)

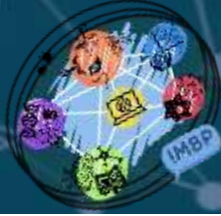
Foram utilizadas lâminas com 4 cortes de cada animal, quantificadas 2560 células do epitélio da túnica mucosa do duodeno e do jejuno de cada animal e calculada a proporção de células caliciformes/100 células do epitélio a partir de 4 cortes corados por PAS, AB pH 2.5 e AB pH 1.0 por animal.

2.7. Contagem de Células de Paneth (CP)

Foram utilizados 4 cortes de cada animal, posteriormente divididos em quatro quadrantes por corte, sendo contadas as CP presentes na base de 4 criptas de cada quadrante, totalizando 64 criptas. Depois foram mensuradas 10 CP por quadrante, totalizando 160 células. As áreas das CP foram medidas pelo software Image Pro Plus®.

2.8. Contagem de Mastócitos Totais (MC)

Foram utilizadas lâminas com 4 cortes de cada animal e foram contados os mastócitos presentes em 100 campos microscópicos utilizando microscopia óptica, na objetiva de 100x totalizando 9,96 mm², após foi calculado a proporção de mastócitos presentes em 1 mm². Os resultados foram expressos em mm².



2.9. Análise do Colágeno Total

A avaliação qualitativa das fibras colágenas foi realizada em cortes corados com picrossirius Red observados em microscopia óptica associada a um polarizador de luz. As fibras colágenas totais foram quantificadas pelo software Image-Pro Plus®, na sua área corada, na tela submucosa, em μm^2 . As fibras colágenas do tipo I e III foram quantificadas pela área corada em vermelho, amarelo e laranja (Tipo I) e verde (Tipo III), em imagens capturadas em microscópio com luz polarizada, usando a mesma técnica e o mesmo analisador de imagem das fibras colágenas totais.

2.10. Análises dos Neurônios e Células da Glia Entéricas (CGE) do plexo Mientérico

Com auxílio de um estereomicroscópio foi realizada a dissecação de fragmento de 1 cm do jejuno e duodeno para obtenção de preparados totais do plexo mientérico. As amostras foram incubadas por 48 horas com anticorpos primários para as seguintes duplas marcações: β – tubulina III e S100 (marcação pan-neuronal e pan-glial). Os preparados totais foram incubados com os anticorpos secundários conjugados com florofitos por 2 horas. Os resultados foram expressos em neurônio/ mm^2

2.11. Análise estatística

A distribuição foi analisada no software BioEstat 5.0® para a verificação do tipo de distribuição. Os dados foram comparados entre os grupos utilizando o teste t-student e apresentados como média e desvio padrão com o auxílio do Software GraphPad Prism version 5.01. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

No epitélio do duodeno foi encontrado um aumento no número de CCs coradas em AB 2.5 e diminuição no número de CCs coradas em PAS (figura 1).

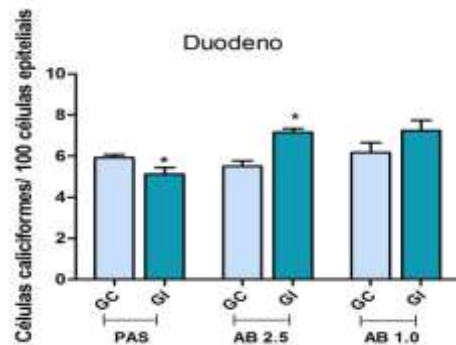


Figura 1. (A) Número de células caliciformes presentes em 100 células epiteliais do duodeno de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (ME49). * representa $p < 0,05$ (GC) Grupo Controle.

Houve um aumento de LIEs tanto no duodeno, quanto no jejuno (figura 2). Não houve alterações nas células de Paneth.

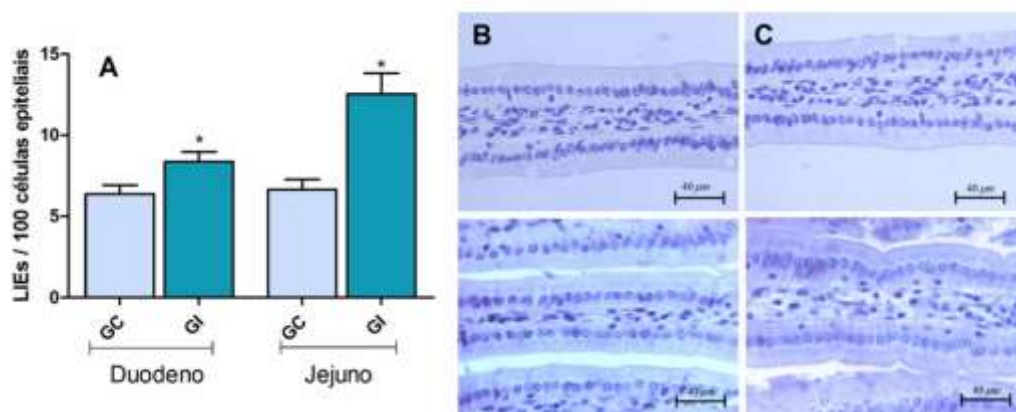


Figura2. (A) Contagem de LIEs presentes em 100 células epiteliais no duodeno e jejuno de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (ME49). * representa $p < 0,05$, (B) Fotomicrografia do duodeno e (C) Fotomicrografia do jejuno de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (ME49) (GI) na coloração de HE. Demonstrado LIEs (setas pretas). Aumento 40x. (GC) Grupo Controle.



Não houve diferença nas proporções de fibras colágenas do tipo I ou nas fibras colágenas totais no duodeno do GI em relação ao GC, mas houve diminuição nas fibras colágenas do subtipo III no GI ($1.206 \pm 0.2674 \text{ mm}^2$) quando comparado ao GC ($1.862 \pm 0.4228 \text{ mm}^2$) (figura 3). Não foram observados diferenças nas fibras colágenas do jejuno. Não houve alterações significativas na atividade de MPO em nenhum dos dois segmentos, todavia houve um aumento expressivo na dosagem de NO no jejuno do GI ($14.80 \pm 2.404 \text{ } \mu\text{M}$) em relação ao GC ($7.893 \pm 2.170 \text{ } \mu\text{M}$) (figura 3), não havendo alterações no duodeno.

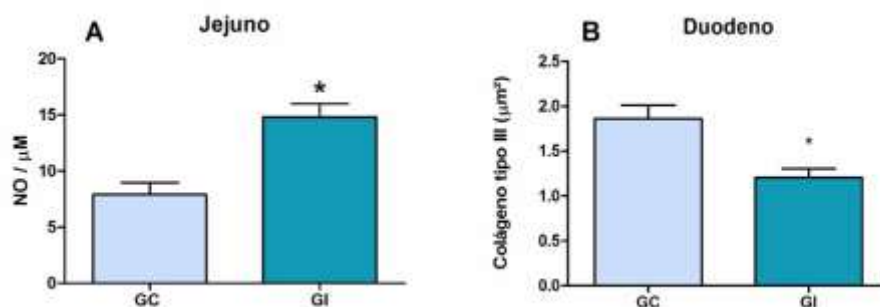


Figura 3. (A) Quantificação do óxido nítrico no jejuno de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (ME49) (GI). (B) Quantificação das fibras colágenas mostrando a diminuição das fibras colágenas do tipo III no GI em relação ao GC no duodeno de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (ME49). * representa $p < 0,05$. (GC) Grupo Controle.

Na quantificação de MCs totais houve aumento significativo no duodeno no GI ($122.7 \pm 16.05 \text{ mm}^2$) frente ao GC ($90.28 \pm 7.386 \text{ mm}^2$). Não houve alterações nos MCs do jejuno. Ao analisar os neurônios presentes no plexo mientérico do jejuno não observamos diferença entre os grupos GI ($337.5 \pm 140.0 \text{ mm}^2$) e GC ($238.6 \pm 31.24 \text{ mm}^2$). Porém, nas CGEs – IR observamos aumento significativo no GI ($454.1 \pm 164.6 \text{ mm}^2$) ($p < 0,05$) se comparado ao GC ($267.5 \pm 48.87 \text{ mm}^2$) (figura 4).

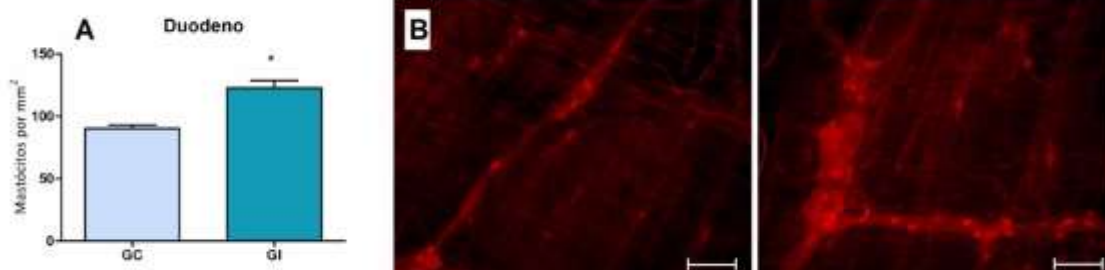


Figura 4. (A) Contagem de mastócitos por mm^2 no duodeno de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (ME49) (GI). * representa $p < 0,05$. (B) Fotomicrografia de CGEs S100 – IR do Plexo mientérico do jejuno de camundongos C57BL/6 mostrando um aumento nas CGEs – IR no GI frente ao GC. Aumento de 20x. (GC) Grupo Controle, (GI) Grupo Infectado.

4. DISCUSSÃO

A infecção crônica por *T. gondii* perturba a homeostase intestinal bem como sua motilidade. No presente trabalho foi possível observar as mudanças ocorridas no duodeno e jejuno de camundongos fêmeas frente essa infecção.

As células caliciformes são as principais produtoras de mucinas (glicoproteínas poliméricas), componente do muco, formando uma barreira de difusão contra microrganismos (14). No duodeno houve um aumento de mucinas ácidas sialomucina (AB 2.5) o que sugere maior lubrificação e fluidez na mucosa intestinal, podendo servir para expulsão do parasito junto às fezes mais amolecidas. Houve também diminuição de mucinas neutras (PAS) no duodeno. Elas produzem um muco mais denso que mais encontrado em infecções agudas (15). Sabe-se que o *T. gondii* mantém alterado os mecanismos de proliferação das CCs por longos prazos, por isso, mesmo em infecções crônicas, pode haver uma diminuição nas mucinas neutras e aumento de mucinas ácidas para facilitar a eliminação do parasito e conter a infecção (16).



Os LIEs são importantes na imunidade intestinal e seu aumento sugere processo inflamatório crônico no intestino. Possuem receptores como CCR5 e produzem IFN- γ que reduz a carga parasitária e TGF- β para reduzir a inflamação, na tentativa de controlar o *T. gondii* (17). O aumento dos LIEs também está relacionado com o aumento de MCs, uma vez que eles são ativados pelos linfócitos graças à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas microvesículas derivadas dessas células (18).

Foi observado um aumento dos MCs no GI do duodeno. Os MCs podem ser ativados pela IgG, imunoglobulina ligada a infecções tardias, através do receptor Fc γ RIIb, que suprime reações de hipersensibilidade e também pelo reconhecimento do *T. gondii* através dos *Toll-like receptors* (TLRs) (18).

Células como enterócitos e monócitos e células da glia entérica frente à infecção por *T. gondii* podem ser uma fonte de NO, uma molécula citotóxica. Essa situação de estresse pode desencadear a conversão de taquizoítos em bradizoítos no cérebro, como uma proteção e tolerogenicidade o que pode indicar o aumento dessa molécula no jejuno na fase crônica da doença (20,21).

Reações inflamatórias crônicas podem induzir maior síntese de fibras no tecido conjuntivo intestinal a fim de reparar lesões. O colágeno do tipo III é menos espesso, resistente e imaturo, está presente nas fases iniciais da cicatrização (22). No presente estudo, os níveis desse colágeno diminuíram no duodeno, provavelmente por se tratar de uma infecção crônica, onde a reparação do dano já aconteceu, havendo assim a diminuição do mesmo (23).

As CGEs no SNE são reguladoras da homeostase intestinal, interagem com o sistema imunológico da mucosa frente à infecções, e por ter uma ação anti-apoptótica neuronal, são responsáveis pela manutenção dos neurônios (24). Observamos aumento no número CGEs, provavelmente na tentativa de proteger os neurônios frente a infecção por *T. gondii*, bem como, recobrar a homeostase intestinal (10).

As alterações decorrentes do desenvolvimento da infecção por *T. gondii* mostram os diversos mecanismos da imunidade da mucosa e do SNE na defesa do hospedeiro frente ao parasito.

5. CONCLUSÃO

Apesar de camundongos serem um modelo experimental pouco estudado na infecção crônica pelo *T. gondii*, o presente estudo apontou as alterações que podem ser encontradas nos componentes da mucosa do duodeno e jejuno frente a infecção, além de ter sido observado um aumento no número de CGEs no plexo mientérico evidenciando também o papel do SNE na tentativa de conter as respostas causadas pelo parasito. Estudos futuros são necessários para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Fundação Araucária.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do grupo de Neurogastroenterologia, ao Departamento de Ciências Morfológicas e ao Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Vol. 11, Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology (ASM); 1998. p. 267–99.
2. CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES LJF. Toxoplasmose caprina. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Brasília. 1999;17:34–6.
3. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology [Internet]. Vol. 139, Parasitology. Parasitology; 2012 [cited 2020 Jul 10]. p. 1375–424. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22776427/>
4. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30(12–13):1217–58.
5. Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger [Internet]. Vol. 90, Immunology and Cell Biology. NIH Public Access; 2012 [cited 2020 Jul 10]. p. 668–75. Available from: [/pmc/articles/PMC4094106/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22776427/)
6. Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. Vol. 22, Trends in Parasitology. Elsevier Current Trends; 2006. p. 448–52.



VII XI

**International Meeting of
Biosciences and Physiopathology
Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia**

7. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Basica, Texto E Atlas [Internet]. Climate Change 2013 - The Physical Science Basis. 2013. 1–30 p. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part
8. Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, da Silva Watanabe P, Góis MB, de Melo G de AN, Garcia JL, et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Exp Parasitol*. 2016 Jun 1;165:22–9.
9. Conti P, Caraffa A, Ronconi G, Kritas SK, Mastrangelo F, Tettamanti L, et al. Impact of mast cells in mucosal immunity of intestinal inflammation: Inhibitory effect of IL-37. Vol. 818, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 294–9.
10. De Almeida Araújo EJ, Zaniolo LM, Vicentino SL, Góis MB, Zaroni JN, Da Silva AV, et al. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejunal myenteric plexus. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Apr 28 [cited 2020 Jul 10];21(16):4829–39. Available from: </pmc/articles/PMC4408455/?report=abstract>
11. Dias RRF, De Carvalho ECQ, Leite CCDS, Tedesco RC, Calabrese KDS, Silva AC, et al. *Toxoplasma gondii* oral infection induces intestinal inflammation and retinochoroiditis in mice genetically selected for immune oral tolerance resistance. *PLoS One* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 Jul 10];9(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25437299/>
12. Hegazy MM, Elme Hankar MS, Azab MS, El-Tantawy NL, Abdel-Aziz A. Sex dichotomy in the course of experimental latent toxoplasmosis. *Exp Parasitol*. 2019 Jul 1;202:15–21.
13. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples [Internet]. Vol. 43, *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radic Biol Med*; 2007 [cited 2020 Aug 4]. p. 645–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17664129/>
14. Johansson MEV, Hansson GC. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins [Internet]. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2020 Jul 27]. p. 639–49. Available from: www.nature.com/nri
15. Rocha PMC, Barros MEG, Evêncio-Neto J. Análise morfológica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico bacillus subtilis cepa C3102. *Pesqui Vet Bras* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Jul 29];36(4):312–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016000400312&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
16. Sant'Ana DMG, Góis MB, Zaroni JN, da Silva A V., da Silva CJT, Araújo EJA. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Int J Exp Pathol*. 2012 Aug;93(4):279–86.
17. Antônio T. A. Gomes and AZ* BSPMCBGMT. Le criquet nomade révèle son code couleur. *Int J Biomed Imaging* [Internet]. 2011 [cited 2020 Jul 28];2011:621905. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21687650/>
18. Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotoner C, et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells*. 2019 Feb 8;8(2):135.
19. Cruz A, Mendes ÉA, de Andrade MVM, Nascimento VC do, Cartelle CT, Arantes RME, et al. Mast cells are crucial in the resistance against *Toxoplasma gondii* oral infection. *Eur J Immunol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2020 Jul 28];44(10):2949–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201344185>
20. Cohen SB, Denkers EY. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2020 Jul 28];37(3):108–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12164>
21. Vicentino-Vieira SL, Góis MB, Trevizan AR, de Lima LL, Leatte EP, Nogueira de Melo G de A, et al. *Toxoplasma gondii* infection causes structural changes in the jejunum of rats infected with different inoculum doses. *Life Sci*. 2017 Dec 15;191:141–9.
22. Brown SR, Cleveland EM, Deeken CR, Huitron SS, Aluka KJ, Davis KG. Type I/type III collagen ratio associated with diverticulitis of the colon in young patients. *J Surg Res*. 2017 Jan 1;207:229–34.
23. da Silva JM, da Silva AV, Araújo EJ de A, Sant'Ana D de MG. The effects of the infection caused by *Toxoplasma gondii* on the cat duodenal wall. *Rev Bras Parasitol Vet* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 28];19(1):57–63. Available from: www.cbpv.com.br/rbpv
24. Schneider LCL, do Nascimento JCP, Trevizan AR, Góis MB, Borges SC, Beraldi EJ, et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 Jul 28];30(5):e13264. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nmo.13264>



ALTERAÇÕES INTESTINAIS EM HAMSTERS EM DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Beatriz Fonseca Ferreira¹; Amanda Gubert Alves dos Santos²; Lainy Leiny de Lima³; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose⁴; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴; Maria Valdrinez Campana Lonardon⁵; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo⁵.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Doutora em Biologia das Interações Orgânicas pelo Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

e-mail: ff.bia95@gmail.com

Palavras-chave: sistema nervoso entérico; trato gastrointestinal; imunofluorescência.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais consideradas um problema de saúde pública [1] da qual tem-se observado elevado aumento no número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica [1]. No período de 2015 a 2018, registrou-se um total de 68.543 casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) confirmados no Brasil [2].

As leishmanioses variam de acordo com a espécie causadora e se manifestam nas formas cutânea/tegumentar (pele), mucosa (membrana mucosa) e visceral [1]. A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) foi a primeira descrita e imputada como agente etiológico da Leishmaniose tegumentar americana, estando amplamente distribuída por toda a América Latina, respondendo pelo maior número de casos no Brasil [3].

A LVB é o principal agente da forma muco-cutânea da LTA e tem como característica produzir lesões destrutivas secundárias, envolvendo mucosas e cartilagens [3]. Contudo, estudos têm demonstrado que espécies causadoras de LTA podem se disseminar por via sanguínea e linfática para outros órgãos como linfonodos, baço, fígado, [4,5] e intestino [6], acarretando danos semelhantes aos causados pela leishmaniose visceral. O intestino é um órgão de extrema relevância aos animais, pois é o responsável pela absorção de nutrientes, reabsorção de água e secreção de muco e outras substâncias. Também é considerado um órgão imune por abrigar o tecido linfoide associado a intestino (Gut Associated Lymphoid Tissue - GALT), o qual constitui 25% da mucosa intestinal, especialmente pela presença de placas de Peyer localizadas na porção ileal, regulando a resposta imunológica em contato constante com patógenos [7].

No intestino encontra-se o sistema nervoso entérico (SNE), uma complexa divisão do sistema nervoso autônomo (SNA) formada por rede interconectada de neurônios intrínsecos e extrínsecos e células da glia entérica (CGE); contidos na parede intestinal estão agrupados em dois plexos ganglionados, o plexo submucoso e o plexo mioentérico. Estes plexos inervam todo o trato gastrointestinal e controlam funções como os padrões de movimento gastrointestinal, a secreção de ácido gástrico, muco, substâncias microbicidas, além de interagir com os sistemas imunológico e endócrino do intestino [7]. Alterações neste sistema podem afetar a morfologia e a função do órgão, assim como a interação com o sistema imunológico e endócrino. Santos e colaboradores [6], encontraram alterações histopatológicas no intestino delgado de camundongos, além de amastigotas e DNA de LVB no íleo e linfonodo mesentérico. Outros estudos já demonstraram alterações morfológicas e celulares na mucosa intestinal e no Sistema Nervoso Entérico (SNE) devido a infecções por protozoários [8-11].

Diante disso, mostra-se importante esclarecer o impacto que a infecção por LVB acarreta ao intestino, elucidando as alterações morfológicas na mucosa e no SNE. Deste modo, o objetivo deste



estudo é analisar as alterações histopatológicas presentes no íleo de hamsters em diferentes tempos de infecção por LVB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo Animal

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob protocolo nº 3062060916. Foram utilizados 20 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos adultos, obtidos no Biotério Central da UEM, os quais foram separados em quatro grupos (n= 5): um Grupo Controle (GC) e três grupos infectados (GI) que foram submetidos a eutanásia em 2 (2S), 5 (5S) ou 8 (8S) semanas após a infecção.

2.2 Cepa e modelo de infecção

Para a realização desse trabalho, foi utilizada a cepa MHOM/BR/2003/2314 que foi isolada de um paciente atendido pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Após ser cultivado, esse isolado foi identificado no Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). Para a infecção, as promastigotas de LVB foram descongeladas e cultivadas no meio 199 (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) suplementado com 1% L-glutamina, 1% urina humana e 10% de soro fetal bovino. No momento da infecção os animais foram anestesiados com uma combinação de 10 mg/kg de Xilazina (Calmiun Agener-Union Animal Health) e 50 mg/kg de Ketamina (Francotar®- Virbac Animal Health). Em seguida, foi realizado o inóculo das formas promastigotas de LVB em fase estacionária (10^5 parasitos em 100µL de solução tampão fosfato salino (PBS) na pata posterior direita dos animais. No grupo controle foi injetado 100µL de PBS.

2.3 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico com gás de isoflurano e posterior eutanásia com dióxido de carbono. Em seguida foi coletado 1 cm do íleo de todos os animais e fixado em paraformaldeído 4% tamponado para técnicas histológicas. Para a técnica de imunofluorescência foi coletado um segmento de 3 cm de íleo de cada animal o qual foi lavado com PBS 0,1M pH 7,4, fixado em paraformaldeído 4%.

2.4 Processamento histológico

Depois de fixados, diafanizados e embebidos em parafina, os segmentos foram cortados transversalmente de forma semi-seriada em 4 µm para realização das colorações histológicas de Hematoxilina e Eosina (HE) a fim de quantificar os linfócitos intraepiteliais (LIEs) e mensurações da arquitetura intestinal; Ácido Periódico de Schiff (PAS+) para contagem de células calciformes (CCs) produtoras de mucinas neutras; Alcian-Blue pH 2,5 (AB 2,5) para contagem de CCs produtoras de sialomucinas e sulfomucinas; Alcian-Blue pH 1,0 (AB 1,0) para contagem de CCs produtoras de sulfomucinas

2.4.1 Contagem de linfócitos intraepiteliais (LIEs)

Foram contadas 2560 células do epitélio intestinal corada em HE de cada animal e os LIEs presentes entre estas células, e foi calculada a proporção de LIEs/100 células epiteliais (CE).

2.4.2 Contagem de células calciformes (CCs)

Foram contadas em microscopia ótica 2560 células do epitélio da túnica mucosa de cada animal. Em seguida quantas dessas eram CCs. Posteriormente calculada a proporção de células calciformes/100 células epiteliais, a partir de 4 cortes corados por PAS, AB pH 2,5 e AB pH 1,0.

2.4.3 Mensuração de parede intestinal

Foram utilizados 4 cortes histológicos por animal, sendo estes divididos em 4 quadrantes. Deste modo foi capturada uma imagem de cada quadrante, totalizando 16 imagens da parede intestinal por animal. Para captura das imagens foi utilizada uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel) acoplada a um microscópio de luz trinocular (MOTIC B5). Com o software Motic Images Plus 2.0 realizou-se a morfometria da profundidade e largura das criptas, altura e largura dos vilos, espessura da camada muscular, tela submucosa e parede total do íleo dos animais.



2.5 Análise do Plexo mioentérico

Para a dissecação utilizou-se um estereomicroscópio, em que a fração de 1 centímetro de cada segmento foi utilizada para a obtenção do plexo mioentérico. A técnica de dupla marcação por imunofluorescência da proteína HuC/HuD (anti-HUC/HUD neuronal protein, Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) em neurônios e da proteína S100 (Anti-S-100, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) em células da glia entérica (CGE) foi realizada para observação da população total de ambas as células. Foi realizada a quantificação e análise da morfometria de neurônios entéricos (NE) e contagem de CGE.

2.5.1 Análise quantitativa de NE e CGE

Com o auxílio do software Image-Pro Plus® foi quantificado o número total de neurônios e CGEs em 32 campos em imagens capturadas utilizando um microscópio de fluorescência Olympus FSX-BSW, na objetiva de 40x. O resultado desta contagem para cada animal foi calculado para 1 mm².

2.5.2 Análise morfométrica de NE

Foram mensuradas as áreas (μm²) de 100 corpos celulares de neurônios mioentéricos por animal, totalizando 500 células por grupo. O resultado foi apresentado por média ± desvio padrão.

2.6 Análise estatística

Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel®) e analisados estatisticamente à medida que foram obtidos. Por meio do software BioEstat 5.0 foi verificada a distribuição dos dados utilizando o teste de D'Agostino-Pearson. Os dados foram considerados com distribuição normal para todas as análises e estão apresentados pela média ± desvio padrão. Para comparação entre os grupos foi aplicado o teste ANOVA one way seguido por pós-teste de Tukey. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% com 95% de confiança. Para tal, foi utilizado o software GraphPad Prism 5.01.

3. RESULTADOS

Apenas os animais do grupo infectado que desenvolveram a lesão na pata foram utilizados para os experimentos. Em relação às análises do epitélio intestinal, observamos uma redução significativa na proporção de CCs produtoras de mucinas ácidas coradas por AB pH 1,0 (GC: 13,75±0,59; 2S: 7,52±1,21; 5S: 8,46±0,34; 8S: 7,29±0,32 CCs/100CE); AB pH 2,5 (GC: 11,06±1,66; 2S: 6,69±0,92; 5S: 4,40±1,65; 8S: 5,66±1,65 CCs/100CE); e neutras coradas por PAS+ (GC: 13,51±1,05; 2S: 8,77±0,13; 5S: 8,34±0,22; 8S: 7,46±0,29 CCs/100CE) nos grupos infectados em relação ao GC. Além disso, também foi verificada uma redução na proporção de LIEs no íleo dos grupos infectados (2S: 5,92±0,75; 5S: 5,92±0,31; 8S: 5,87±0,81 LIE/100CE) em relação ao GC (10,13±1,64 LIE/100CE) (Figura 1).

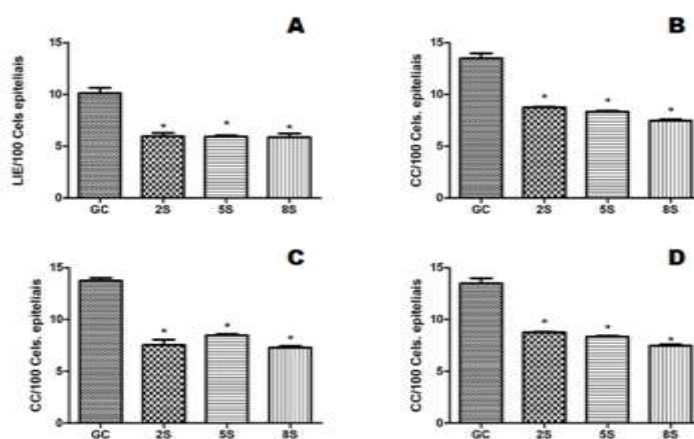


Figura 1. Alterações celulares no epitélio do íleo de hamsters infectados por *Leishmania Viannia braziliensis* após 2, 5 ou 8 semanas de infecção. (A) Proporção da contagem de linfócitos intraepiteliais (LIE) e (B) de células calciformes (CC) coradas por AB 1,0, (C) AB 2,5 e (D) PAS por 100 células epiteliais. * representa $p < 0,05$ quando comparado os grupos infectados ao GC. AB: Alcian Blue. PAS: Peridic Acid-Schiff; GC: Grupo Controle



Observamos alterações estatisticamente significantes nas medidas de parede, vilos e criptas entre o GC em relação aos GI (**Figura 2**). Foi observada redução significativa na espessura das camadas musculares circular e longitudinal no íleo dos grupos infectados. Em consequência, obteve-se a redução na espessura da camada muscular total em relação ao GC. Também foi observada redução na profundidade e largura das criptas, bem como na espessura da túnica submucosa. Nos vilos foi observado aumento de altura e largura nos grupos infectados em relação ao GC. Diante de todas estas alterações na arquitetura mucosa houve uma diminuição geral na parede total do íleo.

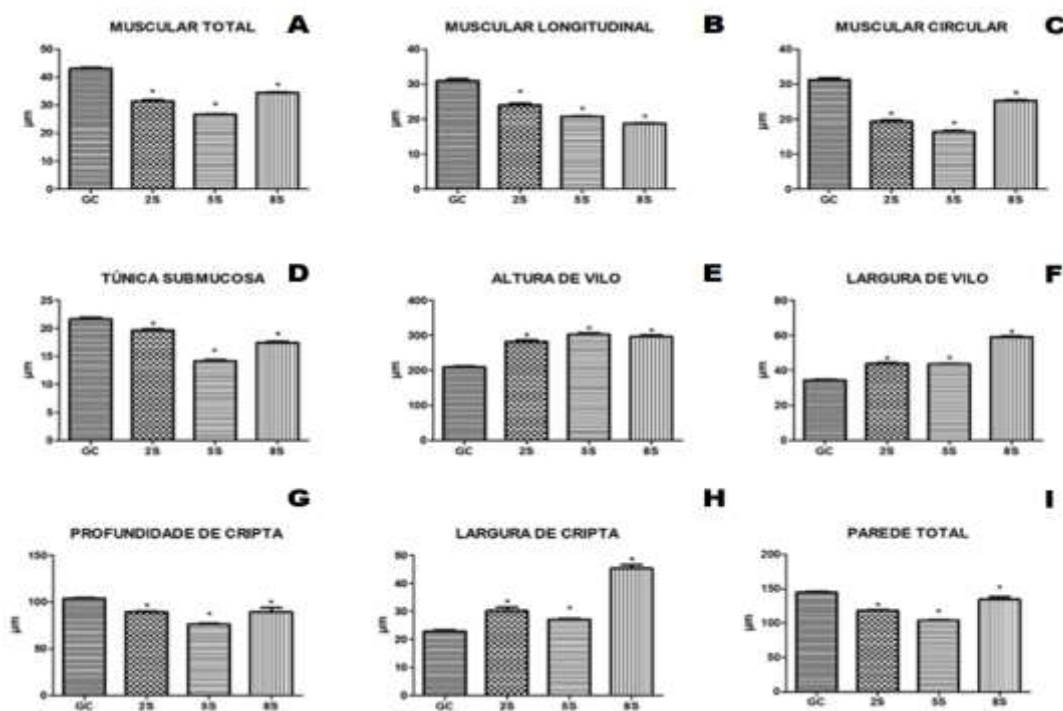


Figura 2. Morfometria da parede do íleo de hamsters controle ou infectados nos tempos 2, 5 e 8 semanas. (A) Muscular total, (B) Muscular longitudinal, (C) Muscular circular, (D) Túnica submucosa, (E) Altura de vilos, (F) Largura de vilos, (G) Profundidade de Cripta, (H) Largura de Cripta, (I) Parede total. * $p < 0,05$

Não foram observadas alterações significantes na morfometria (GC: $168,7 \pm 79,19$; 2S: $143,3 \pm 35,77$; 5S: $71,49 \pm 7,12$; 8S: $281,4 \pm 111,4 \mu\text{m}^2$) ou número (GC: $613,30 \pm 156,4$; 2S: $509,50 \pm 97,30$; 5S: $449,70 \pm 24,47$; 8S: $444,90 \pm 73,63 \text{cels/mm}^2$) dos NEs, porém foi observada redução significativa no número de CGEs (GC: $1844 \pm 164,10$; 2S: $1055 \pm 103,50$; 5S: $829,2 \pm 92,97$; 8S: $975,10 \pm 127,20 \text{cels/mm}^2$) (**Figura 3**).

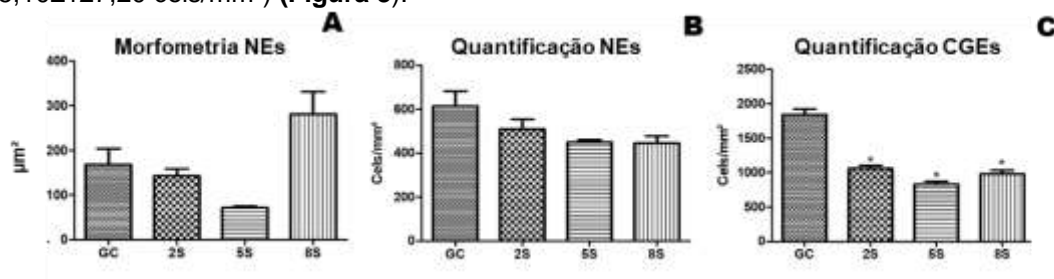


Figura 3. (A) Análise morfométrica e (B) quantitativa de neurônios (NEs) e (C) células da glia entéricas (GCEs) do plexo mioentérico do íleo de hamsters controle ou infectados por LVB nos tempos 2, 5 e 8 semanas. Grupo controle (GC) e infectados nos tempos 2, 5 e 8 semanas (2S, 5S, 8S respectivamente). Quantidades expressas em μm^2 e cels/mm^2 . * $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Apesar da infecção pela espécie LVB ser caracterizada por lesões muco-cutâneas, estudos têm demonstrado a capacidade de disseminação do parasito no interior de células de defesa a outros



órgãos como fígado, baço, [4,5] linfonodos mesentéricos e intestino [6], causando alterações histopatológicas semelhantes às encontradas na leishmaniose visceral [4-6]. Sendo assim, nosso trabalho avaliou diversos componentes celulares e estruturais do íleo de hamsters infectados por esta espécie de protozoário.

A primeira linha de defesa da imunidade inata intestinal é composta por barreiras físicas, químicas e de células que produzem substâncias que oferecem proteção [7]. As CCs são responsáveis pela produção e liberação de mucinas, que quando hidratadas formam o muco, um gel lubrificante e protetivo para o epitélio intestinal contra patógenos do lúmen [12]. A redução deste tipo celular nos grupos infectados pode demonstrar uma fragilização dessa barreira, prejudicando a defesa física provida por ela. Em contraste a estes resultados, Santos e colaboradores [6] observaram aumento das CCs em camundongos após 72 horas da inoculação peritoneal de LVB. Em contraste, em um estudo de infecção crônica em hamsters não foram observadas alterações [13]. Sendo assim, observamos que o tempo de infecção e o modelo experimental são fatores que interferem nas alterações intestinais.

Ainda no epitélio foi observada uma redução na proporção de LIEs nos grupos infectados se comparados ao GC, o que pode ser devido ao recrutamento de células imunes para o local do inóculo nas semanas iniciais da infecção [6,14] e também pela diminuição do trânsito dos linfócitos da lâmina própria para o epitélio, na tentativa de manter a homeostase frente às alterações sistêmicas causadas pela infecção. Essa retenção de linfócitos também pode levar ao aumento dos vilos intestinais [15] como observado em nosso estudo.

Por outro lado, os demais parâmetros analisados morfometricamente, como a espessura das camadas musculares, túnica submucosa e profundidade de criptas sofreram uma redução, o que contrasta com o observado na literatura durante a infecção crônica [13]. Este adelgaçamento da parede ileal junto à redução da camada de muco pode implicar em uma maior exposição do órgão aos microrganismos e outros componentes do lúmen, uma vez que a proximidade entre a luz intestinal e às células do órgão é diminuída. Estes resultados também contrastam com os dados encontrados no estudo de Santos e colaboradores [13] que observaram aumento das camadas musculares e parede total do íleo de hamsters na infecção crônica por LVB. O achatamento das criptas pode ser relacionado a uma menor proliferação celular, o que corrobora a redução do número de CCs no epitélio.

As infecções causadas por protozoários podem causar alterações nos neurônios do plexo mioentérico [8]. Outros estudos mostram que as infecções parasitárias que atingem o TGI podem alterar o SNE de forma direta ou indireta, tendo uma relação entre a resposta imune do hospedeiro, os mediadores inflamatórios e a atividade da SNE diante da infecção por protozoários como *Leishmania chagasi* [8] e *Giardia sp.*[9].

As CGEs são essenciais para a transmissão de impulsos entre neurônios e entre neurônios e células musculares [16], assim sua redução pode estar relacionada com a diminuição da parede muscular, pois havendo menor comunicação entre os NEs do plexo mioentérico e as células musculares, houve atrofia muscular. Elas também desempenham um papel anti-apoptótico [16] que possivelmente evitou alterações na população de NEs. Reduções do número de CGE no plexo mioentérico também foram observadas em infecções intestinais por outros protozoários como *Giardia sp.* [9] e *Toxoplasma gondii* [10]. Trevizan e colaboradores [10] observaram alterações nas populações de NEs e CGE em diferentes tempos de infecção por *T. gondii* [10]; há a possibilidade de que alterações mais evidentes ocorram com a cronificação da doença, uma vez que os tempos de infecção deste estudo contemplam a fase inicial da infecção. Nas primeiras semanas da infecção por LVB ocorre uma reação inflamatória no local do inóculo [17], ao passo que a disseminação do parasito para os órgãos ocorre por via sanguínea e linfática [11], assim é possível que a infecção tardia tenha efeitos sobre o SNE, sendo necessário outros estudos que contemplem diferentes tempos de infecção.

5. CONCLUSÃO

A infecção por LVB promoveu alterações histopatológicas no íleo de hamsters nos tempos de 2, 5 e 8 semanas. As alterações encontradas corroboram estudos anteriores que demonstraram alterações referentes à LVB no intestino, assim como outros protozoários intestinais. Estudos com outros tempos de infecção podem ser utilizados para avaliar a ação do parasito sobre o intestino, assim como a análise das demais células da resposta imune e subpopulações neuronais, que podem ajudar a entender a dinâmica da resposta do órgão frente à infecção.

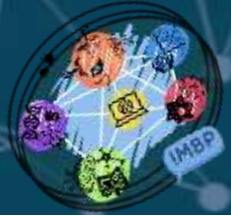
FINANCIADORES

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico



REFERÊNCIAS

- [1] Secretaria de Saúde do estado do Espírito Santo [internet]. Leishmanioses. [Acesso em: 01 de agosto de 2020]. Disponível em: <https://saude.es.gov.br/leishmanioses>
- [2] Brasil. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) [internet]. Leishmaniose Tegumentar Americana - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação. [Acesso em: 20 de junho de 2020]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>
- [3] Organização Pan-americana de saúde/ Organização mundial de saúde - OPAS/OMS. Leishmaniose: Relatório Epidemiológico das Américas. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde. 2017. [Acesso em 20 de junho de 2020]. Disponível em: <http://www.paho.org/leishmaniasis>
- [4] Gomes-Silva, A, Valverde, JG, Ribeiro-Romao, RP, Placido-Pereira, RM, Da-Cruz, AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. Parasitology. 2013. 140(6): 771-9.
- [5] de Souza Marquez, E, de Castro, EA, Nabut, LB, da Costa-Ribeiro, MCV, Araújo, LDCT, Poubel, S. B, Navarro, IT. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs in Paraná, Brazil, and the epidemiological implications of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detection in internal organs and intact skin. Veterinary parasitology. 2017. (243):219-225.
- [6] Santos, AGAD, Ferlini, JDP, Vicentino, SL, Lonardonni, MVC, Sant'Ana, DDMG, Melo, GDAND. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2018. 51(4): 537-541.
- [7] Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai, S. Imunologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- [8] de Oliveira, KS. Leishmaniose visceral experimental: dinâmica das alterações intestinais na infecção por *Leishmania (L.) chagasi*. São Paulo (SP). Universidade Estadual Paulista [Dissertação] 2018.
- [9] Pavanelli, MF, Colli, CM, Bezagio, RC, Góis, MB, de Melo GDAN, de Almeida Araújo, EJ, Sant'Ana DDMG. Assemblages A and B of *Giardia duodenalis* reduce enteric glial cells in the small intestine in mice. Parasitology research. 2018.117(7): 2025-2033.
- [10] Trevizan, AR, Schneider, LCL, Araujo, EJA, Garcia, JL, Buttow, NC, de Melo, GDAND, Sant'Ana, DMG. Acute *Toxoplasma gondii* infection alters the number of neurons and the proportion of enteric glial cells in the duodenum in Wistar rats. Neurogastroenterology & Motility. 2019. 31(3): e13523.
- [11] Martinez, JE, Travi, BL, Valencia, AZ, & Saravia, NG. Metastatic capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. The Journal of parasitology. 1991. 762-768.
- [12] Junqueira, LC, Carneiro, J. Histologia Básica Texto e Atlas. Rio de janeiro. Guanabara-Koogan. 2013.
- [13] dos Santos, AGA, Lima, LL, Mota, CA, Gois, MB, Fernandes, ACBS, Silveira, TGV, Sant'Ana, DMG, Melo, GDAN. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018. 106: 1624-1632.
- [14] Sant'Ana, DM, Góis, MB, Zanoni, JN, da Silva, AV, da Silva, CJ, Araújo, EJ. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. International Journal of Experimental Pathology. 2012. 93(4): 279-286.
- [15] da Silva, PDC, Shiraishi, CS, da Silva, AV, Gonçalves, GF, Sant'Ana, DDMG, de Almeida Araújo, EJ. *Toxoplasma gondii*: a morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. Experimental parasitology. 2010. 125(4): 380-383.
- [16] Grubišić, V, Gulbransen, BD. Enteric glia: the most alimentary of all glia. The Journal of physiology. 2017. 595(2): 557-570.
- [17] Vasconcelos, CO, Cruz, AM, Teixeira, MJ. Estudo da migração celular induzida por *Leishmania braziliensis* na composição da reação inflamatória mimetizada em modelo de bolsa de ar subcutânea em hamster e a sua relação com a evolução e gravidade da infecção. [Tese]. Rio de Janeiro (RJ). Fundação Oswaldo Cruz. 2017.



A ASSOCIAÇÃO DA PERSONALIDADE *MINDFULNESS* COM A IMUNOGLOBULINA-A SECRETÓRIA FECAL E O ESTRESSE PSICOLÓGICO AGUDO - UM ESTUDO EXPLORATÓRIO EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Mateus Joacir Benvenuti¹; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo²; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá²; Cristiane Maria Colli³; Bruna Lauton Simões¹; Kate Edwards⁴; Tatiane Carvalho Alvarenga⁵; Scott Michael⁶; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁷

¹Acadêmico(a) de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

²Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, UEM, Maringá, PR, Brasil

³Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, UEM, Maringá, PR, Brasil

⁴Docente, Faculty of Health Sciences, University of Sydney, Sydney, NSW, Austrália

⁵Docente, Departamento de Ciências Exatas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais, Barbacena, MG, Brasil

⁶Docente, University of Wollongong, Wollongong, NSW, Austrália

⁷Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, UEM, Maringá, PR, Brasil

e-mail: mateusbenvenu@hotmail.com

Palavras-chave: *mindfulness*; imunoglobulina-A secretora; estresse psicológico.

1. INTRODUÇÃO

A prática da meditação *mindfulness* (MM) tem se tornado cada vez mais popular no Ocidente, com participação aproximada de 4 milhões de adultos nos EUA [1]. No Brasil, até o ano de 2018, havia pelo menos oito instituições especializadas nesse tipo de meditação nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Distrito Federal [2]. O termo "*mindfulness*" é definido como um estado de consciência e atenção de cada indivíduo, sem julgamento, no momento presente, sendo também considerado uma característica complexa e multifacetada da personalidade, que varia dentro da população em geral, e que pode ser cultivada pelo treinamento com a MM [3]. Dessa forma, acredita-se que a MM seja um treinamento mental para melhorar a autorregulação da atenção e das emoções [4], com fortes evidências apontando benefícios na promoção geral da saúde humana [5, 6], mas, mais especificamente, no caso de doenças nas quais o estresse desempenha um papel central na patogênese ou no desencadeamento e exacerbação dos sintomas, como a hipertensão e a depressão [7, 8].

Dos transtornos relacionados ao estresse, a Doença Inflamatória Intestinal (DII) se destaca como um grupo de doenças inflamatórias crônicas cuja prevalência tem aumentado no mundo, sobretudo em países desenvolvidos (~ 2 milhões de pessoas na Europa e 1,5 milhão nos EUA) [9]. Mesmo em países em desenvolvimento a prevalência tem crescido substancialmente, como no Brasil, onde o número de casos mais que triplicou de 2008 para 2017 [10]. Uma vez que os efeitos causais do estresse psicológico na fisiopatologia da DII estão bem documentados [11], terapias psicológicas são amplamente defendidas como tratamentos complementares no manejo clínico da DII [9], com evidências positivas iniciais de estudos que avaliam a MM [12]. Um estudo deste ano sugeriu que uma intervenção baseada em *mindfulness* associada ao tratamento convencional foi mais efetiva que o tratamento farmacológico isolado na diminuição de marcadores inflamatórios (calprotectina fecal e proteína-C reativa) em pacientes com DII [13]. No entanto, embora os efeitos da MM pareçam promissores, não há estudos que abordem os mecanismos pelos quais ela atua na saúde intestinal.

Um conhecido modelo teórico sugere que o desenvolvimento da Personalidade *Mindfulness* (PM) por meio da MM leve a reduções na resposta fisiológica ao estresse psicológico [14]. De fato, estudos iniciais sugerem que a PM está associada a menor reatividade cardíaca e do cortisol a estressores externos [15, 16]. Como a resposta exacerbada ao estresse está relacionada com alterações na imunidade intestinal a longo prazo, como a diminuição da Imunoglobulina-A secretória (IgA) intestinal (anticorpo sabidamente diminuído em pacientes com DII) [17, 18], é possível que a PM esteja associada com os níveis de IgA no intestino devido ao seu potencial efeito moderador da resposta fisiológica ao estresse psicológico. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a



contribuição da PM na concentração de sIgA fecal em indivíduos não meditadores saudáveis e, posteriormente, associar os resultados dessa análise à resposta cardiovascular e do cortisol desses indivíduos a um teste de estresse psicológico. Nossa hipótese é que a PM contribuirá para uma maior concentração de sIgA fecal e uma menor reatividade fisiológica ao estresse.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Participantes

Os participantes foram recrutados através de anúncios divulgados na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para serem incluídos no estudo, os voluntários deveriam ter idade entre 18 e 50 anos. Os critérios de exclusão foram: a) ter diagnóstico conhecido de doença crônica (cardiovascular, psiquiátrica, infecciosa, autoimune ou gastrointestinal); b) ter praticado meditação/ yoga anteriormente; c) uso contínuo de medicação (exceto anticoncepcional); d) ter feito uso de antibiótico ou probiótico num período de 3 meses antes da amostragem; e) ser fumante. Todos os participantes foram previamente orientados sobre os procedimentos a serem realizados e assinaram um termo de consentimento antes de serem submetidos aos testes da pesquisa. O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em pesquisa com seres humanos da UEM (parecer nº 3.540.844). Os dados foram coletados na UEM entre setembro de 2019 e março de 2020.

2.2. Intervenção

Após concordarem com a participação no estudo, os voluntários receberam um recipiente para a coleta de fezes, sendo instruídos a coletarem a amostra no mesmo dia do teste (ou no máximo até 24h antes) e a manter o frasco sob refrigeração (4°C) até sua entrega. Os participantes foram informados que, antes de realizar o teste de estresse, deveriam se abster da prática de exercício físico vigoroso por 24h, álcool por 12h, cafeína por 2h e alimento por 1 h. As intervenções foram agendadas para o período da tarde, com início entre 13h e 15h, devido à variação diurna na secreção do cortisol. No dia do teste, os participantes receberam um lanche padronizado (340KJ; carboidrato 10g, sendo 7,5g de glicose; gordura 4,2g; proteína 0,75g) e, logo após, foram submetidos a um período de repouso inicial (10 min). Após esse período, foram submetidos a um teste de estresse (8 min) em frente a um entrevistador e, após o teste, repousaram por 5 min (recuperação). Após o repouso final, os voluntários foram instruídos a responder o Questionário das Cinco Facetas de *Mindfulness* (QCFM).

2.3. Teste de Estresse

Este estudo utilizou uma versão reduzida de 8 minutos, traduzida para o português, do Teste de Adição Serial Auditiva [19]. Durante o teste, números de um único dígito foram apresentados por um áudio padronizado aos participantes, que deviam adicionar cada novo número ao número dito anteriormente e responder às somas em voz alta. A velocidade de apresentação dos números era de um algarismo a cada 2,4s, com uma diminuição de 0,4s a cada 2 minutos. Um feedback negativo era dado pelo entrevistador a cada erro cometido pelos participantes (ex.: expressão ou ruído de negação). Um vídeo do voluntário realizando o teste era exibido em uma tela posicionada à frente do participante.

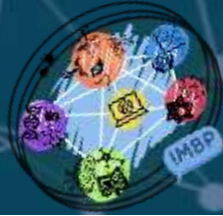
2.4. Medidas cardiovasculares

Um aparelho medidor de pressão arterial (PA) digital Omron® foi usado para registrar a PA sistólica (PAS) e a PA diastólica (PAD) por um manguito ao redor do braço não dominante dos participantes. A PA foi aferida ao final do repouso inicial, logo após o teste, 1 minuto após o teste e ao final da recuperação.

Os intervalos entre cada batimento cardíaco (intervalo R-R) foram gravados durante toda a intervenção pelo monitor Polar® V800. A média da frequência cardíaca (FC) foi calculada em intervalos de 2 min: ao final do repouso inicial, no pico da FC durante o teste e ao final da recuperação. Nos mesmos intervalos, a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (calculada pelo índice rMSSD – a raiz quadrada média da diferença do intervalo de sucessivas ondas sinusais RR normais) foi utilizada como um índice de modulação parassimpática cardíaca. Antes da análise da VFC, as batidas e os artefatos não sinusais foram substituídos usando a interpolação linear das batidas adjacentes. A análise da VFC foi realizada utilizando o software Kubios HRV (Versão 2.1, Grupo de Análise de Biosinais e Imagens Médicas, Kuopio, Finlândia) com detrimeto linear.

2.5. Cortisol salivar

Amostras de saliva foram coletadas com salivettes Sarsted® ao final do repouso inicial e ao final da recuperação. O último momento de coleta foi estipulado considerando-se que o pico da concentração de cortisol ocorre por volta de 15 minutos após o início do estresse [20]. Ao final da intervenção, os salivettes foram centrifugados por 2 minutos à 3000g e as amostras foram congeladas a -70°C até a quantificação da concentração do cortisol por kit de ELISA (DRG Instruments GmbH), conforme metodologia do fabricante.



2.6. Imunoglobulina-A secretória (sIgA) fecal e parasitológico de fezes

Parte da amostra fecal de cada participante foi diluída em solução salina tamponada com fosfato e centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos. As amostras processadas foram congeladas a -70°C até a quantificação da concentração da sIgA fecal por kit de ELISA (Cloud-Clone Corp), conforme metodologia do fabricante. Outra parte da amostra foi submetida às técnicas de flutuação em sulfato de zinco segundo Faust et al., de sedimentação segundo Hoffman, Pons e Janer e de pesquisa de larvas segundo Baermann.

2.7. Questionário das Cinco Facetas de Mindfulness (QCFM)

Os participantes responderam à versão brasileira validada do QCFM [21], que avalia cinco aspectos distintos da PM: a) agir com consciência (AWA); b) não julgar a experiência interna (não julgar); c) não reagir à experiência interna; d) descrever; e) observar. O questionário é composto de 39 itens que variam de 1 (nunca ou raramente verdadeiro) a 5 (quase sempre ou sempre verdadeiro). Uma vez que os itens da faceta “observar” não possuem boa validação em populações de “não meditadores” [22], nossa análise considerou apenas as pontuações das facetas a) a d).

2.8. Análise Estatística

Uma análise descritiva das correlações entre as facetas da PM e a concentração da sIgA fecal foi realizada para orientar a escolha do modelo estatístico a ser utilizado na primeira parte da análise. Em seguida, foi utilizado o modelo de redes bayesianas, que consiste na modelagem por meio da utilização de algoritmo híbrido da inteligência artificial para estabelecer relações probabilísticas entre as variáveis. As variáveis de entrada foram as facetas: “AWA”, “não julgar”, “descrever” e “não reagir à experiência interna”, sendo a sIgA fecal a variável resposta.

A segunda parte da análise consistiu na avaliação da associação das facetas que contribuíram positivamente para a concentração de sIgA fecal com as variáveis de estresse (PAS, PAD, FC, VFC e cortisol salivar). Os dados foram analisados por modelos lineares mistos utilizando a função lme do pacote nlme do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2020) com as facetas “AWA”, “não julgar” e a interação dessas facetas como efeitos fixos, e os indivíduos como efeitos aleatórios. O efeito da variável resposta foi incluído como medida repetida no tempo.

3. RESULTADOS

3.1. Características sociodemográficas

Trinta e seis indivíduos saudáveis (14 do sexo masculino) participaram do estudo (média \pm DP da idade 26,8 \pm 7,6 anos; índice de massa corporal 23,4 \pm 3,1 Kg/m²). A maioria dos participantes (75%) se considerou branca, 19,5% moreno/pardo, 2,7% negro e 2,7% amarelo. Quanto ao estado civil, 77,7% eram solteiros e 22,3% casados. Todos os participantes relataram morar em zona urbana, com grau de escolaridade mínima de 9 anos.

3.2. Parasitológico de fezes

Quatro participantes (11%) tiveram resultado positivo no exame parasitológico de fezes. Os parasitos encontrados foram: *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e *Giardia duodenalis*.

3.3. sIgA fecal versus parasitológico de fezes

Por meio da distribuição dos valores de sIgA fecal considerando resultados positivos ou negativos no teste parasitológico de fezes, verificamos que o resultado positivo na avaliação parasitológica concentrou-se nos menores níveis de sIgA fecal, com média igual à 0,67 ng/mL. Foi

verificado, por meio da distribuição dos valores de sIgA fecal, que os resultados negativos na avaliação parasitológica concentraram-se nos maiores níveis de sIgA fecal, com média igual à 2,61 ng/mL. Dessa forma, os indivíduos com resultado positivo não foram excluídos das análises posteriores, uma vez que o resultado positivo no exame parasitológico não foi associado ao aumento da sIgA fecal.

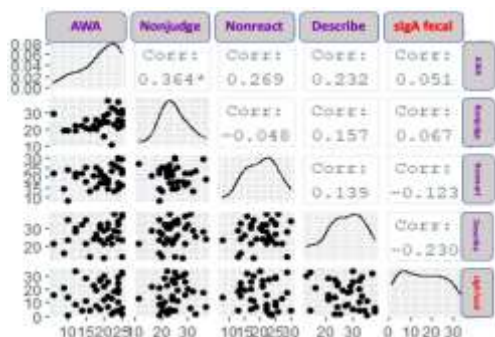


Figura 1. Distribuição das facetas versus sIgA fecal

AWA= Agir com consciência; nonjudge= não julgar; nonreact= não reagir à experiência interna; describe= descrever.

3.4. PM versus concentração de sIgA fecal

Os resultados da análise descritiva entre as facetas da PM e a concentração de sIgA fecal estão ilustrados na Figura 1, na qual se observa que a distribuição das variáveis seguiu um padrão de normalidade (gráficos da linha diagonal central). Observa-se também que a dispersão das facetas apresentou comportamento não linear com relação à sIgA fecal, validando a escolha das redes Bayesianas como



modelo de análise estatística. Na análise dos dados sob o modelo de redes Bayesianas, identificou-se uma contribuição positiva das facetas “AWA” ($\beta= +0,02$) e “não julgar” ($\beta= +0,06$) para a concentração de sIgA fecal, de forma que maiores pontuações dessas facetas contribuíram para uma maior concentração de sIgA fecal.

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value	
(Intercept)	42.32462	40.19763	96	1.0529133	0.2950	
tempo.f2	1.90803	25.08654	96	0.0760577	0.9395	
tempo.f3	-47.10847	25.08654	96	-1.8778384	0.0634	
tempo.f4	-16.14803	25.08654	96	-0.6436931	0.5213	
FFMQ_AWA	2.76507	1.97852	32	1.3975473	0.1719	
FFMQ_nonjudge	2.56138	1.73078	32	1.4798978	0.1487	
tempo.f2:FFMQ_AWA	0.32299	1.23475	96	0.2615790	0.7942	
tempo.f3:FFMQ_AWA	2.33660	1.23475	96	1.8923615	0.0615	
tempo.f4:FFMQ_AWA	0.76243	1.23475	96	0.6174739	0.5384	
tempo.f2:FFMQ_nonjudge	-0.05328	1.08015	96	-0.0493248	0.9608	
tempo.f3:FFMQ_nonjudge	-2.33008	1.08015	96	-2.1818109	0.0316	
tempo.f4:FFMQ_nonjudge	0.63474	1.08015	96	0.5876380	0.5582	
FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.10574	0.08247	32	-1.2822144	0.2090	
tempo.f2:FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.00368	0.05147	96	-0.0715901	0.9431	
tempo.f3:FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.10067	0.05147	96	-2.1148270	0.0355	
tempo.f4:FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.02956	0.05147	96	-0.5743137	0.5671	
Correlation:						
	(Intr)	tmp.f2	tmp.f3	tmp.f4	FFMQ_AWA	FFMQ_n
tempo.f2	-0.312					
tempo.f3	-0.312	0.500				
tempo.f4	-0.312	0.500	0.500			
FFMQ_AWA	-0.971	0.303	0.303	0.303		
FFMQ_nonjudge	-0.982	0.307	0.307	0.307	0.941	
tempo.f2:FFMQ_AWA	0.303	-0.971	-0.486	-0.486	-0.312	-0.294
tempo.f3:FFMQ_AWA	0.303	-0.486	-0.971	-0.486	-0.312	-0.294
tempo.f4:FFMQ_AWA	0.303	-0.486	-0.486	-0.971	-0.312	-0.294
tempo.f2:FFMQ_nonjudge	0.307	-0.982	-0.491	-0.491	-0.294	-0.312
tempo.f3:FFMQ_nonjudge	0.307	-0.491	-0.982	-0.491	-0.294	-0.312
tempo.f4:FFMQ_nonjudge	0.307	-0.491	-0.491	-0.982	-0.294	-0.312
FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	0.970	-0.303	0.303	-0.303	-0.980	-0.976
tempo.f2:FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.303	0.970	0.485	0.485	0.306	0.305
tempo.f3:FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.303	0.485	0.970	0.485	0.306	0.305
tempo.f4:FFMQ_AWA:FFMQ_nonjudge	-0.303	0.485	0.485	0.970	0.306	0.305
tm.2:FFMQ_AWA						
tm.3:FFMQ_AWA						
tm.4:FFMQ_AWA						

Figura 2. Associação das facetas e da interação das facetas com a PAS nos diferentes tempos

Associações significativas em vermelho. FFMQ= Questionário das Cinco Facetas de *Mindfulness*; AWA= agir com consciência; nonjudge= não julgar; tempo.f2= logo após o teste; tempo.f3= 1min após o teste; tempo.f4= recuperação;

3.5. PM versus resposta fisiológica ao estresse

A análise por modelos lineares mistos identificou uma associação positiva significativa entre a faceta “não julgar” e a PAS 1 minuto após o teste ($\beta= +0,30$, $SE= 1,08$, $t= 2,18$, $p= 0,03$) (Figura 2). Por outro lado, a interação das facetas “AWA” e “não julgar” apresentou associação negativa significativa com a PAS no mesmo tempo ($\beta= -0,30$, $SE= 0,05$, $t= -2,13$, $p= 0,03$) (Figura 2), sugerindo que altos níveis de “não julgar” só estão associados com menor reatividade da PAS ao estresse quando associados com altos níveis de “AWA”. A Figura 3 correlaciona as variáveis PAS e tempo, evidenciando o bom ajuste do modelo desta segunda parte da estatística. A análise da associação das facetas e sua interação com as demais variáveis durante o estresse (PAD, FC, VFC e cortisol salivar) não apresentou resultados significativos.

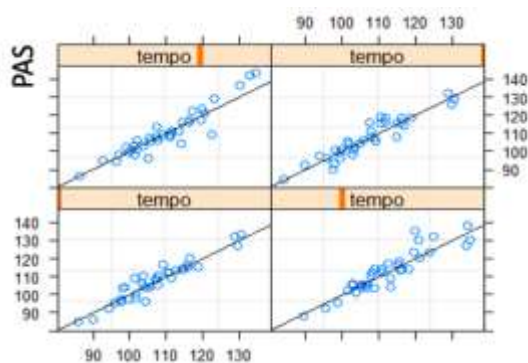


Figura 3. Correlação da Pressão arterial sistólica (PAS) versus tempo

4. DISCUSSÃO

De forma inédita, este estudo mostrou associação positiva entre a PM e um marcador de imunidade intestinal. Primeiramente, observou-se que as facetas “AWA” e “não julgar” contribuíram positivamente para a concentração da sIgA fecal. Além disso, a análise exploratória das facetas e a resposta cardiovascular e do cortisol ao teste de matemática sugere que a associação da PM com os níveis de sIgA fecal ocorre, pelo menos em parte, devido ao efeito moderador do traço da PM na resposta autonômica ao estresse, verificado pela associação negativa da interação das facetas “AWA” e “não julgar” com a resposta da PAS ao estresse psicológico.



Evidências apontam que a prática de intervenções baseadas em *mindfulness* está associada com um aumento basal da sIgA salivar [23-25]. Em se tratando do intestino, um estudo recente apontou que a prática da MM levou à diminuição nos níveis de calprotectina fecal, um importante marcador de inflamação intestinal em pacientes com DII [13]. A sIgA desempenha papéis fundamentais na mucosa intestinal, atuando, por exemplo, na proteção contra agentes patogênicos, na composição de um microbioma intestinal saudável e na modulação da resposta inflamatória do intestino [18]. Sendo assim, nosso achado de que as facetas “AWA” e “não julgar” contribuem positivamente para a concentração de sIgA fecal sugere que o cultivo desses traços, por meio da MM, esteja associado com uma melhora na imunidade intestinal.

É sabido que o estresse é capaz de modular a produção da sIgA intestinal. Estudos com animais apontam que a liberação crônica de catecolaminas pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático e de corticosteróides pelas glândulas suprarrenais (via ativação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal - HHA) influenciam negativamente o número de linfócitos T nas placas de Peyer e a ontogenia dos linfócitos B IgA+ no epitélio intestinal [17]. Nesse contexto, a prática de intervenções baseadas em *mindfulness* tem se mostrado efetiva em diminuir a reatividade da PA e do eixo HHA ao estresse psicológico [26, 27], mas, ao contrário do que esperávamos, nossa análise apontou que a faceta “não julgar” associou-se com uma maior reatividade da PAS ao teste de estresse. Contudo, ao interagirmos a faceta “não julgar” com “AWA”, curiosamente se observou uma menor reatividade da PAS.

A despeito da evolução nos métodos de mensuração da PM, há de se evidenciar a discussão sobre a habilidade de escalas unidimensionais em capturar a essência multidimensional da PM [28]. A partir disso, o estudo da interação entre as facetas é apontado como essencial para o entendimento da associação entre a PM e a saúde humana. Os autores defendem, por exemplo, que a observação do momento presente sem a habilidade de não julgar pode levar ao estresse e ao enfrentamento não-adaptativo [3]. De fato, estudos sugerem que o efeito da faceta “AWA” só é benéfico para sintomas associados ao transtorno de personalidade *borderline* [29] e PA de repouso [30] quando acoplado com uma atitude de “não julgamento”. Dessa forma, o achado deste estudo de que a interação das facetas “AWA” e “não julgar” está associada negativamente com a reatividade da PAS ao estresse, ao contrário do efeito preditor positivo da faceta “não julgar”, evidencia o caráter complexo da PM e a importância do cultivo de ambos os traços para que os benefícios fisiológicos da prática da MM sejam alcançados.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam para uma contribuição positiva das facetas “AWA” e “não julgar” para os níveis de sIgA fecal em indivíduos não meditadores saudáveis. A análise exploratória dessa contribuição com as variáveis de estresse sugere que os efeitos positivos da PM na imunidade intestinal decorrem, pelo menos em parte, do efeito moderador da interação das facetas supramencionadas na resposta autonômica ao estresse psicológico agudo.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (001).

REFERÊNCIAS


- [1] Burke A, Lam CN, Stussman B, Yang H. Prevalence and patterns of use of mantra, mindfulness and spiritual meditation among adults in the United States. *BMC Complement Altern Med.* 2017 Jun 15; 17(1):316.
- [2] Mouzinho L, Costa N, Alves T, Silva S, Lima L. Contribuições do mindfulness às condições médicas: uma revisão de literatura. *Psicol saúde doenças.* 2018 Ago; 19(2):182-96.
- [3] Eisenlohr-Moul TA, Walsh EC, Charnigo RJ, Lynam DR, Baer RA. The "what" and the "how" of dispositional mindfulness: using interactions among subscales of the five-facet mindfulness questionnaire to understand its relation to substance use. *Assessment.* 2012; 19:276-86.
- [4] Tang YY, Holzel BK, Posner MI. The neuroscience of mindfulness meditation. *Nat Rev Neurosci.* 2015; 16:213-25.
- [5] Bowen S, Witkiewitz K, Clifasefi SL, Grow J, Chawla N, Hsu SH, et al. Relative efficacy of mindfulness-based relapse prevention, standard relapse prevention, and treatment as usual for substance use disorders. *Jama Psychiatry.* 2014; 71:547-56.
- [6] Cherkin DC, Sherman KJ, Balderson BH, Cook AJ, Anderson ML, Hawkes RJ, et al. Effect of mindfulness-based stress reduction vs cognitive behavioral therapy or usual care on back pain and functional limitations in adults with chronic low back pain a randomized clinical trial. *Jama-J Am Med Assoc.* 2016; 315:1240-9.



VII XI

**International Meeting of
Biosciences and Physiopathology**
**Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia**

- [7] Kuyken W, Warren FC, Taylor RS, Whalley B, Crane C, Bondolfi G, et al. Efficacy of mindfulness-based cognitive therapy in prevention of depressive relapse an individual patient data meta-analysis from randomized trials. *Jama Psychiatry*. 2016; 73:565-74.
- [8] Shi L, Zhang D, Wang L, Zhuang J, Cook R, Chen L. Meditation and blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Hypertens*. 2017; 35:696-706.
- [9] Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroentero*. 2015; 12:205-17.
- [10] Moreira AL. IBD Epidemiology: what is going on in the developing world? Results from 163,000 patients. *Gastroenterology*. 2018; 156(6):S-73
- [11] Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: New insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 2005; 54: 1481-91.
- [12] Hood MM, Jedel S. Mindfulness-Based Interventions in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin N*. 2017; 46: 859-74.
- [13] González-Moret R, Cebolla A, Cortés X, Baños RM, Navarrete J, Rubia JE, et al. The effect of a mindfulness-based therapy on different biomarkers among patients with inflammatory bowel disease: a randomized controlled trial. *Sci Rep*. 2020 Apr 08; 10:6071
- [14] Grossman P, Niemann L, Schmidt S, Walach H. Mindfulness-based stress reduction and health benefits - A meta-analysis. *J Psychosom Res*. 2004; 57: 35-43.
- [15] Brown KW, Weinstein N, Creswell JD. Trait mindfulness modulates neuroendocrine and affective responses to social evaluative threat. *Psychoneuroendocrino*. 2012; 37: 2037-41.
- [16] Bullis JR, Boe HJ, Asnaani A, Hofmann SG. The benefits of being mindful: Trait mindfulness predicts less stress reactivity to suppression. *J Behav Ther Exp Psy*. 2014; 45: 57-66.
- [17] Rodríguez RC, Victoria MC, Rojano EA, Yépez JP, Garfias HR, Cabrera REB, et al. Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A. *Front Integr Neurosci*. 2013 Dec 2; 7:86.
- [18] Brandtzaeg P. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Curr Opin Gastroen*. 2010; 26:554-63.
- [19] Gronwall DMA. Paced auditory serial-addition task - measure of recovery from concussion. *Percept Motor Skill*. 1977; 44: 367-73.
- [20] Russell G, Lightman S. The human stress response. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15(9):525-34.
- [21] Barros VV, Kozasa EH, Souza ICW, Ronzani TM. Validity evidence of the Brazilian version of the five facet mindfulness questionnaire (FFMQ). *Psic Teor e Pesq*. 2014 Jul/Sep; 30(3):317-27.
- [22] Aguado J, Luciano JV, Cebolla A, Blanco AS, Soler J, Campayo JG. Bifactor analysis and construct validity of the five facet mindfulness questionnaire (FFMQ) in non-clinical Spanish samples. *Front Psychol*. 2015; 6:404.
- [23] Batalla MB, Robledillo NR, González PS, Solano TC, Estruch SV, Moreno GH, et al. Increased salivary IgA response as an indicator of immunocompetence after a mindfulness and self-compassion-based intervention. *Mindfulness*. 2017 Oct 05; 9:905-13.
- [24] Heckenberg RA, Hale MW, Kent S, Wright BJ. An on-line mindfulness-based program is effective in improving affect, over-commitment, optimism and mucosal immunity. *Physiol Behav*. 2019 Feb 01; 199:20-7.
- [25] Fan Y, Tang YY, Ma Y, Posner MI. Mucosal Immunity modulated by integrative meditation in a dose-dependent fashion. *J Altern Complement Med*. 2010 Feb; 16(2):151-5.
- [26] Nyklíček I, Mommersteeg PM, Van Beugen S, Ramakers C, Van Boxtel GJ. Mindfulness-based stress reduction and physiological activity during acute stress: a randomized controlled trial. *Health Psychol*. 2013 March; 32(10):1110-3.
- [27] Benvenuti MJ, Alves ES, Michael S, Ding D, S Emmanuel, Edwards KM. A single session of hatha yoga improves stress reactivity and recovery after an acute psychological stress task – a counterbalanced, randomized-crossover trial in healthy individuals. *Complement Ther Med*. 2017 Oct; 35: 120-6.
- [28] Grossman P. Defining mindfulness by how poorly I think I pay attention during everyday awareness and other intractable problems for psychology's (re)invention of mindfulness: Comment on Brown et al. (2011). *Psychol Assess*. 2011; 23:1034-40.
- [29] Peter JR, Eisenlohr-Moul TA, Upton BT, Baer RA. Nonjudgement as a moderator of the relationship between present-centered awareness and borderline features: Synergistic interactions in mindfulness assessment. *Pers Individ Differ*. 2013; 55:24-8.
- [30] Tomfohr LM, Pung MA, Mills PJ, Edwards K. Trait Mindfulness is associated with blood pressure and interleukin-6: exploring interactions among subscales of the Five Facets of Mindfulness Questionnaire to better understand relationships between mindfulness and health. *J Behav Med*. 2014 June 03; 38(1): 28-38.



*Inovações na terapêutica
antitumoral e de feridas*



ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DA HIPERICINA ENCAPSULADA COM PLURÔNICO F-127 EM MODELO DE NEOPLASIA DO EPITÉLIO MAMÁRIO

Maria Vitória Felipe de Souza¹; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke²; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles²; Natália Lourenço Mari²; Vânia Ramos da Sela Silva³; Gabriel Batista César⁴; Renato Sonchini Gonçalves⁴; Wilker Caetano⁴; Noboru Hioka⁴; Marcia Edilaine Lopes Consolaro³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Laboratório de Citologia Clínica e ISTs, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Docente, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
e-mail: mariavitoriafesouza@gmail.com

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; hipericina; câncer de mama.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é o tumor maligno feminino mais frequente no mundo, depois do câncer de pele não melanoma, com uma incidência de 2,1 milhões de novos casos no ano de 2018. Neste mesmo ano, a estimativa de mortalidade para esse câncer foi de 627.000 óbitos, representando aproximadamente 15% de todos os óbitos por câncer entre as mulheres [1]. No Brasil essa neoplasia também ocupa o primeiro lugar em incidência e mortalidade por câncer na população feminina. Para cada ano do triênio 2020-2022, estima-se 66.280 novos casos, representando 29,7% do total de casos novos de cânceres entre as mulheres [2].

Os tratamentos disponíveis para o CM são realizados de acordo com o estágio da doença e fatores pessoais da paciente, sendo divididos em dois grupos: local (cirurgia e radioterapia) e sistêmico (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica) [3]. No entanto, esses tratamentos podem causar muitos efeitos adversos, além da aplicação e eficiência serem limitadas [4]. Assim, existe a necessidade de buscar novos fármacos para auxiliar no tratamento do câncer de mama.

Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) tem mostrado sucesso no tratamento de diversos tipos de enfermidades com células proliferativas, podendo atingir alvos específicos sem provocar efeitos colaterais sistêmicos ou danos nos tecidos saudáveis. Os agentes fotossensibilizantes utilizados nesta terapia normalmente são aplicados em baixas doses e a sua ativação só ocorre com um comprimento de onda apropriado, fazendo com que ele não tenha um efeito isolado [5, 6]. Quando ativado o fotossensibilizante pela luz, ocorre uma interação entre ele e o oxigênio molecular (O₂) que gera espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres, ocasionando a morte celular [7].

A hipericina, que é uma naftodiantrona, apresenta alta capacidade de gerar EROS após ativação com luz e por este motivo vem sendo explorada no tratamento de cânceres [8]. No entanto, ela é altamente lipossolúvel, o que diminui o seu potencial fotodinâmico e consequentemente a geração de EROS [9, 10]. O uso de sistemas de administração de medicamentos (Drug Delivery Systems - DDS) pode resolver este problema, pois estes são responsáveis por fornecer concentrações adequadas do medicamento no local de ação durante um longo período de tempo [11].

Os Plurônicos F-127 e P-123 são sistemas de administração de fármacos com resposta térmica da classe Pluronic®. Eles são capazes de solubilizar e estabilizar os estados monoméricos de fármacos de diferentes graus de hidrofobicidade, apresentando baixa toxicidade sistêmica, bioadesividade, estreita distribuição de tamanho e comportamento termo-dependente. Desta forma, atuam como protagonistas em estudos de desenvolvimento de plataformas de liberação de fármacos [12-14].

Embora o efeito fotodinâmico da hipericina sozinha, bem como da hipericina encapsulada com P-123 já sejam conhecidos para o câncer de mama *in vitro*, a ação da hipericina encapsulada com F-127 (HIP/F-127), até onde sabemos, não foi avaliada para câncer de mama. Sendo assim, estudos comparativos entre linhagens de CM são necessários para identificar a capacidade de ação da HIP/F-



127. Desta forma, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito antitumoral *in vitro* da hipericina encapsulada com F-127 em modelo de neoplasia do epitélio mamário, a fim de auxiliar na busca de novas opções de tratamento para o câncer de mama.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Foto-sensibilizador e fonte de luz

A HIP/F-127 liofilizada e a fonte de luz branca, que emite 6,33J/cm² em um comprimento de onda de 450 a 750 nm, foram fornecidos pelo Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) do departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

2.2. Linhagens celulares e condições de cultura

As linhagens celulares tumorais utilizadas foram, MCF-7: positiva para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2, e MDA-MB-231: negativa para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2. Uma linhagem celular não tumoral de mama, a MCF-10A, foi utilizada como controle. As linhagens celulares tumorais foram mantidas em frascos com meio de cultura DMEM e a linhagem não tumoral com o DMEM/F12, enriquecido com hidrocortisona, insulina e fator de crescimento epidérmico humano. Todas foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina B, mantidas sob atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 37°C.

2.3. Tratamento das células

A HIP/F-127 liofilizada foi reidratada com PBS estéril, em uma concentração de 100 µmol/L HIP/250 µmol/L F-127. As células utilizadas foram expostas as soluções diluídas de HIP/F-127 (0,4 – 2,2 µmol/L HIP e 1 – 5,5 µmol/L F-127) por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente, as células tratadas foram iluminadas por 15 minutos e incubadas na ausência de luz por mais 30 minutos. Para verificar uma possível interferência do Plurônico F-127 no crescimento celular, uma solução contendo 5,5 µmol/L de F-127 foi utilizada. Células não tratadas (NT) foram utilizadas como controle negativo.

2.4. Internalização Celular da HIP/F-127

A presença da HIP/F-127 no interior das células tumorais foi observada em microscópio de fluorescência invertido EVOS FL Cell Imaging System (Life Technologies) após a exposição das linhagens celulares tumorais por 30 minutos a uma solução de 1µmol/L HIP/F-127. Uma solução de hipericina diluída em DMSO (1µmol/L HIP/DMSO) foi utilizada para comparação.

2.5. Determinação da Citotoxicidade Celular da HIP/F-127

A citotoxicidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, que é baseado na redução do sal MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, por sistema enzimático mitocondrial que converte o MTT em um produto insolúvel denominado Formazan, o qual reflete o funcionamento normal da mitocôndria e, conseqüentemente, a viabilidade celular, que quanto menor, maior o efeito citotóxico do tratamento. As células foram plaqueadas (2,5x10⁵ células/mL) em placa de 96 poços e após atingirem confluência de 70-80%, foram tratadas de acordo com o item 2.3. O teste foi realizado em triplicata e os resultados obtidos foram utilizados para calcular os valores das concentrações inibitórias (IC), IC₃₀, IC₅₀ e IC₉₀, concentrações que inibem o crescimento celular de 30%, 50% e 90% das células respectivamente, quando comparadas com as células sem tratamento (NT). Para verificar a ação da HIP/F-127 na ausência de luz, os mesmos procedimentos foram realizados porém sem a iluminação.

2.6. Ensaio Clonogênico

A citotoxicidade a longo prazo foi analisada nas linhagens tumorais, e estas foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 600/células por poço. Após 24 horas, o tratamento foi realizado utilizando os IC₃₀ e IC₅₀. Após 7 dias e 14 dias do tratamento, as colônias foram fixadas e coradas com metanol e cristal violeta para a visualização e contagem das colônias.

2.7. Avaliação da Morfologia Celular após Tratamento com HIP/F-127

Com o objetivo de verificar possíveis alterações morfológicas decorrentes do tratamento, realizou-se o plaqueamento das células tumorais (1,5x10⁵ células/mL) e após a confluência foram analisadas as características celulares antes e após o tratamento. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência invertido EVOS FL Cell Imaging System (Life Technologies).

2.8. Ensaio de Migração – Teste da Ferida

Para avaliar a capacidade de migração das linhagens tumorais após o tratamento com HIP/F-127, as células foram plaqueadas (2,5x10⁴ células/mL) em placas de 6 poços. Após a confluência, foi realizado uma ferida utilizando ponteira de 1000µL em cada poço. Cada linhagem celular foi tratada com os IC₃₀ e IC₅₀. Um grupo de células NT foi utilizada como controle para comparação do fechamento da ferida.



2.9. Análises Estatísticas

Os dados foram analisados através da média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes. Para o cálculo dos valores de IC e análise estatística dos dados, utilizou-se o programa GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

A internalização da HIP/F-127 foi observada e registrada no microscópio de fluorescência invertido com filtro vermelho (RFV), através da fluorescência emitida (Figura 1 A e C), que foi superior à emitida pelas células tratadas com a solução de hipericina (1 μ mol/L) com DMSO (Figura 1 B e D).

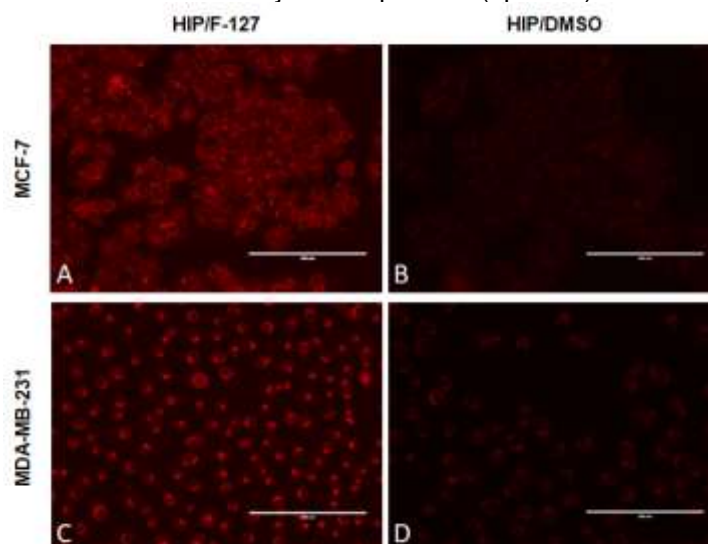


Figura 1. Imagens da internalização celular obtidas com o microscópio de fluorescência da MCF-7 (A e B) e da MDA-MB-231 (C e D) expostas a HIP/F-127 e a HIP/DMSO, respectivamente.

Para analisar o efeito citotóxico da HIP/F-127 nas células tumorais, o teste foi realizado na presença (Figura 2 A) e na ausência (Figura 2 B) de luz. Na presença de luz, os danos causados nas células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 foram significativamente maiores que o controle já a partir da primeira concentração testada ($p=0,0003$ e $p=0,0010$, respectivamente). Já na linhagem celular não tumoral MCF-10A, a viabilidade celular diminuiu significativamente ($p=0,0270$) somente a partir da terceira concentração testada. As células expostas a HIP/F-127 e não iluminadas não apresentaram alteração na viabilidade celular. Ainda, as células tratadas com a solução contendo só o F-127 e expostas à luz (NT) também não apresentaram alteração na viabilidade celular. A partir desses resultados, foram calculadas as IC₃₀, IC₅₀ e IC₉₀ para cada linhagem testada (Tabela 1).

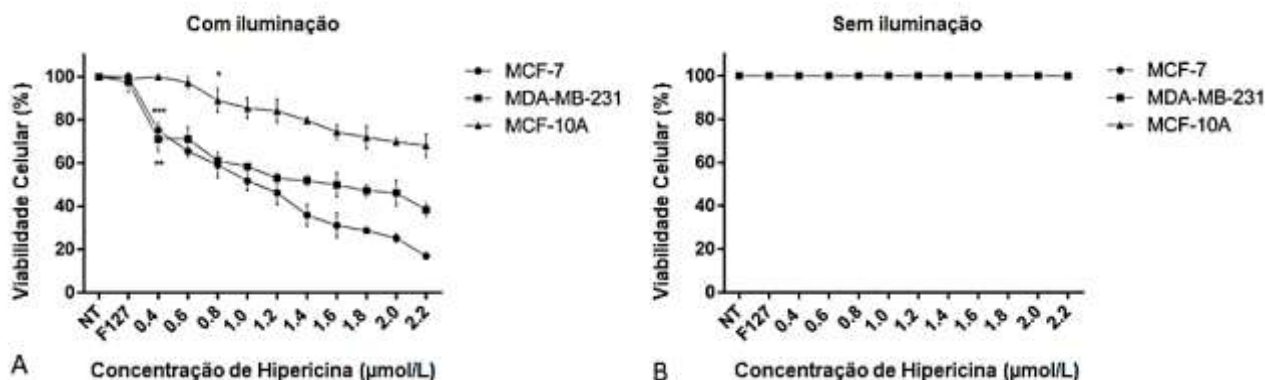


Figura 2. Efeito citotóxico da HIP/F-127 com (A) e sem iluminação (B) nas linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, e não tumoral de mama MCF-10A. NT: Não tratado.



Tabela 1. Valores de IC₃₀, IC₅₀ e IC₉₀ de HIP/F-127 em linhagens de câncer de mama

Linhagens Celulares	IC ₃₀ (µmol/L)	IC ₅₀ (µmol/L)	IC ₉₀ (µmol/L)
MCF-7	0,767	1,286	2,300
MDA-MB-231	1,189	1,981	3,566

IC: Concentração inibitória.

O potencial clonogênico da MCF-7 foi reduzido de forma dose-tempo-dependente, havendo redução na formação e na circunferência das colônias (Figura 3). Na MDA-MB-231 a redução foi total, não havendo crescimento de colônias após tratamento (Figura 4). Para ambas as linhagens celulares, a o potencial clonogênico foi significativamente reduzido nas concentrações testadas ($p < 0,0001$).

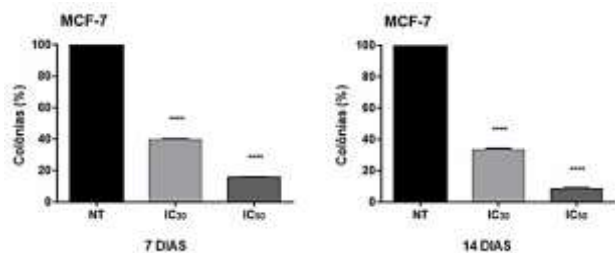


Figura 3. Potencial clonogênico da linhagem MCF-7 após 7 e 14 dias de exposição a HIP/F-127 com IC₃₀ e IC₅₀. NT: Não tratado.

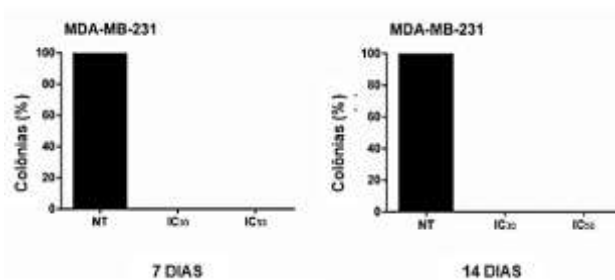


Figura 4. Potencial clonogênico da linhagem MDA-MB-231 após 7 e 14 dias de exposição a HIP/F-127 com IC₃₀ e IC₅₀. NT: Não tratado.

Na análise da morfologia celular antes e após o tratamento, foi possível visualizar que nas células tumorais tratadas a morfologia alterou a partir da primeira concentração testada (0,4 µmol/L HIP/F-127) bem como o descolamento das células que normalmente crescem aderidas (Figura 5).

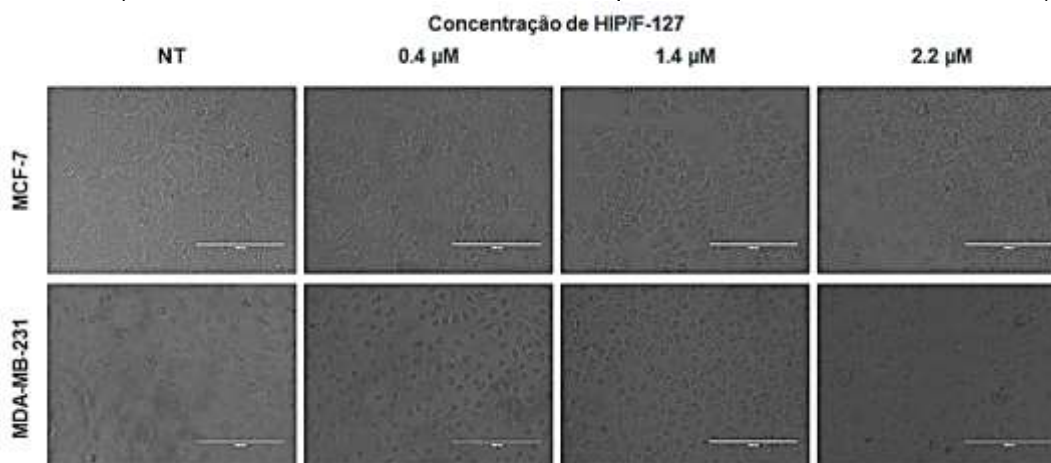


Figura 5. Alterações na morfologia celular promovidas pelo tratamento com HIP/F-127 em três concentrações diferentes (0,4, 1,4 e 2,2 µmol/L). NT: Não tratado.

O teste de migração celular mostrou que o tratamento com HIP/F-127 reduziu significativamente a migração na linhagem MCF-7 (Figura 6 A) em 24 horas, com IC₃₀ e IC₅₀ ($p = 0,0015$ e $p < 0,0001$, respectivamente) e em 48 e 72 horas ($p < 0,0001$), quando comparadas com as células NT.



As células MCF-7 não tratadas não fecharam completamente a ferida, porém é possível observar o aumento na porcentagem de seu fechamento com o passar do tempo. Na linhagem MDA-MB-231 (Figura 6 B), a redução da migração celular após o tratamento também foi significativa nos tempos de 24, 48 e 72 horas em ambas as concentrações utilizadas (IC_{30} e IC_{50}) em comparação com as células NT ($p < 0,0001$). As feridas não tratadas da linhagem MDA-MB-231 fecharam em 24 horas, enquanto as feridas tratadas permaneceram abertas em todos os tempos avaliados.

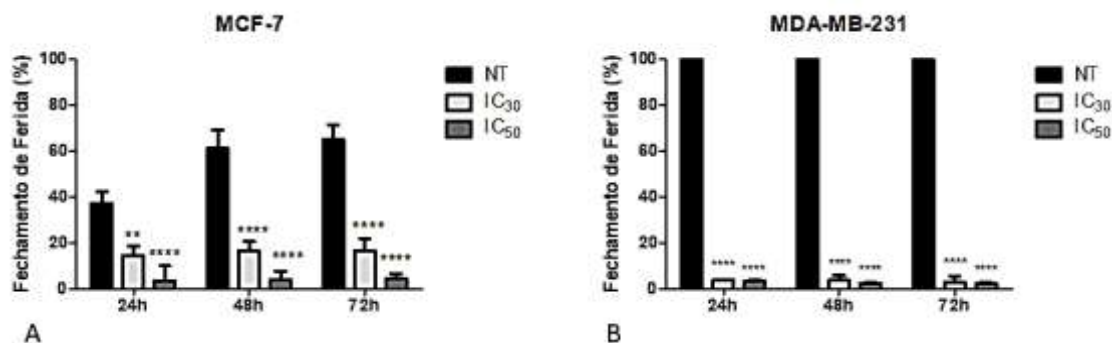


Figura 6. Porcentagem de fechamento das feridas após tratamento com HIP/F-127 (IC_{30} e IC_{50}), nas linhagens celulares MCF-7 (A) e MDA-MB-231 (B), em 24, 48 e 72 horas.

4. DISCUSSÃO

Poucas pesquisas foram realizadas utilizando a hipericina em linhagens celulares tumorais de mama. Até onde sabemos, nenhum estudo foi conduzido utilizando a HIP/F-127 em modelo de neoplasia do epitélio mamário. Neste trabalho, verificamos a atividade antitumoral da HIP/F-127 nas células MCF-7 e MDA-MB-231, a qual apresentou ação citotóxica dose-dependente, capacidade de alteração na morfologia das células, além de reduzir a migração celular destas linhagens tumorais.

A hipericina é um fotossensibilizante bastante empregado em terapias fotodinâmicas, no entanto, por ser lipossolúvel, a sua ação é prejudicada [9, 10]. O encapsulamento da hipericina com o Plurônico F-127 foi capaz de resolver este problema, visto que a fluorescência emitida na internalização foi evidente e maior quando comparada com as células tratadas com hipericina sem o plurônico. Ainda, o efeito citotóxico ocorreu somente na presença de luz nas células tumorais, a partir da concentração mais baixa testada ($0,4 \mu\text{mol/L}$ HIP/F-127). Na linhagem celular não tumoral só houve efeito citotóxico a partir da terceira concentração testada ($0,8 \mu\text{mol/L}$ HIP/F-127), demonstrando assim a seletividade da HIP/F-127 às linhagens celulares tumorais. Por ser um composto empregado em baixas doses e mais seletivo para células cancerosas [15], possui potencial de causar menos efeitos colaterais sistêmicos e/ou danos em tecidos saudáveis.

Na avaliação da citotoxicidade a longo prazo, a HIP/F-127, mesmo em doses subletais (IC_{30}), promoveu redução significativa no número de colônias nas duas linhagens tumorais, com redução total na MDA-MB-231, nos tempos de 7 e 14 dias, em comparação às células NT. Isto significa que as células diminuíram a sua capacidade de proliferação, o que sugere uma possível capacidade de prevenir a recorrência do câncer de mama.

Na análise da morfologia celular, a ação do tratamento ocorreu de forma dose-dependente, acarretando alterações morfológicas celulares com a diminuição da confluência e morte celular. No ensaio de migração celular, o tratamento levou à redução da migração das células tumorais já partir de 24 horas de tratamento em ambas as concentrações testadas (IC_{30} e IC_{50}), sugerindo uma possível diminuição na capacidade de formação de metástases.

De maneira global, os resultados obtidos neste estudo foram promissores em ambas as linhagens celulares avaliadas, mas foram mais evidentes na linhagem celular MDA-MB-231, que representa um câncer de mama mais agressivo (chamado de triplo negativo) e que não possui terapias específicas [16]. Sendo assim, a HIP/F-127 desponta como um agente promissor no tratamento deste tipo de câncer de mama.

O mecanismo de ação da HIP/F-127 em células tumorais de mama não está totalmente elucidado, e mais estudos são necessários para a compreensão das regiões celulares em que este tratamento atua, bem como qual via de morte celular ele promove.

5. CONCLUSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avaliou o efeito antitumoral da HIP/F-127 em modelo de neoplasia do epitélio mamário. Os resultados demonstraram que baixas concentrações de



HIP/F-127 promoveram efeito antitumoral. Ainda, o Plurônico demonstrou eficácia em solubilizar e entregar o fotossensibilizante adequadamente às células. Portanto, a HIP/F-127 é um agente promissor no tratamento do câncer de mama.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Citologia Clínica e ISTs e do Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

- [1] World Health Organization [Internet]. Cancer. Breast Cancer. [Acesso em 31/07/2020]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
- [2] Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil. [Acesso em 31/07/2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
- [3] Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Tratamento para o Câncer de Mama. [Acesso em 31/07/2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/acoes-de-controle/tratamento>
- [4] Olov N, Bagheri-Khoulenjani S, Mizardeh H. Combinational drug delivery using nanocarriers for breast cancer treatments: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2018; 106(8), 2272-2283.
- [5] Schuitmaker JJ, Baas P, Van Leengoed HL, Van der Meulen FW, Star WM, Van Zandwijk N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J Photochem Photobiol*. 1996; 34(1):3-12.
- [6] Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J. BUON*. 2018; 23(3), 561-567.
- [7] De Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-based drugs*. 2008.
- [8] Jendzelovsky R, Mikes J, Koval J, Soucek K, Procházková J, Kello M, et al. Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2009; 8(12):1716-1723.
- [9] Koralova H, Tomankova K, Bajgar R, Kolar P, Kubinek R. Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines. *Ultrasound Med Biol*. 2009; 35(8): 1397-1404.
- [10] Sun D, Yu LX, Hussain MA, Wall D, Smith RL, Amidon GL. In vitro testing of drug absorption for drug "developability" assessment: forming an interface between in vitro preclinical data and clinical outcome. *Curr Opin Drug Discov Dev*. 2004; 7(1):75-85.
- [11] Gerola AP, Estevão BM, Caetano W, Hioka N, Tessaro AL. Estudos Quimiométricos da phea formulada em Pluronic®: Ação Fotodinâmica sobre Artemia salina. *Quim Nova*. 2013; 36 (1), pp. 97-101.
- [12] Escobar-Chávez JJ, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. In vivo skin permeation of sodium naproxen formulated in pluronic F-127 gels: effect of Azone® and Transcutol®. *Drug Dev Ind Pharm*. 2005; 31(4-5), pp 447-454.
- [13] Junqueira MV, Borghi-Pangini FB, Ferreira SBdS, Bruschi ML. Evaluation of the methylene blue addition in binary polymeric systems composed by poloxamer 407 and Carbopol 934P using quality by design: rheological, textural, and mucoadhesive analysis. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016; 42(12), pp. 2009-2019.
- [14] Campanholi KdSS, Braga G, Da Silva JB, Da Rocha NL, De Francisco LMB, De Oliveira ÉL, et al. Biomedical platform development of chlorophyll-based extract for topic photodynamic therapy: mechanical and spectroscopic properties. *Langmuir*. 2018; pp. 8230-8244.
- [15] Chen B, de Witte PA. Photodynamic therapy efficacy and tissue distribution of hypericin in a mouse P388 lymphoma tumor model. *Cancer Lett*. 2000; 150(1):111-117. doi:10.1016/s0304-3835(99)00381-x
- [16] Guestini F, McNamara KM, Ishida T, Sasano H. Triple negative breast cancer chemosensitivity and chemoresistance: current advances in biomarkers identification. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2016; 20(6), 705-720.



AValiação DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA CRISINA EM CÉLULAS DE CâNCER CERVICAL EM MODELO DE CULTURA CELULAR 3D

Natália Lourenço Mari¹; Maria Vitória Felipe de Souza²; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles²; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke²; Tamy Tainne Suehiro Secco²; Analine Rosa Barquez de Assis Carvalho²; Cristiane Suemi Shinobu Mesquita⁴; Marcos Luciano Bruschi³; Marcia Edilaine Lopes Consolaro⁴; Vânia Ramos Sela da Silva⁴.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Laboratório de Citologia Clínica e ISTs, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
e-mail: nlmari95@gmail.com

Palavras-chave: câncer cervical; crisina; esferoides.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero ou câncer cervical (CC) é um importante problema de saúde pública. É o terceiro câncer mais incidente e o quarto com maior número de mortes entre as mulheres no mundo [1]. No Brasil, é o terceiro mais frequente, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, e o quarto com maior mortalidade entre as mulheres [2]. O número de casos estimados para o país, para cada ano do triênio 2020-2022, é de 16.710, com um risco estimado de 16,35 casos a cada 100 mil mulheres [3]. Esse grande número é preocupante, pois o CC é um tipo de câncer que possui prevenção primária através da vacinação e também prevenção secundária, por meio de técnicas de rastreamento como a colpocitologia oncótica (exame de Papanicolaou), que busca o rastreamento e detecção precoce das lesões pré-cancerosas, a fim de proporcionar um tratamento eficaz para estas, e assim evitar o câncer invasivo [4].

A infecção persistente pelo Papilomavirus humano (HPV) de alto risco carcinogênico (AR) é o principal fator envolvido no desenvolvimento do CC. O HPV-AR 16 é o tipo mais frequente na população em geral e é considerado o principal causador do CC, sendo responsável por aproximadamente 60% dos casos, seguido do HPV 18, relacionado a aproximadamente 15% [5].

O tratamento do CC depende do estágio de evolução da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais, como idade da paciente e desejo de ter filhos [6]. Entre os tratamentos utilizados estão a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia ou uma combinação de radioterapia e quimioterapia [4, 7]. As opções de tratamento com efeitos citotóxicos para evitar o avanço do CC ainda são limitadas, de modo que a busca de novos compostos terapêuticos é de extrema importância.

A terapia com produtos naturais ainda é pouco explorada para o CC, porém tradicionalmente, estes têm sido um recurso extremamente eficaz tanto para a descoberta quanto no desenvolvimento de medicamentos, por proporcionar uma enorme variedade de estruturas químicas [8].

Dentre esses compostos naturais está a crisina, flavonóide derivado da própolis, que tem sido investigada em uma ampla variedade de linhagens celulares de câncer tais como colon, pulmão, mama, fígado, próstata e leucemia, bem como em modelos tumorais animais, demonstrando propriedades anticâncer promissoras, principalmente por agir na inibição da proliferação celular e na apoptose [9,10].

Os efeitos anticâncer da crisina em CC foram pouco investigados até o momento, e mostraram inibição da proliferação celular e indução da apoptose em células HeLa [11], indução da ativação de p38 e NF kappaB/p65 [12], ação na resistência de morte celular induzida por TRAIL (ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF) [13] e indução da morte celular por impedir o ciclo celular e causar apoptose pela via caspase-dependente [14]. Estudos já realizados em nosso laboratório mostraram que a crisina apresentou efeito citotóxico frente às linhagens C33A, HeLa, SiHa e CaSki, derivadas de CC, agindo predominantemente pela via da apoptose. Além disso, também foi capaz de reduzir as taxas de invasão e migração celular nestas, evidenciando um potencial antimetastático (dados ainda não publicados).



Atualmente, os esferoides tumorais multicelulares vêm sendo explorados na pesquisa de câncer, pois são sistemas de cultura de células tridimensionais que mais se assemelham com tumores sólidos *in vivo*. A utilização destes esferoides apresenta desde curvas de resistência a drogas semelhantes ao encontrado em tumores sólidos como também restabelece características morfológicas e funcionais do seu tecido *in vivo*, sendo uma importante ferramenta em ensaios de citotoxicidade [15].

Sendo assim, este trabalho buscou avaliar o efeito antitumoral da crisina em células de CC, em modelo de cultura celular 3D, bem como padronizar este modelo no laboratório de Citologia Clínica e ISTs da Universidade Estadual de Maringá (LabCito/UEM).

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células epiteliais cancerosas cervicais: HeLa (HPV-18 positiva), SiHa (HPV-16 positiva), CaSki (HPV-16 e 18 positiva) e C33A (HPV negativa). Todas as linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo celular com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 37°C.

2.2. Padronização da formação dos esferoides

Para a formação de esferoides, foram testadas as quatro linhagens celulares de CC em duas técnicas diferentes:

- Gota suspensa em placas de Petri: Nesta primeira técnica, foram testadas gotas de 45 e 50 µL com concentrações de 4x10⁴ a 6x10⁴ células/mL que foram plaqueadas na tampa da placa de Petri e no fundo da placa foi adicionado 10 mL de PBS para manter a umidade em seu interior. Após três dias, cada gota foi transferida para um poço de uma placa de 96 poços revestida com 100µL de agarose e em seguida foi observado em microscópio óptico a formação do esferoide.
- Microplacas de cultura celular revestida com ágar: Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços revestidas com 100 µL de agarose, e foram testadas concentrações variando de 1x10⁴ a 6x10⁴ células/mL, e em cada poço foi adicionado 200 µL de células. Também foi avaliada a influência da centrifugação na formação dos esferoides, onde para as placas que foram centrifugadas foi usada uma rotação de 2.500 rpm por 1 minutos e por fim, as placas foram incubadas por três dias em estufa de CO₂.

2.3. Tratamento

A crisina (5,7 dihidroxiflavona) ≥98% de pureza foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), em uma concentração de 40 mM e estocada a uma temperatura de -20° C. As linhagens celulares foram expostas a diferentes concentrações da crisina (0,78 µM a 200 µM) por 48 horas. Células tratadas somente com DMEM ou DMSO (concentração final de 0,25%) foram utilizadas como controles negativos.

2.4. Ensaio de citotoxicidade em esferoides

Para este ensaio primeiramente foi realizada a formação da cultura celular em 3D, para isso, as células foram coletadas, contadas em câmara de Neubauer para uma concentração final de 6x10⁴ células/mL e adicionada 200µL em cada poço em uma placa de 96 poços contendo 100µL de agarose. Em seguida, a placa foi centrifugada usando 2.500 rpm por 1 minuto e incubada por 3 dias em estufa de CO₂. Após formação dos esferoides, foi realizado o tratamento e incubação por 48 horas. Para determinar a viabilidade celular foi realizado o ensaio de MTT, baseado na redução do sal de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio à formazan, no qual reflete o funcionamento normal da mitocôndria e, portanto, a viabilidade celular. Para isso foi preparada uma solução de MTT (2µM) e adicionada (50µL) nas células. Em seguida, a placa foi incubada por 4 horas em estufa de CO₂, protegida da luz. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 570 nm.

2.5. Ensaio citostático em esferoides

Para o ensaio citostático, os esferoides foram formados a partir de uma concentração de células de 1x10⁴. Após a formação, os esferoides foram tratados por 48 horas utilizando os IC₃₀, IC₅₀ e IC₉₀ determinados em modelo 2D, em estudo anterior realizado em nosso laboratório (HeLa: IC₃₀= 27,6µM; IC₅₀= 46µM e IC₉₀= 82,8µM e CasKi: IC₃₀= 36µM; IC₅₀= 60µM e IC₉₀= 108µM). Além disso, também foi avaliada a evolução dos esferoides não tratados, mantidos apenas com DMEM puro. Após o início do tratamento foi realizada a captura de imagens de cada esferoide com uma câmera acoplada a um microscópio invertido de campo claro (Moticam 2000, Motic©) à cada 24 horas registrando os tempos zero, 24 e 48 horas de tratamento. A análise das imagens e medições dos tamanhos das estruturas tridimensionais foram feitas pelo software MoticImages Plus 3.0.



2.6. Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prisma 5.0. A distribuição t de Student foi usada no teste de viabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

A partir da primeira técnica avaliada, gota suspensa em placa de Petri, não foi possível desenvolver os esferoides, pois durante a transferência da gota para o poço da placa de 96 poços o aglomerado de células se desmanchava.

A segunda técnica, realizada através de microplacas de cultura celular revestida com ágar, por sua vez, permitiu a formação dos esferoides, sendo então adotada para a padronização do modelo. Depois de testadas concentrações variadas de células e realização de ajustes nas etapas deste método, obteve-se melhores resultados na formação dos esferoides quando as placas contendo as células eram submetidas a centrifugação e em seguida eram mantidas em estufa. O meio era trocado após 48 horas para repor os substratos e então com 72 horas de formação, os esferoides estavam prontos para serem utilizados nos experimentos. As concentrações de células utilizadas variaram de acordo com a necessidade e objetivo do experimento. Para o teste de MTT, foi determinada uma concentração de 6×10^4 células/mL e para a avaliação citostática foi padronizado a concentração de 1×10^4 células/mL.

Dentre as linhagens celulares testadas para padronização da cultura tridimensional, houve sucesso na formação dos esferoides nas linhagens HeLa, SiHa e CasKi. À linhagem tumoral CasKi formou esferoides compactos e com bordas bem definidas, a HeLa produziu esferoides também compactos, porém com células marginais difusas. A SiHa formou esferoides de morfologia disforme, pouco compactos e também com células marginais difusas. Já a linhagem celular C33A, não formou esferoides, mas sim agregados frouxos, dimórficos e com pouco contato intracelular, dessa forma, não houve sucesso na padronização da formação de esferoide para a linhagem C33A, sendo esta excluída dos experimentos posteriores.

O ensaio de MTT foi realizado, por enquanto com a linhagem celular SiHa, onde foi possível determinar a curva-resposta da crisina. Para isso, os esferoides foram expostos a doses crescentes de crisina por 48 horas e observou-se que esta droga possui ação citotóxica e atua de forma dose-dependente na linhagem celular SiHa (figura 1). O DMSO diminuiu discretamente a viabilidade das células apenas nas duas concentrações mais altas testadas (100 e 200 μM), mesmo assim a crisina reduz a viabilidade das células duas vezes mais. Os ICs para a linhagem celular SiHa estão descritos na tabela 1.

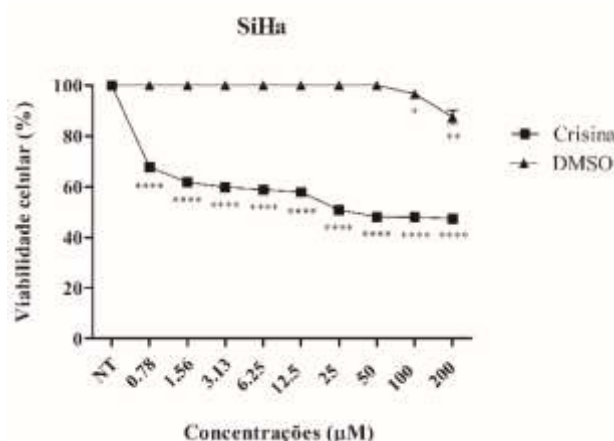


Figura 1. Curva de dose-resposta indicando a viabilidade das células SiHa em 48 hora de tratamento.

Tabela 1. Valores de ICs determinado a partir do ensaio de MTT.

SiHa			
	IC ₃₀	IC ₅₀	IC ₉₀
Crisina	12,8 μM	20,13 μM	36,23 μM

IC₃₀, IC₅₀ e IC₉₀: concentrações que inibem a 30, 50 e 90% da viabilidade celular quando comparado com o controle negativo.

Na avaliação citostática, apesar de não ter sido estatisticamente significativo, foi possível observar visualmente que as linhagens celulares HeLa e CasKi apresentaram uma redução no tamanho dos esferoides após o tratamento com crisina, principalmente nos IC₅₀ e IC₉₀ (figura 2). Para SiHa não foi possível realizar essa análise, pois com a concentração de células utilizada para esse experimento, os esferoides formados não se mantiveram íntegros após a manipulação para troca de meio de cultura e adição do tratamento.

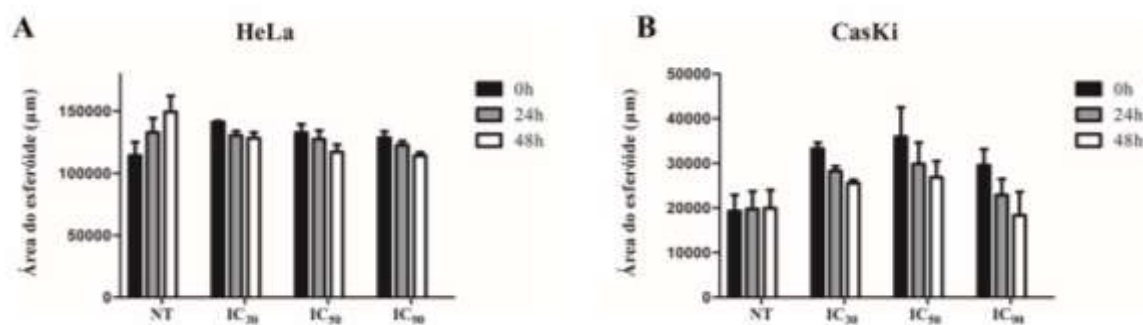


Figura 2. Figura mostrando as variações na área dos esferoides formados pela linhagem celular HeLa (A) e CasKi (B) tratados e não tratados com crisina.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o modelo de cultura 3D foi padronizado para as células HeLa, SiHa e CasKi utilizando a técnica de microplacas de cultura celular revestida com ágar, já que na técnica da gota suspensa o aglomerado de células se desfazia durante o processo de transferi-los da placa de Petri para a placa de 96 poços revestidas com agarose, inviabilizando sua utilização, uma vez que o objetivo desta técnica era facilitar o início da formação do esferoide.

Além disso, foi observado que a quantidade de células utilizada para iniciar a formação do esferoide também influencia nas características dos esferoides formados. Ainda, a centrifugação da placa também contribui para facilitar a formação destes e para formar apenas um esferoide por poço, já que aproxima todas as células em uma mesma área. Dentre as quatro linhagens celulares de CC, apenas a C33A não formou esferoides, entretanto isso não prejudica o estudo, pois ainda é possível avaliar a ação da crisina em outras três linhagens tumorais de CC.

No ensaio de MTT, por enquanto, foi avaliado a viabilidade das células apenas na linhagem celular SiHa, pois seus esferoides se desarranjam mais facilmente para a avaliação da citotoxicidade. Assim, observou-se que a ação da crisina, nesta linhagem celular, foi mais potente no modelo 3D do que no modelo 2D. Estudos já realizados em nosso laboratório com crisina em células de CC, determinou, para a SiHa, um IC₅₀ de 35µM após 48 horas de tratamento. Já com esferoides, o IC₅₀ em 48 horas de tratamento foi reduzido para 20,13µM de crisina. Esse fenômeno já foi observado em outros estudos. Um trabalho que avaliou novas drogas para células de hepatocarcinoma (HepG2) e câncer metastático de próstata (DU145) também encontrou um IC₅₀ menor em esferoides do que em monocamada no mesmo tempo de tratamento. Esse estudo supõe que a maior sensibilidade dos esferoides frente ao tratamento pode estar relacionada com mecanismos moleculares de sinalização, como a superexpressão de alguns receptores nos esferoides [16].

Na avaliação citostática foi usada uma concentração menor de células, isso inviabilizou a formação dos esferoides com a linhagem celular SiHa, fazendo com que a estrutura formada fosse mais frouxa e se desmanchasse. As linhagens celulares HeLa e CasKi formaram esferoides mais estruturados que permitiram a realização do teste. Para o tratamento desses esferoides foram utilizados os ICs definidos em monocamada, pois, por enquanto, ainda não foram estabelecidos esses valores no modelo de cultura celular 3D para essas linhagens tumorais em nosso laboratório. Analisando a área dos esferoides da HeLa foi possível observar um crescimento nos esferoides não tratados após 48 horas e uma redução neste crescimento nos tratados. Na linhagem celular CasKi também houve uma redução visível, através da microscopia, na área dos esferoides tratados comparado aos não tratados.

5. CONCLUSÃO

Através desse trabalho, a técnica de formação de esferoides foi padronizada no LabCito (UEM). Além disso, esse estudo mostrou que a crisina possui ação citotóxica na linhagem celular SiHa e indica uma ação citostática nas linhagens HeLa e CasKi. Estudos complementares serão realizados a fim de avaliar o efeito citotóxico da crisina nas demais linhagens celulares de CC, bem como para compreender a maior sensibilidade do esferoide à droga em comparação com o modelo em monocamada.



FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (001).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Citologia Clínica e ISTs (LabCito) da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

- [1] International Agency for Research on Cancer [Internet]. Global Cancer Observatory. Cancer Today. [Acesso em 05 ago 2020]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>
- [2] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. Estatísticas de câncer. [Acesso em 05 ago 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
- [3] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- [4] Colombo N, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Rollo D, Sessa C. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7: vii27-32.
- [5] Brianti P, Flammoneis ED, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiologica* 2017, 40(2): 80-85.
- [6] Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Controle do câncer do colo do útero. [Acesso em: 05 ago 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/fatores-de-risco>
- [7] Medina-Alarcon KP, Voltan AR, Fonseca-Santos B, Moro IJ, de Oliveira Souza F, Chorilli M, et al. Highlights in nanocarriers for the treatment against cervical cancer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 80:748-59.
- [8] Patel RV, Mistry B, Syed R, Rathi AK, Lee YJ, Sung JS, et al. Chrysin-piperazine conjugates as antioxidant and anticancer agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016; 88: 166–177.
- [9] Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, V AK, Gogoi R., Barua CC. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicol Lett.* 2015; 233(2): 214-25.
- [10] Khoo BY, Chua SL, Balaram P. Apoptotic Effects of Chrysin in Human Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci* 2010; 11: 2188-2199.
- [11] Zhang T, Chen X, Qu L, Wu J, Cui R., Zhao Y. Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorg. Med. Chem* 2004; 12: 6097-6105.
- [12] Von Brandenstein, MG, NgumAbety A, Depping R, Roth T, Koehler M, Dienes HP, Fries JW. A p38-p65 transcription complex induced by endothelin-1 mediates signal transduction in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1783, 1613-1622.
- [13] Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Abdelhamed S, Yokoyama S, Athikomkulchai S, Viriyaroj A, et al. Chrysin overcomes TRAIL resistance of cancer cells through Mcl-1 downregulation by inhibiting STAT3 phosphorylation. *International Journal Of Oncology* 2013; 43: 329-337,
- [14] Laishrama S, Moirangthem DS, Borah JC, Pal BC, Suman P, Gupta SK, et al. Chrysin rich *Scutellaria discolor* Colebr. induces cervical cancer cell death via the induction of cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Life Sciences*, V.143, P. 105–113. 2015.
- [15] Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *SeminCancer Biol.* 2005; 15(5): 365-77.
- [16] Bernardi MDL. Efeito e citostático de novos inibidores da mTOR em culturas bi e tridimensionais de câncer de próstata (DU145) e hepatocarcinoma (HepG2). [Dissertação]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo. 2018.



*Novas alternativas para
tratamentos antimicrobianos*



EVALUATION OF NEW THERAPEUTIC OPTIONS FOR PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

Bruna Lauton Simões¹; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini²; Daniella Renata Faria²; Karina Mayumi Sakita²; César Armando Contreras Lancheros³; Tania Cristina Alexandrino Becker⁴; Maria Sueli Felipe⁵; Isis Regina Grenier Capoci⁶; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁶; Érika Seki Kioshima⁶

¹Postgraduate student (Master's degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

²Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

³Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, PR

⁴Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringa, Maringa, PR

⁵Professor, Laboratory of Molecular Biology, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, DF

⁶Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR

e-mail: blautons@gmail.com

Keywords: Paracoccidioidomycosis; antifungal activity; specific drugs

1. INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis restricted to Latin America, in which Brazil is the country with the highest number of cases of this fungal infection. This chronic disease is responsible for approximately 51.2% of deaths caused by systemic mycoses [1-3]. PCM affects mainly male rural workers of productive age, since infection by the fungus *Paracoccidioides* spp is closely linked to soil manipulation, with inhalation of infectious propagules occurring during this practice [3-5]. Pulmonary involvement associated with irreversible fibrosis, respiratory and adrenal insufficiency are common complications in this mycosis [4, 6]. The drugs available for the PCM treatment belong to three classes: azoles, sulfonamides and polyenes represented by amphotericin B. Although the latter is the only option for the most severe cases of the disease, they have several side effects related to infusion and hepatotoxicity [7].

Therefore, the difficulties for PCM treatment are precisely in the prolonged use of antifungals with high toxicity and low efficiency, especially in solving pulmonary fibrosis. So, the search for new compounds is an urgent demand [8, 9]. The virtual screening tool has been used for drug discovery based on blocking specific pathogen targets. Thus, the molecule exerts its activity directly on the pathogen, thus reducing toxicity in the host. Furthermore, the aim of this study was to determine the efficacy of two compounds, previously selected by virtual screening, on the paracoccidioidomycosis model [10, 11].

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Determination of inhibitory concentration and minimum fungicide (MIC and CFM)

The MIC was performed by the microdilution method in broth according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [12], with modifications. The molecules were serially diluted in the plate. The inoculum suspension was adjusted to the final concentration of 1×10^4 cells/ml in the wells of the plate. For the negative control, the RPMI 1640 medium was only used and, for the positive control, the well must contain RPMI 1640 and inoculum. The MIC plates remained incubated for 7 days at 35 °C. The minimum fungicide concentration (CFM) was determined by subculture in brain-heart infusion agar (BHI), incubated for 7 days at 35 °C [13].

2.2 Checkerboard Assay

Synergistic interaction between amphotericin B (AmB) and the new molecule (separately) was performed by the microdilution checkerboard method. The plate was incubated for 7 days at 35 °C. On the sixth day was added to each well 0.02% of resazurin for visual evaluation of viability. The interpretation is given by determining the fractional inhibitory concentration (FIC) through the formula



$\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B$, where FIC_A is the combination $FIC \div MIC$ of the little compounds, and FIC_B is the combination $FIC \div MIC$ of the amphotericin B alone. Thus, it was considered strongly synergistic effect < 0.5 , synergic < 1 , an additive effect $= 1$, no effect $1 < FIC < 2$ and antagonistic > 2 [13].

2.3 Time-Kill Assay

P. brasiliensis were cultivated in McVeigh Morton culture medium for 10 days under stirring of 80 rpm at 35 °C, where, after adjusting the inoculum, untreated yeasts were used as a control group. In addition, two other groups were treated with different concentrations of the new molecule, distinctly, for 0, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days. During each period, each group was aliquoted, diluted and plated in BHI-agar supplemented. The plates were incubated for 7 days at 35 °C [14].

2.4 In vivo Assay

Balb/c male mice (20g) were infected via intratracheal with yeasts of *P. brasiliensis* and after 24 hours they were separated into groups containing 6 animals each and received treatment via intraperitoneal (CEUA nº 9810191015). The control group received no treatment. Another group received treatment with a molecule (5 mg/kg). After treatment, the mice were euthanized and the lung was removed. One part remained reserved for histopathology and the other part was weighed, macerated and plated in BHI-agar supplemented for colony forming units (CFU) determination. The plates were incubated at 35 °C for 7 days. For histopathology analysis the organs were fixed 4% paraformaldehyde and stained using the Hematoxylin-Eosin and Grocott (H&E with Grocott) technique [13, 15].

2.6 Scanning electron microscopy (SEM)

Yeasts of Pb18 were fixed by immersion in a solution containing glutaraldehyde and paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer (0.05 M), remaining overnight at room temperature. After that, the sample were washed in cacodilate buffer and dehydrated with increasing concentrations of alcohol. Lastly, yeasts were fixed on glass laminules with polylysin that were mounted on stubs, dried through the critical point and coated in gold for scanning electron microscopy in Shimadzu SS-550 Super Scan (Shimadzu, Tokyo, Japan). Two groups were used, distinguished by absence or presence of treatment [16].

2.7. Statistical analysis

The results were analyzed using Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) with the unpaired t-test. The values were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. RESULTS

The antifungal activity of LMM6 was evaluated against five isolates of *Paracoccidioides* sp., the minimum inhibitory concentration (MIC) values ranged from 0.25-2 µg/mL (Fig 1a). For all these isolates, the minimum fungicide concentration (MFC) values ranged from 0.5-4 µg/mL (Fig. 1b).

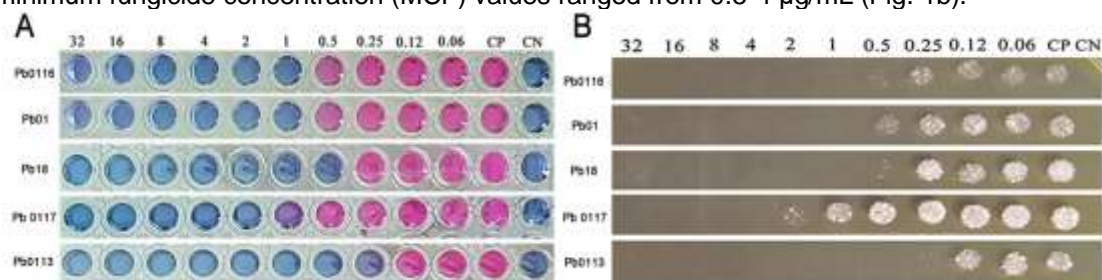


Figure 1. Sensitivity profile of *Paracoccidioides* isolates against visual growth inhibition treated with LMM6 compound. A) Minimum inhibitory concentration (MIC) with cell viability evaluated by the addition of resazurin solution. B) Minimal fungicide concentration (MFC) obtained by subculture of wells in BHI agar medium.

The five isolates of *Paracoccidioides* sp were also submitted to analysis of synergistic interaction of the conventional drug (amphotericin B - AmB) with this new molecule. The LMM6 showed a synergistic effect when combined with AmB, fractional inhibitory concentration (FIC) values ranged from 0.312-0.62. Thus, all isolates were classified as synergistic or strongly synergistic (Table 1). It is suggested that the combination of the two treatments presents better results if compared alone.



Table 1. Interaction profile of *Paracoccidioides* spp isolates with LMM6 compound and conventional Amphotericin B (AmB) compound

ISOLATES	LMM6 µg/mL		AmB µg/mL		Fractional Inhibitory Concentration (FIC)	
	Comb LMM6	MIC LMM6	Comb AmB	MIC AmB	Σ FIC	Rating
Pb0116	0.125	0.5	0.125	0.5	0.5	Synergistic
Pb01	0.125	1	0.125	0.5	0.5	Synergistic
Pb18	0.125	2	0.0625	0.5	0.62	Synergistic
Pb0117	0.125	2	0.0625	0.5	0.312	Strongly Synergistic
Pb0113	0.125	2	0.25	0.5	0.526	Synergistic

LMM6 showed promising antifungal effect, in which the 2xMIC concentration (2 µg/mL) showed a significant reduction in the colony forming unit (CFU) after 14 days of treatment (2 log₁₀) as compared to the control group (Figure 3a). The scanning electron microscopy showed morphological alterations in the yeast treated with LMM6, mainly rough surface and probable cell matrix extravasation (Fig. 3c). The control group presented cells with multi-budding (Fig. 3b).

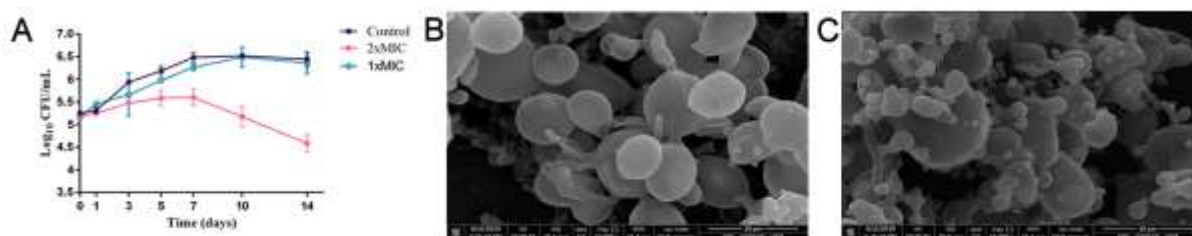


Figure 3. LMM6 antifungal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. A) Time-Kill curve of *P. brasiliensis* after exposure to LMM6 at different times (0, 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days). B) Scanning electron microscopy (SEM) of *P. brasiliensis* yeasts without treatment with LMM6 compound. C) Scanning electron microscopy (SEM) of *P. brasiliensis* yeasts treated with LMM6 compound (2 µg/ml).

The LMM6 showed promising *in vivo* antifungal activity. The group treated with LMM6 (14 days) showed statistical reduction ($p=0.02$) in the lung fungal burden compared to the control group (no treated). The histopathological analysis of the treated lungs shows large areas with preservation of lung tissue (Fig. 2c). While in figure 2b the tissue disorganization indicates the necrotic areas of the control group.

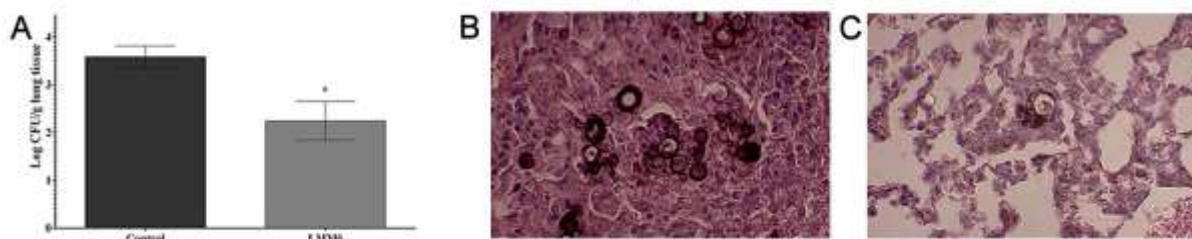


Figure 2. Evaluation of fungal burden in an experimental murine model for PCM. A) statistical reduction ($p=0.02$) of the pulmonary fungal load in mice treated with 5 mg/kg LMM6 compound. B) Histopathological analysis of lung of the control group (without treatment with LMM6 compound). Presents tissue injury and high fungal load. C) Histopathological analysis of lung of the group treated with LMM6 compound. Presents tissue preservation and low fungal load.

4. DISCUSSION

The treatment of paracoccidioidomycosis requires long periods and does not exclude the possibility of recurrences [17]. During clinical practice, there are few drugs used to treat PCM [18] and those available may cause toxic effects to the patient. The discovery of new antifungal classes is imperative. The application of bioinformatics tools such as virtual screening has allowed progress in the development of new drugs that seek molecules with selective action to the fungi and that minimize cellular damage to mammals.

The thioredoxin system participates in important functions for fungal vitality [19], in order to contribute effectively to prolong the useful life of organisms [20], given its complexity and interconnection with the functional state of cells, thioredoxin reductase (*trr1*) is a promising target for the development of new therapeutic options. Inhibitors of *trr1* reveal important characteristics of the new antifungals due to



their high selectivity and potency [21]. The MIC values of *trr1* inhibiting compounds in *Paracoccidioides* isolates ranged between 8-32 µg/mL [20]. LMM6 that presents structural characteristics similar to these reported compounds showed even better activity than the one described. The values obtained for MIC varied between 0.25-2 µg/mL and for MCF they varied between 0.5-4 µg/mL. Studies of compounds against isolates of *Paracoccidioides* spp that also have a specific target are described in the literature, and they present results similar. Inhibitors of chorismate synthase, the MIC ranged between 2-32 µg/mL [16]. A study with lapachol derivate, which has antimicrobial activity, showed MIC and MCF values between 3.90-62.50 µg/mL [22].

Treatment with Amphotericin B (AmB) is indicated for the severe PCM, however, it is a strong candidate to cause hepatotoxicity [20]. Further, the mechanism of action of AmB may favor the action of other compounds [10]. For these reasons, the choice of this conventional drug for the treatment of the disease was used to assess possible synergistic interaction with LMM6. The AmB MIC alone was 0.5 µg/mL for all isolates and, when combined with LMM6, showed reduction. The FIC values varied from 0.312-0.6, indicating a synergistic or strongly synergistic effect for all analyzed isolates. Similar results could be seen for *P. brasiliensis*, in which the FIC value was 0.281 [23].

The results found from the time-kill curve indicate that the compound LMM6 showed a promising antifungal activity against *P. brasiliensis*. The 2xMIC concentration induced a reduction >1 log₁₀ in the 10 and 14 days compared to the group that did not receive treatment. Studies previously carried out by our group with Pb18 also showed promising results, where the compounds LMM5 and LMM11 showed a reduction >3 log₁₀ in 14 days compared to the control group [13]. Thus, the SEM findings showed morphological changes resulting in extravasation of extracellular matrix from *P. brasiliensis*, suggesting that target inhibition of *trr1* can trigger damage of the fungal wall.

In addition, the *in vivo* assays showed very promising results with a 14 days treatment, confirming anti-*Paracoccidioides* activity. The significant reduction in pulmonary fungal burden in the treated group (LMM6) compared to the control group. Other studies of PCM experimental models have achieved similar results. The treatment with chalcones [24] and oxadiazoles derivatives [14] corroborating with our results. Histopathological analysis of mice treated with LMM6 showed maintaining lung architecture as compared to the control group that revealed irreversible damage. Thus, this treatment suggests an improvement in the face of irreversible sequelae such as pulmonary fibrosis found in treated PCM patients.

5. CONCLUSION

The LMM6 compound demonstrates a promising candidate for paracoccidioidomycosis treatment in accordance with the anti-*Paracoccidioides* results obtained *in vitro* and *in vivo* experiments.

FINANCIAL SUPPORT

CAPES and CNPq

REFERENCES

- [1] Shikanai-Yasuda MA, Telles FQF, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, Kono A, et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006, 39(3): 297-310
- [2] Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre FT et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *The Open Microbiology Journal*, 2017, 11: 224-282
- [3] Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, Camargo ZP. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Medical Mycology*, 2016, 54(3): 240-247
- [4] Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *Journal of Fungi*, 2017, 3(1): 1-13
- [5] Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Veja G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. *PLOS Pathogens*, 2014, 10(10): 1-5
- [6] Hahn RC, Fontes CJF, Batista RD, Hamdan JS. In Vitro Comparison of Activities of Terbinafine and Itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40 (8): 2828-2831
- [7] Goughenour KS, Rappleye CA. Antifungal therapeutics for dimorphic fungal pathogens. *Virulence*, 2017, 8(2): 211-221
- [8] Lino CI, de Souza IG, Borelli BM, Matos TTS, Teixeira INS, Ramos JP et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 151(10): 248-260



VII *International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*
XI *Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

- [9] Singulani JL, Scorzoni L, Lourencetti NMS, Oliveira LR, Consolaro RS, Silva, PB et al. Potential of the association of dodecyl gallate with nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: In vitro and in vivo efficacy and toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 547(1-2): 630-636
- [10] Bagatin MC, Rozada AMF, Rodrigues FAV, Bueno PSA, Santos JL, Canduri, F, et al. New 4-methoxy-naphthalene derivatives as promisor antifungal agents for paracoccidioidomycosis treatment. *Future Microbiology*, 2019, 14(3): 235-245
- [11] Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia, Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014, 14(16): 1923-1938
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 3rd ed. Approved standard CLSI M27- A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- [13] Rodrigues-Vendramini FAV, Marschalk C, Toplak M, Macheroux P, Bonfim-Mendonça OS, Svidzinski, TIE, et al. Promising New Antifungal Treatment Targeting Chorismate Synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 63(1): e01097-18
- [14] Rodrigues-Vendramini FAV, Faria DR, Arita GS, Capoci IRG, Sakita KM, Caparroz-Assef, SM et al. Antifungal activity of two oxadiazole compounds for the paracoccidioidomycosis treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2019, 13(6): e0007441
- [15] Castilho DG, Chaves AFA, Navarro MV, Conceição PM, Ferreira KS, da Silva LS, et al. Secreted aspartyl proteinase (PbSap) contributes to the virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(9): e0006806
- [16] Santos GD, Ferri PH, Santos SC, Bao SN, Soares CMA, Pereira, M. Oenothrin B inhibits the expression of PbFKS1 transcript and induces morphological changes in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*, 2007, 45(7): 609-618
- [17] Travassos LR, Tabora CP. New advances in the development of a vaccine against paracoccidioidomycosis. *Frontiers in microbiology*. 2012, 3: 212
- [18] Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles, F, Kono, ASG, Paniago, AM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. 2017, 50(5): 715-740
- [19] Godoy JS, Kioshima ÉS, Abadio AK, Felipe MS, de Freitas SM, Svidzinski TI. Structural and functional characterization of the recombinant thioredoxin reductase from *Candida albicans* as a potential target for vaccine and drug design. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016, 100(9): 4015-4025
- [20] Abadio AK, Kioshima ES, Leroux V, Martins NF, Maigret B, Felipe MS. Identification of New Antifungal Compounds Targeting Thioredoxin Reductase of *Paracoccidioides* Genus. *PLoS One*. 2015, 10(11): e0142926
- [21] Capoci, I, Faria, DR, Sakita, KM, Rodrigues-Vendramini, FAV, Bonfim-Mendonça, PS, Becker TCA, et al. Repurposing approach identifies new treatment options for invasive fungal disease. *Bioorganic chemistry*. 2019, 84: 87-97
- [22] de Sá NP, Cisalpino PS, Bertollo CM, Santos PC, Rosa CA, Souza DC, et al. Thiosemicarbazone of lapachol acts on cell membrane in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*. 2019, 57(3): 332-339
- [23] Rozada AM, Rodrigues FAV, Sampiron EG, Seixas FA, Basso EA, Scodro RBL, et al. Novel 4-methoxynaphthalene-N-acylhydrazones as potential for paracoccidioidomycosis and tuberculosis co-infection. *Future Microbiology*. 2019, 14: 587-598.
- [24] de Sá NP, Cisalpino PS, Tavares LC, Espíndola L, Pizzolatti MG, Santos PC, et al. Antifungal activity of 6-quinolinyl N-oxide chalcones against *Paracoccidioides*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015, 70(3): 841-845.



ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* E CARACTERIZAÇÃO DE PIPERINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA REVESTIDAS COM QUITOSANA

Carolina Trevisolli Palomo¹, Carla Maria Mariano Fernandez², Thaysa Ksiaskiewicz Karam², Letícia Sayuri Murase³, João Vítor Perez de Souza⁴, Giulienne Karla Pereira da Silva⁵, Renata Alexandre de Oliveira⁵, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli⁶, Benedito Prado Dias Filho², Rosilene Fressatti Cardoso⁶

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Laboratório de Bacteriologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: carolina_trevisolli@hotmail.com

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; piperina; nanopartículas poliméricas.

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Estima-se que 1,7 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas e podem desenvolver a doença [1].

O tratamento padrão para TB é poliquimioterápico, extenso e pode apresentar efeitos colaterais, sendo comum o abandono e o surgimento de bacilos resistentes. Essa é uma grande preocupação dos profissionais de saúde, sendo assim, há uma busca constante por novos candidatos a fármacos antituberculose, principalmente em casos de TB multirresistente.

A piperina (PIP) é um alcalóide extraído de *Piper nigrum* e possui diversas propriedades biológicas, entre elas a atividade antimicobacteriana [2-3], além de atuar como inibidor de bombas de efluxo em *Mtb* [4]. Outros estudos demonstraram a eficácia da combinação de PIP com fármacos anti-TB, tanto *in vitro* [2] como em estudos clínicos [5].

A utilização de nanopartículas (NPs) como carreadores de substâncias possui diversas vantagens devido às suas propriedades físico-químicas. NPs podem trazer melhorias na farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade de fármacos [6] por melhorarem a solubilidade aquosa de substâncias, protegerem os medicamentos de possíveis degradações e permitirem a sua biodistribuição controlada. O Poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA) é um co-polímero sintético, capaz de aumentar a penetração de medicamentos em diversos tecidos e barreiras, e tem sido muito utilizado no encapsulamento de substâncias, a fim de melhorar suas ações biológicas [7]. A quitosana é um biopolímero natural, que possui vantagens em sistemas para entrega de fármacos. Com propriedade mucoadesiva, é capaz de promover uma maior interação, adesão e retenção no epitélio intestinal, aumentando a permeabilidade de medicamentos [8-9].

Considerando o potencial anti-*Mtb* de PIP e as vantagens do uso de NPs, este trabalho teve como objetivo realizar o encapsulamento de PIP em NPs poliméricas de PLGA revestidas com quitosana, caracterizá-las e determinar sua citotoxicidade e atividade *in vitro* em *Mtb*.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais

Polímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) 50:50, peso molecular aproximadamente 19.000 (PLGA) (Acros, Brasil); PIP 97% (Sigma Aldrich, Brasil); Quitosana, baixo peso molecular (Sigma Aldrich, Brasil); álcool polivinílico (PVA) (Sigma Aldrich, Brasil).

2.2. Preparação de nanopartículas poliméricas de PLGA (NPLGA)

As NPs de PLGA contendo PIP revestida com quitosana (NPLGA) foram preparadas pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente [10], com algumas modificações. PLGA (50 mg) e PIP (5 mg) foram dissolvidos em 1 mL de diclorometano. As fases foram unidas e gotejadas numa fase aquosa de ácido polivinílico (1%, p/v) contendo quitosana (0,2% em ácido acético a 1%) e sonicada (5 min, 50% amplitude) para produzir uma emulsão óleo em água (O/A). A emulsão foi submetida a evaporação sob vácuo a 37°C para solidificação de NPs e purificado por ultracentrifugação (16000 rpm, 60 min, 20 °C). Após, as NPLGA foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapurificada.

2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com arranjo de fotodiodos (PDA)

A análise das NPs foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters 2695) com Arranjos de Fotodiodos (Waters 2998) (CLAE/PDA) usando o software Empower® para a aquisição dos dados. A separação foi realizada em uma coluna Gemini C18 (5µ, 250 x 4,6 mm). A fase móvel utilizada foi água/metanol isocrática (30:70 v/v) com fluxo de 1,0 mL/min. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio e filtradas em membrana HV (Durapore) em PVDF de 0,45 µm.

2.4. Curva analítica de piperina

A curva de calibração foi determinada na faixa de 300,0 – 3,1 µg/mL de PIP. Foram preparadas soluções em diferentes concentrações (300,0; 200,0; 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,2 e 3,1 µg/mL) em triplicata. As áreas dos picos referentes à PIP foram plotadas com as respectivas concentrações.

2.5. Porcentagem de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação de PIP foi determinada pelo método indireto através da quantidade de PIP livre na solução de NPLGA. A suspensão de NPs foi centrifugada a 16000 rpm por 60 minutos a 20°C. O sobrenadante foi recolhido, PIP livre foi extraída com clorofórmio e analisada por CLAE/PDA. A análise foi realizada em triplicata. A eficiência de encapsulação (% EE) foi determinada através da equação: %EE = (massa experimental/ massa teórica) x 100.

2.6. Quantidade de ativo (QA)

A quantidade de PIP incorporada nas NPLGA preparadas foi determinada pela razão entre a massa de PIP contida na suspensão de NPLGA e a massa da suspensão de NPLGA pesada para a determinação, multiplicada por 100. O resultado foi expresso em porcentagem de incorporação.

2.7. Caracterização macroscópica e microscópica das nanopartículas

A formulação foi analisada visualmente quanto a cor, aparência, consistência e separação de fase. A morfologia e homogeneidade das NPLGA formadas foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (JEM- 1400, JEOL, EUA). Uma gota da formulação foi aplicada em grade de cobre, recoberta por filme de carbono, retirando-se o excesso de água com papel filtro. Após, foi utilizado uma gota de ácido fosfotúngico 2,0% para o contraste, deixado em repouso por 10 min e o excesso foi retirado com papel filtro. A grade foi mantida em temperatura ambiente por 24 horas para a completa secagem.

2.8. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial Zeta

A determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das NPs foram obtidas pelo método de espalhamento de luz e potencial Zeta pelo método de mobilidade eletrostática, ambos a temperatura de 25 ± 0,1°C utilizando equipamento Litesizer 500 particle analyzer (Anton Paar, EUA). Para a realização das medidas as amostras foram diluídas em água ultrapurificada na proporção de 1:50.

2.9. Ensaio de liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* das NPLGA foi realizado em soluções de tampão fosfato-salino (PBS) em pH 7,4 e 1,2 com Tween 80 a 1,0% (p/v) em condições sink. As amostras foram analisadas por 96 h em pH 7,4 e por 2 h em pH 1,2 em diferentes intervalos de tempo e mantidas em constante agitação a 500 rpm a 37°C. A suspensão foi centrifugada a 16000 rpm por 15 min para separar PIP liberada das NPLGA. O precipitado foi disperso em meio de liberação e incubados até a próxima amostragem. A PIP livre foi quantificada por CLAE/PDA.

2.10. Estudos de estabilidade

As NPLGA foram armazenadas a 5°C e 25°C durante 60 dias. Em intervalos pré-determinados (15; 30 e 60 dias), as amostras foram analisadas quanto aos aspectos macroscópicos, como transparência, viscosidade e uniformidade, além de aspectos físicos-químicos como o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial Zeta. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados



foram processados e submetidos à análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

2.11. Citotoxicidade em células Vero

A avaliação da citotoxicidade para PIP, NPLGA e NPLGAB (nanopartículas poliméricas de PLGA brancas – sem PIP) foi realizada conforme metodologia descrita [11], com modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando células epiteliais VERO ATCC CCL81 a $2,5 \times 10^5$ células/poço com diferentes concentrações das amostras. Os dados foram calculados como a porcentagem de inibição e foi calculada a concentração de 50% de toxicidade celular (CC_{50}).

2.12. Atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*

A concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados e cepa de referência de *Mtb* H₃₇Rv, foi determinada por método descrito anteriormente [12]. As substâncias foram seriadamente diluídas em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. O inóculo bacteriano previamente padronizado foi adicionado aos orifícios contendo as diluições. As microplacas foram fechadas e incubadas a 35°C por 7 dias. Após esse período, resazurina 0,01% foi adicionada a cada orifício e as placas foram reincubadas por 24h. A mudança da cor azul para rosa pela redução da resazurina, foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco onde não houve mudança de cor.

3. RESULTADOS

3.1. Curva analítica de piperina

A geração da curva analítica de PIP e sua equação da reta (Figura 1) foi utilizada para os cálculos de eficiência de encapsulação e quantificação do ativo encapsulado nos ensaios de estabilidade.

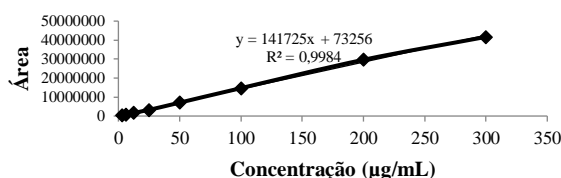


Figura 1. Curva de calibração da piperina.

3.2. Caracterização macroscópica e microscópica das NPLGA

As NPLGA apresentaram tamanho nanométrico, entre 465,80 e 621,60 nm, valores de índice de polidispersão entre 0,05 e 0,29 e valores de potencial Zeta positivos, entre 50,60 e 61,20 mV. Além disso, NPLGA obteve uma porcentagem de encapsulação de 98,97% e 0,494% de quantificação do ativo (Tabela 1). A MET revelou morfologias uniformes, esféricas, bem delimitadas e relativamente agregadas (Figura 2).

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas poliméricas.

	NPLGA	NPLGAB
Tamanho (nm)	465,80	621,60
Índice de polidispersão	0,29	0,05
Potencial Zeta (mV)	50,60	61,20
Porcentagem de encapsulação (EE%)	98,97%	-
Quantificação do ativo (%)	0,494%	-

NPLGA: nanopartículas poliméricas de PLGA contendo piperina revestida com quitosana; NPLGAB: nanopartículas poliméricas de PLGA brancas.

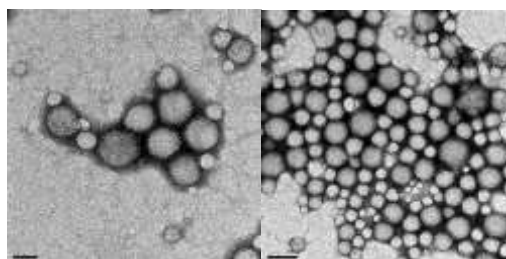


Figura 2. Imagens das nanopartículas poliméricas de PLGA contendo piperina por MET (3A, barra de escala 0,1 µm, 80.000x; 3B, barra de escala 0,2 µm, 10.000x).



3.3. Ensaio de liberação *in vitro*

Em pH 1,2 houve uma menor liberação de NPLGA, sendo de aproximadamente 2,83% em 2 horas e em pH 7,4 obtivemos uma liberação de 8,51% em 24 horas, aumentando esse percentual até 96 horas, porém, não ultrapassando 12% (Figura 3A e 3B).

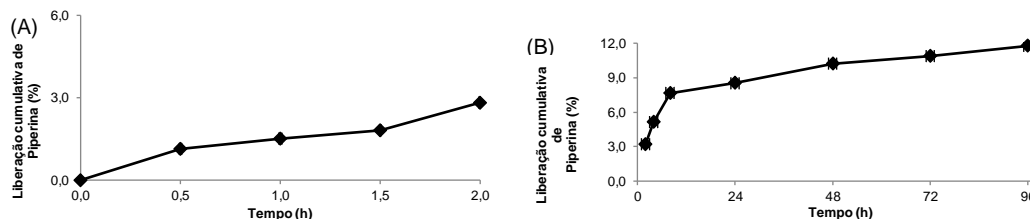


Figura 3. Perfil de liberação das NPLGA em pH 1,2 por 2 h (A) e em pH 7,4 por 96 h (B).

3.4. Estudos de estabilidade

Foram avaliadas temperaturas de 5 e 25°C, além de períodos de 15, 30 e 60 dias (Tabela 2). O diâmetro médio variou de 412,5 a 386,9 nm à 5°C e de 389,6 a 285,6 nm à 25°C. O índice de polidispersão sofreu mínimas variações em alguns momentos. O potencial Zeta obteve resultados elevados em todas condições testadas.

Tabela 2. Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial Zeta das NPLGA para estudos de estabilidade.

Temperatura	5 °C				25 °C			
	Dias	1	15	30	60	15	30	60
Parâmetro								
Diâmetro médio (nm)		446,1 ^a	412,5 ^{a,b}	379,1 ^b	386,9 ^b	389,6 ^b	354,5 ^c	285,6 ^d
Índice de polidispersão		0,21 ^a	0,17 ^a	0,13 ^b	0,18 ^a	0,18 ^a	0,06 ^c	0,18 ^a
Potencial Zeta (mV)		49,4 ^a	56,5 ^a	53,2 ^a	53,0 ^a	56,1 ^a	52,0 ^a	47,2 ^a

As médias, seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre elas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.5. Citotoxicidade em células Vero

NPLGA, NPLGAB apresentaram $CC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ e PIP $CC_{50} 160 \mu\text{g/ml}$, como observado na Tabela 3.

Tabela 3. Citotoxicidade em células Vero das nanopartículas poliméricas e PIP.

	$CC_{50} (\mu\text{g/ml})$
NPLGA	>1000
NPLGAB	>1000
PIP	160,50 ± 7,78

NPLGA: nanopartículas poliméricas de PLGA contendo piperina revestida com quitosana; NPLGAB: nanopartículas poliméricas de PLGA brancas; PIP: piperina.

3.8. Atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*

As CIMs das NPLGA e PIP para *H₃₇Rv* foi de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ e >500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Tabela 4). Nos isolados de *M. tuberculosis*, a CIM de NPLGA e PIP variaram de 62,5 a >500 $\mu\text{g/ml}$ e 31,25 a >500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.



Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cepa padrão e de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* para PIP, NPLGA e NPLGAB.

Isolados	Perfil de resistência	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
		PIP	NPLGA	NPLGAB
H ₃₇ Rv	S	62,5*	62,5	>500
M3	S	31,25	125	NR
M1	INH ^R	31,25	125	NR
PL-1	INH ^R	125*	250	NR
MDR-1	INH ^R	125*	125	NR
M2	INH ^R STR ^R	250	500	NR
PL-2	INH ^R , STR ^R	>500	>500	NR
MDR-2	RIF ^R , INH ^R , STR ^R , EMB ^R	31,25*	62,5	NR

S: sensível; R: resistente; INH: isoniazida; STR: estreptomicina; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; NPLGA: nanopartículas poliméricas de PLGA contendo piperina revestida com quitosana; NPLGAB: nanopartículas poliméricas de PLGA brancas; NR: não realizado; (*) necessita ser replicado.

4. DISCUSSÃO

O sinergismo de PIP com fármacos anti-*Mtb* já foi demonstrado em estudos prévios [2], mas sua baixa solubilidade aquosa influencia a biodisponibilidade nos tratamentos orais [13]. Diante disso, esse trabalho avaliou a PIP encapsulada em nanopartículas poliméricas revestidas com quitosana *in vitro*.

As NPLGA apresentaram coloração branca e aparência homogênea, esféricas, regulares, aglomeradas e com tamanho nanométrico (Figura 2), corroborando com valores de diâmetro médio encontrados pelo método de espelhamento de luz (Tabela 1). Partículas <200 nm são preconizadas pela nanomedicina, porém estudos revelam que partículas maiores podem permitir uma liberação mais lenta dos fármacos [14-15]. O índice de polidispersão indica que são relativamente monodispersas com distribuição de tamanhos homogênea [16]. O potencial Zeta caracteriza a carga superficial das NPs, influenciado pela sua composição [17-18]. Valores acima de ± 30 mV indicam estabilidade, pois impede a agregação das partículas, por isso, avaliamos as NPLGA como estáveis [18-19]. O polímero PLGA, em meio neutro, possui carga superficial negativa, atribuída aos grupos carboxil terminais, porém o valor positivo presente no sistema é devido aos grupos amino do polímero hidrofílico quitosana [8].

Houve uma maior liberação de PIP em pH 1,2, podendo ser devido à maior solubilidade de quitosana em pH ácido [8]. Mesmo assim, mais de 88% permaneceu encapsulada, indicando possível melhora na biodisponibilidade e liberação no organismo. Outros autores observaram que a presença de quitosana diminuiu liberação de fármacos, sugerindo uma forte interação entre os dois elementos [20-21]. Além disso, fármacos hidrofóbicos, devido à sua baixa solubilidade aquosa, possuem liberação inicial baixa [22-23].

No teste de estabilidade, o diâmetro médio das NPs obteve variações de valores, indicando uma diminuição no tamanho. Entretanto, o índice de polidispersão demonstrou que o sistema permaneceu monodisperso [16]. O potencial Zeta apresentou valores altos sem variações significativas. Além disso, macroscopicamente, houve homogeneidade na cor, sem separação de fases visualizadas. Diante disso, o sistema demonstrou estabilidade a 5 e 25°C durante os 2 meses analisados.

PIP livre apresentou CIM de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ para *Mtb* H₃₇Rv e CC₅₀ de 160,50 $\mu\text{g/ml}$, corroborando com resultados encontrados por Hegeto et al. [2]. As NPLGA mantiveram a CIM para *Mtb* H₃₇Rv e apresentaram CC₅₀ > 1000 $\mu\text{g/ml}$, demonstrando uma melhora intensa na citotoxicidade. Em todos os isolados testados, NPLGA apresentou CIMs superiores ou iguais à PIP livre. Entretanto, o sistema sintetizado possui uma liberação sustentada, como observado no ensaio de liberação *in vitro*, que pode interferir nesses resultados. NPLGAB não apresentou atividade anti-micobacteriana.

5. CONCLUSÃO

As NPLGA obtiveram resultados favoráveis quanto à síntese e caracterização, com uma alta eficiência de encapsulação, tamanhos nanométricos, um sistema monodisperso e cargas superficiais estáveis nas condições testadas. Além disso, em comparação com PIP livre, apresentaram intensa diminuição na citotoxicidade em células Vero sem perda na atividade anti-micobacteriana. Desta forma, as NPLGA possuem resultados promissores e um grande potencial para possível administração oral de PIP.

FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES (001).

REFERÊNCIAS

[1] WHO. WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control. Geneva; 2019. Disponível



VII XI

**International Meeting of
Biosciences and Physiopathology
Simposio de Biociências
Aplicadas à Farmácia**

- em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>>
- [2] Hegeto LA, Caleffi-Ferracioli KR, Nakamura-Vasconcelos SS, Almeida AL de, Baldin VP, Nakamura CV, et al. *In vitro* combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2018;111:35–40.
- [3] Atal CK, Raghvendra K, Dubey, Singh J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;258–62.
- [4] Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargotra A, Koul S, Khan IA. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1694–701.
- [5] Patel N, Jagannath K, Vora A, Patel M, Patel A. A Randomized , Controlled , Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Tolerability of Risorine with Conventional Rifampicin in the Treatment of Newly Diagnosed Pulmonary Tuberculosis Patients. *J Assoc Phys India*. 2017;65(September):48–54.
- [6] Costa-gouveia J, Aínsia AJ, Brodin P, Lúcia A. How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? *Drug Discov Today*. 2017;22(3).
- [7] Ebrahim W, El A, Mohamed EA, Soliman OAE. *In vitro – in vivo* evaluation of chitosan-PLGA nanoparticles for potentiated gastric retention and anti-ulcer activity of diosmin. *Int J Nanomedicine*. 2019;14 7191–7213.
- [8] Lima IA De, Khalil NM, Tominaga TT, Sarmento B, Mainardes RM, Angeli I, et al. Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol*. 2018;46(S2):S993–1002.
- [9] Shelma R, Sharma CP. Biointerfaces Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan. *Colloid Surfaces B*. 2011;84(2):561–70.
- [10] Ludwig DB, de Camargo LEA, Khalil NM, Auler ME, Mainardes RM. Antifungal activity of chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles containing amphotericin B. *Mycopathologia*. 2018;183(4):659–68.
- [11] Benassi-zanqueta É, Fernandes C, Nocchi SR, Filho BPD, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T. Parthenolide Influences *Herpes simplex virus 1* Replication *in vitro*. *Intervirology*. 2018;900:14–22.
- [12] Palomino J-C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Aug;46(8):2720–2.
- [13] Ashour EA, Majumdar S, Alsheteli A, Alshehri S, Alsulays B. Hot melt extrusion as an approach to improve solubility , permeability and oral absorption of a psychoactive natural product , piperine. *J Pharm Pharmacol*. 2016;
- [14] Dunne M, Corrigan OI, Ramtoola Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide- co -glycolide particles. *Biomaterials*. 2000; 21.
- [15] Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma W, Chakravarthi SS, Amidon GL et al. Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly (D,L -lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Release*. 2003; (92) 173–187.
- [16] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani HF, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018; 10, 57.
- [17] Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: A review. *Crit Rev Ther Drug*. 2002; 19(2), 99-134.
- [18] Singh R and Lillard Jr WJ. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*. 2012; 86(3): 215–223.
- [19] Ebrahim W, El A, Mohamed EA, Soliman OAE. *In vitro – in vivo* evaluation of chitosan-PLGA nanoparticles for potentiated gastric retention and anti-ulcer activity of diosmin. *Int J Nanomedicine*. 2019;14 7191–7213.
- [20] Chronopoulou L, Massimi M, Federica M, Cametti C, Conti L, Dentini M, et al. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;103:310–7.
- [21] Parveen S, Sahoo SK. Long circulating chitosan / PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur J Pharmacol*. 2011;670(2–3):372–83.
- [22] Cabezas LI, Gracia I, Lucas A De, Rodr JF. Validation of a Mathematical Model for the Description of Hydrophilic and Hydrophobic Drug Delivery from Biodegradable Foams: Experimental and Comparison Using Indomethacin as Released Drug. *Ind. Eng. Chem. Res*. 2014; 53; 8866-8873.
- [23] Mir M, Ahmed N, Rehman A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloid Surfaces B*. 2017;159:217–31.



FUNGICIDAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF A 1,3,4-OXADIAZOLE DERIVATIVE AGAINST *Candida albicans*

Daniella Renata Faria¹; Raquel Cabral Melo¹; Glaucia Sayuri Arita¹; Karina Mayumi Sakita¹; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini¹; César Armando Contreras Lancheros²; Isis Regina Grenier Capoci³; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça³; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski³; Erika Seki Kioshima³

¹Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

²Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Microbiology, State University of Londrina, PR

³Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, PR
e-mail: renata.daniella@gmail.com

Keywords: *Candida albicans*; 1,3,4-oxadiazole derivative; potential antifungal.

1. INTRODUCTION

Candida spp. is the most common cause of nosocomial bloodstream infections by fungal, responsible for over 90% of these cases [1,2]. *C. albicans* remains the most frequent species, isolated between 20-70% in clinical specimens [3,4]. Due to limited therapeutic arsenal for fungal infections treatment, that currently is based on polyenes, azoles or echinocandins [5] and increase of drug resistance [6], the search for new therapy has become an urgent need.

In silico approaches, such as virtual screening of chemical libraries against specific targets and drug repositioning have been performed to reduce the high cost and long time required for the development of new drugs [7]. One promising fungal target has been studied, is the thioredoxin reductase (Trr1), a flavoenzyme which mainly confers oxidative stress resistance [8]. Recently, the antifungal activity of two promising compounds that belong to the oxadiazoles class (LMM5 and LMM11) and that were selected by virtual screening focused on *C. albicans* Trr1 target were described against *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* and *Paracoccidioides* spp. [9,10]. In this study, was evaluated the antifungal activity, mechanism of action against *C. albicans* as well as the toxicity in murine model of LMM6 compound, which also belongs to the oxadiazole class and that was selected by *in silico* approach based on similarity to the LMM11 [9].

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemical Compounds

4-(N-ciclo-hexil-N-etilsulfamoil)-N-(5-(4-fluorofenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il) benzamide (LMM6) was purchased from Life Chemicals Inc. (Burlington, ON, Canada). Amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS), itraconazole (ITC) and fluconazole (FLC) were commercially acquired.

2.2. Antifungal susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC) of LMM6 (0.5-256 µg/mL), AMB (0.032-16 µg/mL), CAS (0.032-16 µg/mL), FLC (0.125-64 µg/mL) and ITC (0.032-16 µg/mL) were determined against 30 clinical isolates from *C. albicans* (approved by the Human Research Ethic Committee of State University of Maringá, COPEP no. 2.748.843) and reference strain (ATCC 90028) based on broth microdilution method (CLSI, M-27A3) [11], with modifications [10]. The minimum fungicidal concentration (MFC) and quantitative analysis were also performed as previously described [10].

2.3. Time-kill curve assay

LMM6 at concentrations of 16, 32, 64 and 128 µg/mL were incubated in 24-well plates at 35°C with yeast (2-3 x 10³ cells/mL) in RPMI-1640. Controls: drug-free (only culture medium) and fluconazole (FLC; 0.25 µg/mL). CFU were determined at time points 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 36 and 48 hours. The fungicidal activity was defined as a ≥ 99.9% (3 log₁₀) reduction in numbers of CFU [12].

2.4. Ethics statement

All animal procedures were performed according to Brazil's National Council for Animal Experimentation Control and approved by Ethics Committee for Animal Use (CEUA 3855010719).

2.5. Evaluation of the acute toxicity

The LMM6 acute toxicity in a single dose was evaluated according to the guide for conducting non-clinical toxicology and pharmacological safety studies necessary for drug development (Brazilian



Health Surveillance Agency [13]). Inbred male Balb/c mice (6-7 weeks old, 20-30 g), were randomly divided into five groups: HLTy (healthy animals; only PBS); IP control (treated intraperitoneally with the vehicle; PBS, DMSO 1%, and Pluronic F-127 0.2%); IV control (treated through the lateral tail vein/intravenous with vehicle); IP LMM6 (treated with 50 mg/kg of LMM6 intraperitoneally) and IV LMM6 (treated with 25 mg/kg of LMM6 through the lateral tail vein/intravenous). The hippocatic screening was performed at 0, 15, 30, 60, 120, 240 minutes and daily. Body weight was recorded daily. After the 14th day, the mice were anesthetized for blood collection and then euthanized. The organs, brain, heart, kidneys, liver, lungs and spleen were removed, weighed and the relationship between organ weight and body weight ($RW = \text{organ weight (g)} / \text{body weight on sacrifice day} \times 100$) was established.

The biochemical analysis (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine, urea and glucose) were determined according to the manufacturer's instructions (Gold Analisa Diagnóstica, Brazil). Haematology parameters (RBC; erythrocytes, WBC; leukocytes, platelet (PLT), haemoglobin concentration (Hb) and haematocrit (Ht)) were determined by classical methods. For differential leukocytes count was used May-Grunwald-Giemsa-stained. Hematimetric indexes were calculated: mean corpuscular volume ($MCV = Ht \times 10/RBC$); mean corpuscular hemoglobin ($MCH = Hb \times 10/RBC$) and mean corpuscular hemoglobin concentration ($MCHC = Hb/Ht \times 100$).

2.6. LMM6 antifungal activity in a murine model of systemic candidiasis

The female Balb/c mice (6-7 week-old, ± 20 g) was inoculated with *C. albicans* ATCC 90028 (5×10^5 yeast) by the lateral tail vein. Mice were randomly divided into three experimental groups ($n=6$): LMM6 (treated with LMM6 - 5 mg/kg), FLC (treated with fluconazole - 5 mg/kg) and Control (treated with diluent: PBS, DMSO and Pluronic® F-127). The treatment started after 3 hours of infection (twice a day for 5 days by via intraperitoneal). The mice were euthanized, kidneys and spleen were aseptically removed for determination of the fungal burden. The detection of systemic and local cytokines in serum and kidney, respectively, were conducted by flow cytometer (BD FACSCalibur™) with Mouse Inflammation Kit, as manufacturer's instructions. For histopathological analysis, kidney was stained with H&E and Grocott-Gomori [10].

2.7. Mechanism of action of the LMM6 compound

C. albicans (1×10^4 cells/mL) in RPMI-1640 was treated with LMM6 (8, 16, 32 and 64 $\mu\text{g/mL}$; shaking 90 rpm/35°C/8 hours). Three controls were prepared: drug-free control (only culture medium), conventional antifungal (AMB; 10 $\mu\text{g/mL}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2 ; 5 mM). The cells washed and resuspended with PBS. The cell membrane damage was analyzed by propidium iodide (PI; 1 $\mu\text{g/mL}$, for 10 minutes). The intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA ; 10 μM) –staining method for 1 hour in dark. The analysis were conducted by flow cytometer (BD FACSCalibur™) after staining. Transmission electronic microscopy (TEM) of yeast treated with LMM6 (16 $\mu\text{g/mL}$) at 35°C for 24 hours was prepared as previously described [10]. Cells without drug treatment served as the control. The images were obtained on a Zeiss 900 TEM2.

2.8. Statistical analysis

The data were evaluated as the mean \pm standard deviation (SD) using Prism 6.0 software (GraphPad). *In vivo* treatment was analyzed using unpaired Student's T-test and the other assays with one-way analysis of variance (ANOVA) using the Bonferroni. Statistically significant values ($p < 0.05$).

3. RESULTS

For LMM6, similar MIC values were reported (8-32 $\mu\text{g/mL}$) (Table 1). All *C. albicans* tested were susceptible to AMB and CAS (100% - 31/31). For FLC, 96.8% (30/31) were susceptible and 3.2% (1/31) was resistant. Whereas for ITC, 76.4% (24/31) were susceptible, 19.4% (6/31) dose-dependent-susceptible (SDD) and 3.2% (1/31) was considered as resistant.

Table 1. Antifungal susceptibility of 30 clinical isolates and *C. albicans* 90028 reference strain to LMM6 and conventional antifungal drugs.

Antifungal drugs	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Interpretation N (%)		
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Susceptible	SDD	Resistant
Amphotericin B	0.03 - 0.5	0.125	0.25	31 (100)	0 (0)	0 (0)
Caspofungin	0.03 - 0.25	0.125	0.25	31 (100)	0 (0)	0 (0)
Fluconazole	0.06 - >64	0.25	0.25	30 (96.8)	0 (0)	1 (3.2)
Itraconazole	0.03 - >16	0.125	0.25	24 (77.4)	6 (19.4)	1 (3.2)
LMM6	8.0 - 32	16	32	-	-	-

Abbreviations; MIC: minimal inhibitory concentration; SDD: susceptible-dose-dependent.



MIC₅₀ and MIC₉₀ were defined as antifungal concentration capable of inhibiting 50% and 90% growth of the isolates, respectively. LMM6 MIC were defined as the lowest concentration able to inhibit the growth $\geq 80\%$ as compared to positive control. Conventional antifungals MIC were determined visually and interpreted according to M27-S4 document [14].

The best activity of LMM6 was observed between 64-256 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1A), in which CFU reduction was $\geq 5 \log_{10}$ ($p < 0.05$). MCF results revealed a dose-dependent activity profile for LMM6 (Figure 1B). LMM6 showed better inhibitory effect than FLC from 6h (Figure 1C). Moreover, LMM6 showed fungicidal profile at three concentrations (32, 64 and 128 $\mu\text{g/mL}$). The reduction in the number of viable cells was $\geq 4 \log_{10}$ ($> 99.9\%$), as compared to control.

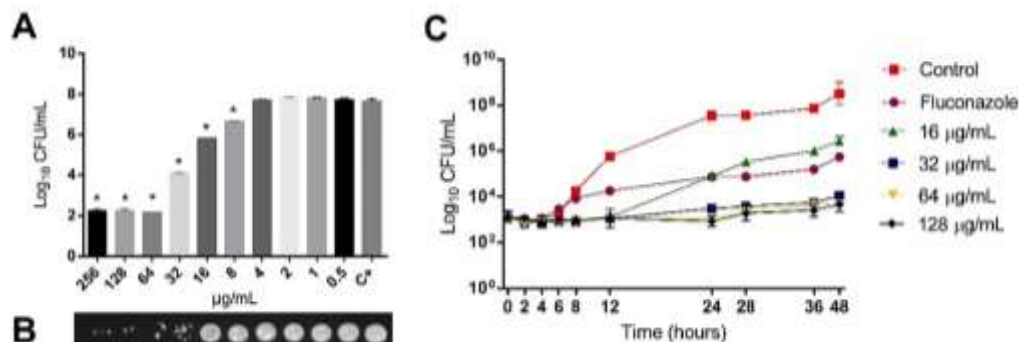


Figure 1. Fungicidal activity of LMM6 against *C. albicans* ATCC 90028. (A) Quantitative analysis by logarithm reduction of colony forming units. (B) Minimum fungicidal concentration (MFC). (C) Time-kill curves plotted from \log_{10} CFU/mL versus time (0-48 hours). Each data point represents the mean \pm standard deviation (error bars). *Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

The acute toxicity test showed that LMM6 caused no death in male mice during 14 days of observation. Reduction of locomotion, lethargy and piloerection were observed in mice treated with LMM6 or vehicle, but they returned to normal after 24 hours. Increased heart rate was also noted in all groups, including healthy mice, and returned to normal soon after manipulation. The relative weight of organs was not affected by treatment with LMM6 or vehicle. Except the lungs in the groups IP control (0.85 ± 0.09 g) and IV control (0.85 ± 0.08 g) that increased compared to the healthy group (0.57 ± 0.05 g; $p < 0.05$). For LMM6, the weight of the lungs was normal. Body weight was not affected by treatments.

LMM6 and vehicle did not cause significant changes in biochemical parameters when compared to healthy group. According to hematology analysis, MCHC index was decreased in mice treated with LMM6 (IP LMM6 $46.49 \pm 1.37\%$; IV LMM6 $45.27 \pm 1.03\%$) or vehicle (IP control $44.88 \pm 0.50\%$; IV control $45.92 \pm 0.73\%$) when compared to healthy group ($49.21 \pm 1.83\%$; $p < 0.05$). The platelet count only differed for mice treated with vehicle (IP control $570.00 \pm 125.79 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) in relation to healthy mice ($355.66 \pm 71.28 \cdot 10^3/\text{mm}^3$). For the other groups, there were no differences in platelet count. The others hematological parameters showed no significant change in the analyzed groups. The leukocytes differential count remained similar in all treated groups compared to the healthy mice. Only the total leukocytes values increased significantly in the group IV control ($10.0 \pm 2.6 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) when compared to healthy mice ($4.5 \pm 1.9 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0.05$).

The *in vivo* assay showed that LMM6 and FLC reduced the fungal burden in the kidney and spleen when compared to the control group ($p < 0.05$; Figure 2A and B).

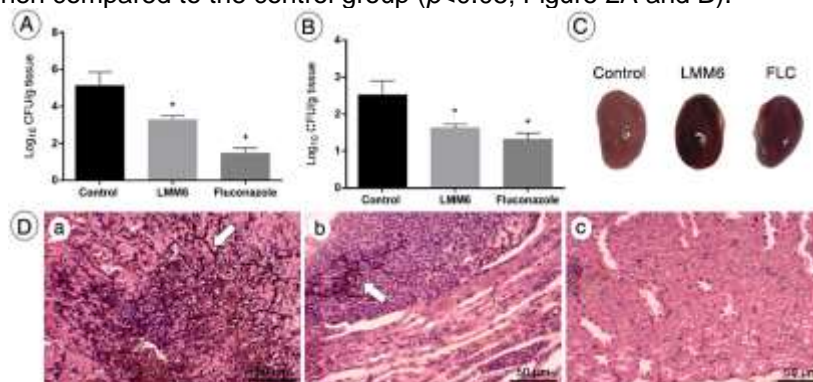


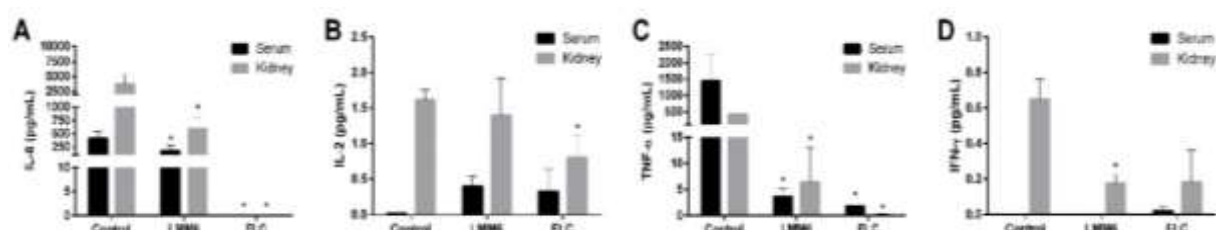
Figure 2. *In vivo* effect of LMM6 on treatment of mice with systemic candidiasis by *C. albicans*. Fungal burden in the kidneys (A) and spleen (B). *Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. (C) Macroscopic analysis of the kidneys. (D) Kidney histological section. White arrows indicate the presence of fungus in the tissue. Representative kidney histopathological sections from 5 mice per group.



Moreover, in the control group was observed white lesions visible covering the kidneys surface, while in LMM6-treated mice or FLC, the kidneys were apparently healthy (Figure 2C). Histopathological analysis showed tissue damage with increased presence of neutrophil infiltration and a large amount of yeasts and hyphae in the control group (Figure 2D a), which decreased considerably in the mice treated with LMM6 (Figure 2D b). For the FLC group, the fungal cells were not visible in the tissue (Figure 2D c).

LMM6 was able to reduce proinflammatory cytokine levels, similar to FLC (Figure 3). Four cytokines (IL2, IL6, IFN- γ and TNF- α) were detected in both serum and kidney. In serum, cytokines IL-2 and IFN- γ showed no significant differences in all groups tested. In the kidneys, IL-2 was reduced for FLC group e IFN- γ decreased for LMM6 ($p < 0.05$). In the serum and kidney, IL-6 and TNF- α presented reduction when treated with LMM6 and FLC as compared to control ($p < 0.05$).

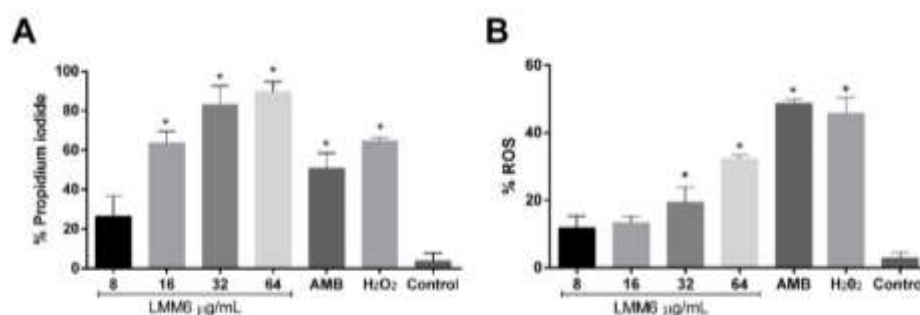
Figure 3. Cytokine detection in the kidney and serum of mice infected systemically with



***C. albicans* and treated with LMM6, fluconazole or phosphate buffered saline (PBS).** The analysis were conducted by BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit and was analyzed on BD FACSCalibur™ flow cytometer. Each data point represents the mean \pm standard deviation (error bars). *Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant in relation to control.

In order to determine the mechanism of action of LMM6, we investigated cell membrane damage and intracellular ROS accumulation by *C. albicans* cells treated with or without the compound. Analysis of the PI penetration using flow cytometry showed that LMM6 treatment induced an increase of stained cells in a dose-dependent manner (Figure 4A), that is, greater permeability of the dye due to the damage caused in the membrane. In addition, the effect of LMM6 was more pronounced than AMB and H₂O₂. Intracellular ROS levels were slightly elevated in cells after exposure to LMM6 at concentrations 8 and 16 μ g/mL. In contrast, high concentrations of LMM6 (32 and 64 μ g/mL) caused a marked ROS accumulation increase in *Candida* cells (Figure 4B). These findings indicated that LMM6 can induce the ROS accumulation in *C. albicans* cells in a dose-dependent manner.

Figure 4. Effect of LMM6 on the cell membrane integrity (A) and intracellular ROS accumulation



(B). The analysis were analyzed on BD FACSCalibur™ flow cytometer. Each data point represents the mean \pm standard deviation (error bars). *Statistically significant ($p < 0.05$) in relation to control.

The TEM results showed several ultrastructure alterations in the cells of *C. albicans* treated with LMM6, including irregular cell wall surfaces (ripple), regions of discontinuity of cell membrane, cytoplasm lacking a clear organization of organelles and cytoplasmic retraction, resulting in an increase in the space between the cell wall and the plasma membrane (Figure 5). The untreated yeast (control) showed continuous cytoplasmic membrane, regular and intact cell wall. These findings are in accordance with PI assay.

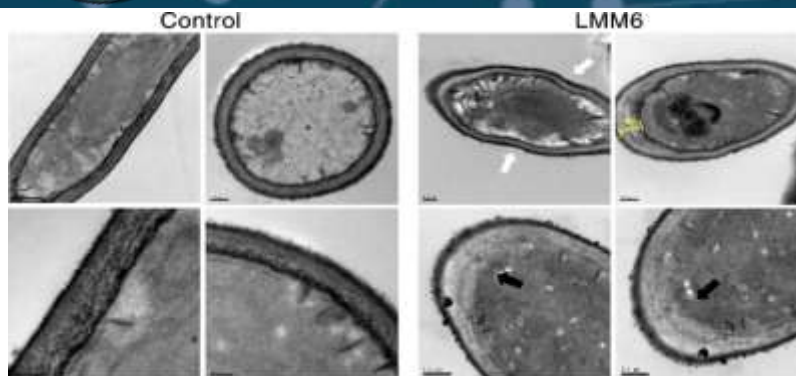


Figure 5. Representative transmission electron microscopy micrographs of *C. albicans* ATCC 90028. White arrows indicate irregular cell wall surfaces. Black arrows indicate regions of discontinuity of cell membrane and asterisk shows cytoplasmic retractions. The analysis was performed on at least 20 fields.

4. DISCUSSION

Limited therapeutic arsenal and increase of drug resistance has intensified the search for new antifungals [5,6]. Our group has been sought new therapeutic options by *in silico* approaches, as virtual screening based on compounds similarity. In this study, we demonstrated the promising effect of LMM6 in inhibiting the growth of *C. albicans*. Evidence showed that the fungicidal therapy yielded higher initial cure rates and reduced microbial persistence than fungistatic therapy in treatment of invasive *Candida* infection [15]. LMM6 presented a fungicidal profile with dose and time dependent activity.

Acute single-dose toxicity testing using small animal models is imperative in order to predict the adverse effects of a new therapeutic compound [13]. LMM6 administration (intraperitoneal or intravenous) was well tolerated, causing no modifications in clinical status, mortality or general behavior of animals. Both, body weight and organs relative weight were normal indicating no toxic effect in treated groups with LMM6. The body weight and the organ relative weight has been an important and sensitive parameter for toxicology studies [16]. The liver toxicity and renal injury are the first and second-leading cause of failure (drug attrition) associated with pharmaceutical development [17]. We highlight that no signals of hepatotoxicity and nephrotoxicity were found in the biochemical analysis of groups treated with LMM6. Similarly, hematological system analysis may assist in the determination of adverse effects of developing drugs [18]. LMM6 did not affect the various hematological parameters evaluated, except for MCHC index. Despite these differences, the values remained normal for this species [19].

In disseminated candidiasis, renal impairment is directly related to lethality in mice [20]. LMM6 was able to control *C. albicans* infection, reducing renal fungal burden and inflammation. Although neutrophils are crucial in the response against fungal, *C. albicans*-induced excessive infiltration of these cells into renal tissue during systemic candidiasis can result tissue damage [21]. LMM6 also caused reductions in pro-inflammatory cytokines, promoting homeostatic restoration. Similar data were found by Basso et al, in which treatment efficacy was associated with modulation inflammation [22].

Our data indicate that the antifungal effect of LMM6 against *C. albicans* appears to be related to its ability to cause damage to the cell membrane and to accumulate intracellular ROS. These results can be explained by the fact that LMM6 was selected as an analogue of LMM11, that is, it focuses on *C. albicans* *trr1*, which is important for oxidative stress resistance [8,9]. We hypothesized that inhibition of this target by LMM6 leads to loss of ability to maintain the redox state by cell *C. albicans* and generates an accumulation of intracellular ROS that damages the membrane, increasing its permeability and leading to fungal death. This effect could also be explored in the combination of compounds, since LMM6 could facilitate the entry of conventional drugs, improving the antifungal action as already described for its analogue in a previous study [10].

5. CONCLUSION

LMM6 demonstrated activity antifungal both *in vitro* and *in vivo* against *C. albicans* without showing hepatotoxic/nephrotoxic effects or altering the components of the blood. The membrane damage and the accumulation of intracellular ROS are part of the mechanisms of action by which LMM6 exerts its effects on *C. albicans*. These results are promising in view of the urgent need for alternative antifungal compounds to treat systemic mycoses and to prevent the development of fungal resistance.

FINANCIAL SUPPORT

Coordination of Superior Level Staff Improvement - CAPES (001) and National Council for Scientific and Technological Development - CNPq.



REFERENCES

- [1] Camargo LF, Marra AR, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PP, Medeiros EA, et al. Nosocomial bloodstream infections in a nationwide study: comparison between solid organ transplant patients and the general population. *Transpl Infect Dis*. 2015 Apr; 17(2):308–13.
- [2] Braga IA, Campos PA, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J Hosp Infect*. 2018 Jul; 99(3):318–24.
- [3] Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jun; 20(Suppl 6):5–10.
- [4] Cortés JA, Corrales IF. Invasive candidiasis: epidemiology and risk factors. In: Loreto ES, Tondolo JSM, editors. *Fungal Infection*, London: IntechOpen Limited; 2018.
- [5] Campoy S, Adrio JL. Antifungals. *Biochem Pharmacol*. 2017 Jun; 133:86-96.
- [6] Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. *Front Microbiol*. 2017 Jan; 7:2173.
- [7] Batool M, Ahmad B, Choi S. A structure-based drug discovery paradigm. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun; 20(11):2783.
- [8] Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000 Dec; 267:6102–9.
- [9] Kioshima ES, Svidzinski TIE, Bonfim-Mendonça PS, Capoci IRG, Faria DR, Sakita KM, et al. Composição farmacêutica baseada em compostos 1,3,4-oxadiazólicos e seu uso na preparação de medicamentos para tratamento de infecções sistêmicas. Brazil patent BR 10 2018 009020 8. May 2018.
- [10] Faria DR, Sakita KM, Capoci IRG, Arita GS, Rodrigues-Vendramini FAV, de Oliveira Junior AG, et al. Promising antifungal activity of new oxadiazole against *Candida krusei*. *PLoS One*. 2020 Jan; 15(1):e0227876.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI; 2008. CLSI standard M27-A3.
- [12] Scoreneaux B, Angulo D, Borroto-Esoda K, Ghannoum M, Peel M, Wring S. SCY-078 is fungicidal against *Candida* species in time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan; 61(3):e01961-16
- [13] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2013 [Accessed 5 February 2020]. Available in: <https://bit.ly/2OA6uWr>
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2012. CLSI standard M27-S4.
- [15] Kumar A, Zarychanski R, Pisipati A, Kumar A, Kethireddy S, Bow EJ. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive *Candida* infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. *Mycology*. 2018 Jan; 9(12):116–28.
- [16] Sellers RS, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol*. 2007 Aug; 35(5):751–5.
- [17] Accelerating the Development of Biomarkers for Drug Safety: Workshop Summary. 4, Assessing and Predicting Kidney Safety. [Accessed 4 Aug 2020]. Available in: <https://tinyurl.com/yxt42zm5>
- [18] Arika WN, Nyamai DW, Musila MN, Ngugi MP, Njagi ENM. Hematological markers of *in vivo* toxicity. *J Hematol Thrombo Dis*. 2016 Mar; 4:236.
- [19] Barbosa BS, Praxedes ÉA, Lima MA, Pimentel MML, Santos FA, Brito PD, et al. Haematological and biochemical profile of Balb-c mice. *Acta Sci vet*. 2017; 45:1477.
- [20] Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Filler SG. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J Infect Dis*. 2005 Aug; 192(2):336–43.
- [21] Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 May; 4:18026.
- [22] Basso V, Tran DQ, Schaal JB, Tran P, Eriguch Yi, Ngole D, et al. Rhesus theta defensin 1 promotes long term survival in systemic candidiasis by host directed mechanisms. *Sci Rep*. 2019 Nov; 9:16905.

Resumos simples



Bioquímica Clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

VARIÁVEIS PRÉ-ANALÍTICAS GERADORAS DE RECOLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO NO LABORATÓRIO DE ENSINO E PESQUISA EM ANÁLISES CLÍNICAS (LEPAC- UEM)

Amanda Antunes Herling¹; Eneide Aparecida Sabaini Venazzi²; Mariana Aparecida Oliveira Madia²; Eliane Valéria Patussi^{2,3}; Dennis Armando Bertolini^{2,3}; Luciana Dias Ghiraldi Lopes^{2,3}.

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

²Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), Universidade Estadual de Maringá

³Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O processo de análise laboratorial é dividido em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica, sendo cada etapa uma fonte potencial de erro. A fase pré-analítica concentra a maior periodicidade de erros associados a exames laboratoriais, todavia, é importante que os profissionais envolvidos nesse processo entendam que esta fase é crucial para um exame de qualidade.

Objetivo: Identificar causas de recoletas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC - UEM) com ênfase nos procedimentos de coleta de amostras biológicas e implantar medidas que auxiliem monitorar a fase pré-analítica por meio da implementação de indicadores de coleta. **Material e métodos:** O presente estudo foi executado através do acompanhamento semanal, das solicitações para recoletas de amostras biológicas dos pacientes atendidos, no LEPAC. Os dados foram coletados de Janeiro de 2015 a Julho de 2020, com intuito de reconhecer e monitorar fontes de erros, para prevenção de eventos adversos, ocorridos na fase pré-analítica dos exames laboratoriais. **Resultados:** Os dados foram separados por tipo de amostra biológica (sangue, fezes, urina e cultura de fungos) e foram tabulados os motivos das solicitações de recoletas do material biológico. Dentre elas estão as confirmações de resultados (11,04%), contaminação (18,51%) hemólise (32,38%) e outros fatores (33,86%), que compreende a troca de material biológico, amostra insuficiente, amostra coagulada, amostra coletada em tubo errado, identificação errada, amostra lipêmica e tempo de jejum insuficiente. **Conclusão:** Os indicadores pesquisados apontam outros fatores como a maior causa dos erros intercorrentes na fase pré-analítica entre os anos 2015 e 2020. A implantação da gestão de qualidade é importante, pois monitora erros e garante a qualidade da assistência. Treinamentos de instruções a novos colaboradores, assim como ações de incentivo à padrões exigidos da qualidade são importantes e devem ser explorados pelos laboratórios clínicos.

Palavras-chave: programa de garantia de qualidade; recoletas; amostras biológicas.

Área temática: Bioquímica clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA ATRAVÉS DE ANTIBIÓTICOS E PROBIÓTICOS TEM EFEITO POSITIVO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL NO ÍLEO DE RATOS

Camila Quaglio Neves¹; Stephanie Carvalho Borges²; Nilza Cristina Buttow³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Celular (PBC), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Pós-doutora em Biologia Celular (PBC), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Isquemia e reperfusão (IR) intestinal ocorrem quando há bloqueio do aporte sanguíneo ao tecido e posterior restabelecimento deste, com grande oferta de oxigênio, favorecendo a geração de espécies reativas de oxigênio que contribuem para o dano intestinal e sistêmico observado nessa patologia. **Objetivo:** Comparar os efeitos da manipulação da microbiota intestinal por antibióticos ou probióticos sobre o estresse oxidativo do íleo de ratos submetidos a IR intestinal. **Material e métodos:** Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais nº2869200218. Ratos *Wistar* machos foram distribuídos em 7 grupos (n=5). O grupo C foi somente anestesiado. Os grupos IRC, IRP e IRA sofreram oclusão da artéria mesentérica superior durante 45 minutos, seguido de 72 horas de reperfusão. Os grupos SC, SP e SA passaram pelos procedimentos cirúrgicos, porém sem isquemia. SA e IRA receberam metronidazol (100 mg/kg), vancomicina (100 mg/kg), neomicina (200 mg/kg) e ampicilina (1 g/L) por 72 horas antes e durante a reperfusão. SP e IRP receberam *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis*, *B. bifidum* ($8,3 \times 10^9$ UFC) 14 dias antes e durante a reperfusão. O íleo distal foi coletado para análise da atividade das enzimas glutationa-s-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em placa de 96 poços e espectrofotômetro. As análises estatísticas utilizadas foram One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey, com valores de $p < 0,05$ considerados significativos. **Resultados:** O quadro de estresse oxidativo foi observado no grupo IRC, caracterizado pelo aumento em todos os parâmetros analisados. Os probióticos (IRP) amenizaram as alterações oxidativas, observando-se aumento somente da CAT e SOD. Porém, os antibióticos (IRA) mostraram melhor desempenho contra o dano oxidativo, apresentando aumento somente na CAT. **Conclusão:** A manipulação da microbiota tem efeito positivo na redução do estresse oxidativo intestinal decorrente da IR, sendo a administração de antibióticos, mais efetiva nessa proteção.

Palavras-chave: artéria mesentérica superior; *Lactobacillus*; bactérias.

Financiador: CAPES

Área temática: Bioquímica clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL PROMOVE INFLAMAÇÃO NO PULMÃO DE RATOS WISTAR

Mariana Conceição da Silva¹; Karile Cristina da Costa²; Pedro Luiz Zonta de Freitas²; Lilian Catarim Fabiano³; Stephanie Carvalho Borges⁴; Camila Quaglio Neves⁴; Nilza Cristina Buttow⁵

¹ Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas (PBC), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

² Acadêmicos de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³ Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴ Acadêmicas de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas (PBC), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵ Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: Os quimioterápicos são constantemente utilizados nos tratamentos de cânceres, no entanto, apresentam vários efeitos colaterais. Alguns tem o papel de inibir a divisão celular a partir do bloqueio de síntese do DNA e RNA como o fármaco 5-Fluorouracil. Desta forma, ele consegue ser eficiente na redução de células tumorais. Por não ser um fármaco direcionado ao câncer ele afeta células normais e saudáveis e pouco se sabe sobre seu efeito no pulmão durante o tratamento quimioterápico. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da dose padrão do 5-FU sobre os parâmetros inflamatórios no pulmão de ratos *Wistar* saudáveis. **Material e métodos:** Foram utilizados 16 ratos *Wistar* machos divididos em grupo controle e tratado. A administração do 5-FU no grupo tratado foi realizada com dose clínica padrão de 15 mg/kg por 4 dias seguidos, 6mg/kg por 4 dias alternados, 15mg/kg no 14º dia e eutanásia no 15º. Os animais controle foram tratados com veículo (solução salina 0,9%). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Conduta e Ética CEUA (nº4422140918). Os animais foram eutanasiados e o pulmão coletado para avaliar a atividade enzimática das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-acetil-glicosaminidase (NAG). O óxido nítrico (NO) foi avaliado por meio indireto pela quantificação do nitrito por meio da reação de Greiss. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* de *Student*. **Resultados:** Houve o aumento estatisticamente significativo na atividade das enzimas MPO e NAG, também aumentaram os níveis de nitrito do grupo tratado com 5-FU em comparação ao grupo controle. **Conclusão:** O tratamento com a dose clínica padrão de 5-FU por 14 dias promove inflamação no pulmão de ratos saudáveis.

Palavras-chave: câncer; enzimas; fármaco.

Financiador (es): CAPES

Área temática: Bioquímica clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POTÁSSIO NO HUMOR VÍTREO DE RATAS WISTAR COMO CONTRIBUIÇÃO PARA A ESTIMATIVA DO INTERVALO *POST MORTEM*

Rafaela Daleffe Pepino¹; Amanda Regina Nichi de Sá²; Lilian Brites Campos Shimada³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Docente – Departamento de Parasitologia Básica, Universidade Estadual de Maringá.

³Docente – Departamento de Medicina, Centro Universitário Integrado.

Introdução: O intervalo *post mortem* corresponde ao intervalo entre a morte do indivíduo e o encontro do respectivo cadáver, e pode ser estimado por meio da avaliação da concentração de potássio (K^+) no humor vítreo que tende a se elevar com o tempo decorrente da morte. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi analisar a concentração de K^+ em humor vítreo de ratas Wistar no período de 2 a 24 horas após o sacrifício dos animais. **Material e métodos:** O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 3496/2018). Utilizou-se 16 ratas fêmeas da linhagem Wistar com 90 dias de idade (300 a 350 g). Os animais foram eutanasiados com uma mistura de 10 mg/kg de xilasina + 120 mg/kg de quetamina e, em seguida, foi realizada a coleta do humor vítreo do olho esquerdo (tempo 0) e do olho direito nos seguintes intervalos *post mortem*: 2, 4, 18 e 24 horas com $n = 4$ em cada intervalo. A concentração de K^+ foi avaliada pelo método de eletrodos íons-seletivos. A análise estatística foi realizada por teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Newman-Keuls (Graphpad Prism 5.0). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** Foi possível observar um aumento não significativo na concentração de íons de K^+ no humor vítreo de ratas Wistar, principalmente entre os intervalos de 2 a 18 horas após a morte. Houve maior dificuldade na coleta do humor vítreo nos intervalos com mais de 4 horas após o sacrifício dos animais, devido à quantidade de amostra em animais de pequeno porte. **Conclusão:** O nível de K^+ no humor vítreo de ratas Wistar não foi alterado de forma significativa nos intervalos *post mortem* avaliados, assim são necessários maiores estudos sobre a dosagem de potássio e sua aplicação para estimativa de intervalo *post mortem* na área de medicina legal.

Palavras-chave: medicina legal; humor vítreo; potássio.

Área temática: Bioquímica Clínica.



Citología clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CÂNCER DE COLO DO ÚTERO: UM OLHAR PARA O SEGUIMENTO

Eliane Cristina dos Santos Souza¹; Izabela Medina D'Ambros¹; Ana Caroline Costa da Silva²; Elayne Caroline Torres Pereira²; Eudilanay Ferreira Moura²; Danielle Rosa Evangelista³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas/TO

²Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas/TO

³Docente – Curso de Graduação em Enfermagem e Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas/TO

Introdução: A importância epidemiológica do câncer de colo do útero no Brasil e sua magnitude social, as condições de acesso da população brasileira à atenção oncológica fragilizadas, os custos cada vez mais elevados na alta complexidade refletem a necessidade de estruturar uma rede de serviços regionalizada e hierarquizada que garanta atenção integral à população. **Objetivo:** Monitorar o seguimento de mulheres com laudos alterados na região Capim Dourado do Tocantins. **Material e métodos:** Aprovado sob parecer nº 4.152.647, estudo do tipo avaliativo, realizado na macrorregião Capim dourado do estado do Tocantins, com amostra de 418 laudos de mulheres, em 2019. A busca ocorreu no sistema de informação de câncer, no módulo Monitoramento. As variáveis foram idade, presença de alteração no laudo, principais alterações e informações do seguimento (conduta e adequabilidade da conduta). Os dados foram analisados utilizando-se estatística descritiva simples. **Resultados:** A média de idade foi 39,03±14,7 anos. Dos 418 laudos analisados, 34 (8,13%) apresentaram alteração. Dos 34 (100%), 17 (50%) estavam em seguimento. As alterações atípicas em epitélio escamoso foi mais prevalente, 33 (97%). O único laudo com alterações atípicas em células glandulares foi de significado indeterminado. Apenas 7 (20,5%) a conduta foi adequada. As inadequações consistem em total ausência de condutas, quando o ideal seria o encaminhamento para colposcopia ou repetição do citopatológico. As lesões em células escamosas de alto grau e em epitélio glandular foram mais incoerentes nas condutas, o que demonstra menor qualidade no seguimento das mulheres. **Conclusão:** O seguimento não está ocorrendo de forma adequada para 100% das mulheres com laudos alterados o que pode estar associado aos elevados números de mortalidade por câncer de colo do útero no estado do Tocantins.

Palavras-chave: seguimento assistencial; neoplasias de colo do útero; laudos alterados.

Área temática: Citologia clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SEGUIMENTO NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Izabela Medina D'Ambros1; Eliane Cristina dos Santos Souza1; Ana Caroline Costa da Silva2; Elayne Caroline Torres Pereira2; Eudilanay Ferreira Moura2; Danielle Rosa Evangelista3

1Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas/TO

2Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas/TO

3Docente – Curso de Graduação em Enfermagem e Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas/TO

Introdução: Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo de útero subsidiam os profissionais da saúde em suas práticas assistenciais na tomada de decisão em relação à organização e estruturação da linha de cuidados da mulher com câncer do colo do útero. **Objetivo:** Monitorar o seguimento de mulheres com laudos alterados na região Ilha do Bananal, do Tocantins.

Material e métodos: Aprovado sob parecer nº 4.152.647, estudo do tipo avaliativo, realizado na macrorregião Ilha do Bananal do estado do Tocantins, com amostra de 329 laudos de mulheres, em 2019. A busca ocorreu no sistema de informação de câncer, no módulo Monitoramento. As variáveis foram idade, presença de alteração no laudo, principais alterações e informações do seguimento (conduta e adequabilidade da conduta). Os dados foram analisados utilizando-se estatística descritiva simples. **Resultados:** A idade média foi $38,31 \pm 9,8$ anos. Dos 329 laudos analisados, 16 (4,8%) apresentaram alteração. Dos 16 (100%), apenas 5 (31,25%) estavam em seguimento. Todas (100%) as alterações atípicas encontradas foram em epitélio escamoso. Apenas em 3 (18,75%) a conduta foi adequada. A inadequação mais prevalente consistiu em total ausência de conduta frente ao laudo, caracterizando desassistência à mulher. Das 16 alterações, 4 (25%) foram as lesões em células escamosas de baixo grau e em todas não houve nenhum encaminhamento ou conduta assistencial. Esses dados representam baixa qualidade no seguimento das mulheres na região Ilha do Bananal. **Conclusão:** A ausência de condutas ou o seguimento inadequado como o preconizado pelas evidências científicas acarreta em riscos importantes para a saúde das mulheres, onde se espera que seja adequada para 100% das mulheres com laudos alterados. Dessa forma, acredita-se que pode estar associado aos elevados números de mortalidade por câncer de colo do útero no estado do Tocantins.

Palavras-chave: cuidados de seguimento assistencial; câncer de colo do útero; laudos alterados.

Área temática: Citologia clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CELL INTERNALIZATION AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF HYPERICIN ENCAPSULATED IN PLURONIC® F-127 IN HUMAN CERVICAL CANCER CELLS

Lucimara Rodrigues Carobeli¹; Maria Vitória Felipe de Souza¹; Kayane Harumi Mashiba²; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke³; Gabriel Batista César⁴; Renato Sonchini Gonçalves⁴; Noboru Hioka⁴; Wilker Caetano⁴; Márcia Edilaine Lopes Consolaro⁵

¹Postgraduate student (Master's degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá

²Undergraduate student in Biomedicine, State University of Maringá

³Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá

⁴Professor, Department of Chemistry, State University of Maringá

⁵Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common in the female population worldwide and current treatments are not effective. Hypericin (HYP), isolated from plants of the genus *Hypericum perforatum*, is a potential photosensitizer for photodynamic therapy against tumors with selective cytotoxic effect. However, HYP presents high hydrophobicity and form aggregates in body fluids, that affect their photophysical and biological effects. Drug delivery systems, such as F-127 Pluronic® nanoparticles, can improve HYP solubility and bioavailability, however, this association has not yet been tested against cervical cancer. **Objective:** To evaluate cellular uptake and subcellular distribution of HYP encapsulated in F-127 (HYP/F127) in cervical cancer cells. **Material and methods:** Cell lines derived from cervical cancer, SiHa (HPV 16 positive) and CaSki (HPV 16 and 18 positive), and the spontaneously immortalized human epithelial cell line, HaCaT, were seeded in 24-well plates at a density of 1.5×10^5 cells/mL and were fixed overnight at 37 °C and 5% CO₂. To verify internalization, the cells were treated with 5 µmol/L of HYP/F127 for 30 minutes. To verify subcellular distribution, the cells were incubated for 15 minutes with probes for mitochondria (MitoTracker®, Invitrogen) and nucleus (NucBlue®, Live ReadyProbes®) and for 30 minutes with HYP/F127 (5 µmol/L). An inverted fluorescence microscope with DAPI (blue), RFP (red) and GFP (green) filters (EVOS®, Life Technologies) was used to observe the cells. **Results:** SiHa and CaSki cells showed high intensity of fluorescence emitted by HYP, mainly in the cytoplasm, when compared to HaCaT. In the overlapping images, we observed that the fluorescence of HYP/F127 coincides with the fluorescence of the mitochondria, but not that of the nucleus. **Conclusion:** HYP encapsulated in F-127 has a high capacity to permeate the cytoplasmic membrane and internalize in the cytoplasm and mitochondria of cervical cancer cells, reaffirming the potential of this association for photodynamic therapy.

Keywords: cervical cancer cell lines; hypericin; pluronic F-127.

Funding: CAPES

Thematic Area: Clinical Citology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ARTEPILLIN C INDUCES CYTOTOXIC EFFECTS ON BREAST CANCER CELLS THROUGH NECROSIS AND LATE APOPTOSIS

Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles¹; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke¹; Raquel Pantarotto Souza²; Edilson Damke²; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça²; Djaceli Sampaio de Oliveira Dembogurski³; Denise Brentan da Silva³; Marcia Edilaine Lopes Consolaro²; Vânia Ramos Sela da Silva²

¹Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá

²Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá

³Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul

Introduction: Breast cancer is a major public health problem and the leading cause of cancer death in women. Treatment options are limited and have several side effects. For this reason, there is an intense search for new antitumor agents, among them, derived from natural compounds. Artepillin C is one of the main constituents of some Brazilian propolis and demonstrated important activities including antitumoral effect, as preliminary studies of our research group conducted in breast cancer.

Objective: To evaluate the death pathways of artepillin C in two different human breast cancer cell lines. **Material and methods:** Cell lines derived from breast cancer, MCF-7 (positive for estrogen, progesterone, and HER2 receptors) and MDA-MB-231 (negative for estrogen, progesterone, and HER2 receptors) were seeded in 6-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/mL and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After 24h, the cells were treated with artepillin C (IC₅₀ for each cell line) for 48h. At the end of the treatment period, the cells were trypsinized, centrifuged, washed, and resuspended in an annexin-binding buffer. Then, they were stained with Annexin-V/FITC and PI for 15 minutes and analyzed in flow cytometry. Untreated cells were used as a negative control (NC). GraphPad Prism 6.0 software was used to analyze the data, in which significant differences among means were calculated using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test. **Results:** IC₅₀ doses of artepillin C induced significant necrosis and late apoptosis in MCF-7 cells ($p < 0.0001$ and $p = 0.0012$, respectively) and in MDA-MB-231 ($p < 0.0001$ for both), after 48h of exposure. **Conclusion:** These results show that artepillin C can significantly induce cytotoxic effects on breast cancer cells through necrosis and late apoptosis.

Keywords: breast cancer cell lines; artepillin C; cell death pathways.

Funding: CAPES

Thematic Area: Clinical Cytology

The background of the page is a light blue color with several darker blue, curved, flowing lines that create a sense of movement and depth. These lines are most prominent on the left side and curve towards the right.

Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SAÚDE MENTAL ADOLESCENTE: AVALIAÇÃO SOBRE DEPRESSÃO EM ESTUDANTES DE UMA CIDADE DE PEQUENO PORTE.

Ademilson José Bernardineli¹; Lincoln Luís Silva²; Raissa Bocchi Pedroso³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá/PR

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Os transtornos de ansiedade e depressão entre adolescentes aumentam de forma exponencial em todo mundo segundo a Organização Mundial da Saúde, no Brasil, pesquisas estimam uma proporção de 12,7% a 13,2% de depressão moderadamente grave a grave em adolescentes. Depressão nessa faixa etária é um verdadeiro problema de saúde pública, porém a presença desta enfermidade em adolescentes de cidades pequenas ainda é pouco estudada.

Objetivo: Rastrear a presença de depressão em adolescentes de 13 a 17 anos de um município de pequeno porte do noroeste do Paraná. **Material e métodos:** Foi realizado um inquérito com abordagem quantitativa por meio de um instrumento de rastreio de episódios depressivos, o PHQ – 9 (*Patient Health Questionnaire – 9*) em uma amostra de 324 estudantes de escolas do campo, da periferia e da região central do município de Marialva-PR. Foi calculada prevalência com intervalo de confiança de 95%, realizados em *software* Excel (versão 6.0). A pesquisa foi aprovada pelo comitê permanente de ética em pesquisa com seres humanos (UEM), parecer 3.764.136.

Resultados: 20,05% (65) estudantes foram caracterizados com depressão moderada a grave, 20,05% (65) com depressão grave, 24,1% (78) com depressão moderada, 20,05% (65) com depressão leve e 15,75% (51) com depressão mínima. Escolas da periferia apresentaram maior prevalência de depressão moderadamente grave a grave (46,3 %), seguida de escolas do centro (39,4%) e escolas do campo apresentaram menor prevalência (14,3%). **Conclusão:** É necessário haver mais comprometimento do poder público local das cidades de pequeno porte para acompanhamento da saúde mental dos adolescentes, investindo em apoio psicológico e acolhimento além de um maior envolvimento das escolas no combate e prevenção da depressão dos estudantes.

Palavras-chave: depressão; adolescente; saúde mental.

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

TAXA DE MORTALIDADE EM GESTANTES INFECTADAS COM HIV

Andressa Fumagalli Dacome¹; Gabriele Nascimento de Oliveira²; Dennis Armando Bertolini³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Em 2017 registrou-se mundialmente 3,6 mil óbitos em gestantes devido ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). Ao analisar o Brasil, há um aumento (38%) na detecção dos casos de gestantes HIV positivo, entretanto, dados relativos a mortalidade materna no país pela doença ainda permanece difíceis de serem encontrados em literatura. **Objetivo:** Verificar a taxa de mortalidade de gestantes devido a infecção por HIV no Brasil. **Materiais e métodos:** Dados obtidos pelo Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), que é de domínio público. Coletou-se informações através de filtros com base nos anos de 2014 a 2018, regiões do Brasil e óbitos maternos por HIV. Para calcular a mortalidade utilizou-se o coeficiente de 1.000.000 habitantes. **Resultados:** A maior taxa de mortalidade contemplada foi observada em 2015 no Norte (1,150), com aumento de 0,855 comparado a prevalência nacional da época (0,298). Notou-se que, apenas no Sudeste houve decréscimo da mortalidade ao longo dos anos, mantendo-se em declínio a partir de 2015. Tal como no Nordeste, esse índice permaneceu baixo de 2014-2017, porém em 2018 houve aumento de 0,137 em comparação a 2017 e acréscimo de 0,050 com relação à taxa nacional. Já no Sul, a prevalência permanece alta, com exceção de 2016, onde a mortalidade reduziu para 0,070, sendo inferior à média nacional (0,162). Enquanto no Centro-Oeste, somente em 2017 constatou-se prevalência superior a nacional (0,249; 0,161; respectivamente), sendo a segunda maior registrada no ano, abaixo apenas do Norte (0,337). **Conclusão:** Das cinco regiões do país, três (Norte, Nordeste e Sul) apresentaram tendência ao aumento dos óbitos em gestantes ocasionados pelo HIV. Logo, reforçamos a importância de novos estudos para melhor caracterização da epidemiologia da doença nessa população, devido à magnitude do resultado encontrado, e a necessidade de implantar programas de atenção à saúde da mulher ou a infecções sexualmente transmissíveis.

Palavras-chave: gestante; HIV; mortalidade.

Financiador (es): CAPES/CNPq

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COMPORTAMENTOS DE RISCO DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE ESCOLA CONFESSIONAL E NÃO CONFESSIONAL NO NOROESTE DO PARANÁ

Claudia Regina Marchiori Antunes Araújo¹; Letícia Maria Peloi Garcia²; Márcia Maria de Souza²; Emanuely Von Puttkammer Palma²

¹Docente da Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

²Acadêmica de Enfermagem da Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

Introdução: A adolescência é um período de modificações em que é comum que ocorra maior aproximação com grupos de outros adolescentes, bem como um afastamento da família, o que caracteriza uma época de maior vulnerabilidade e de exposição à riscos. **Objetivo:** Avaliar comportamentos de risco de estudantes do ensino médio de duas escolas, uma confessional e outra não confessional no noroeste do Paraná. **Material e métodos:** Estudo transversal com abordagem quantitativa. Participaram 99 alunos do ensino médio de uma escola confessional e 152 alunos de uma escola não confessional, selecionados por meio de amostragem aleatória estratificada. Foi utilizado um questionário do perfil sociodemográfico, e um instrumento validado (Estilo de Vida Fantástico), aplicados durante o período de aula. As análises foram realizadas através do Software STATA 12.0. A pesquisa foi autorizada pela instituição envolvida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer 3.632.714). **Resultados:** Dos entrevistados, 92,3% têm entre 14 e 18 anos. Respectivamente, da escola confessional e não confessional, 7,1% e 36,8% e fazem uso do Narguilé; 6,1% e 4,6% fumam de 1 a 10 cigarros por dia; 10,1% e 8,5% fazem uso de drogas ilícitas; 32,3% e 14,4% ingerem bebida alcoólica semanalmente; 5,1% e 9,1% referem abuso de remédios diariamente ou com relativa frequência; 44,4% e 35,4% usa não utilizam cinto de segurança com frequência e 24,2% e 21% referiu que quase nunca pratica sexo seguro. **Conclusão:** A escola confessional apresentou maior proporção de comportamentos de risco em relação à escola não confessional, com exceção, somente do uso de Narguilé e abuso de remédios. Os dados mostram que os adolescentes das duas instituições estão expostos à comportamentos de risco, o que evidencia a importância de investir em estratégias que estimulem um estilo de vida saudável e seguro para esta população tão vulnerável.

Palavras-chave: saúde coletiva; adolescente; vulnerabilidade em saúde.

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE DA TENDÊNCIA DE INTERNAÇÕES POR TUBERCULOSE PULMONAR EM UM ESTADO DO SUL DO BRASIL

Débora Cássia Montaholi¹; Aryadne Larissa de Almeida²; Letícia Sayuri Murase³; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli⁴; Regiane Bertin de Lima Scodro⁴; Vera Lúcia Dias Siqueira⁴; Rosana Rosseto de Oliveira⁵; Rosilene Fressati Cardoso⁴.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

⁵Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A Tuberculose (TB) é a doença infecto-contagiosa com maior mortalidade no mundo, e cujos agentes etiológicos são bacilos pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Análises sobre a prevalência e incidência desta doença, local e mundialmente, são essenciais, pois podem servir de base para o planejamento de ações adequadas que assegurem a diminuição do número de casos.

Objetivo: Analisar a tendência das taxas de internações por TB pulmonar no Paraná, de 2008 a 2018.

Material e métodos: Trata-se de um estudo ecológico, das tendências das taxas de internações por TB pulmonar no Paraná, entre os anos de 2008 e 2018. Os dados de internações foram obtidos do Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), por meio do DATASUS. As taxas foram calculadas pelo número de internações da população residente no estado, multiplicado por 10 mil. A análise de tendência foi realizada por meio de pontos de inflexão pelo software *Joinpoint Regression Program* versão 4.7.0.0.

Resultados: A análise da tendência mostrou-se decrescente entre os anos de 2008 e 2010, com valor de Variação Percentual Anual (VPA) de - 68,3 ($p < 0,05$) e crescente entre 2010 e 2018, com valor de VPA de 6,8. Houve a presença de um *joinpoint* com valor de Variação Percentual Anual Média (VPAM) de -16,2 ($p < 0,05$). **Conclusão:** A presença de um *joinpoint* indica uma mudança na orientação da tendência, nesse caso, de decrescente para crescente no ano de 2010. A significância da tendência decrescente, no período de 2008 a 2010 pode ser explicada pela implementação, em 2004, do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Essa estratégia de saúde pública, treinou profissionais e forneceu meios para que os casos de TB notificados fossem mais fidedignos, e o tratamento e acompanhamento dos pacientes mais efetivo. Dessa forma, diminuindo o número de casos, e, por conseguinte, das internações.

Palavras-chave: tuberculose; estudos de séries temporais; epidemiologia.

Financiador: CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Área temática: epidemiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE ESPACIAL DO VÍRUS DA DENGUE NO PARANÁ

Deborah de Castro Moreira¹; Gabriele Nascimento de Oliveira²; Dennis Armando Bertolini³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Nas últimas três décadas, o vírus da dengue (DENV) representou o maior problema de saúde causado por arbovírus no Brasil. Apesar de ser uma doença de prevenção simples, periodicamente somos surpreendidos por grandes epidemias, com consequências à vida e com uma alta carga aos cofres públicos, uma vez que, o padrão de transmissão do DENV para áreas urbanas, ainda é mal compreendido. **Objetivo:** Determinar a distribuição espacial da dengue no estado do Paraná, entre os anos de 2014 a 2019. **Material e métodos:** Realizou-se uma busca nos dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN) no período de 2014 a 2019, do Estado do Paraná, utilizando as variáveis de notificação por residência e ano de notificação. A partir das tabelas geradas, utilizou-se dos softwares QGis e GeoDa para os cálculos de índice de Moran, bem como construção dos mapas. **Resultados:** Realizou-se uma análise de autocorrelação espacial de matriz de vizinhança do tipo rainha para os mapas de cluster. Com base nisto foi possível identificar que de 2014 a 2016 havia um grande cluster low-low que envolveu até 2016, acompanhado do crescimento de regiões de cluster high-high, indicando um ápice endêmico em 2016. Neste mesmo ano observou-se a presença de hotspots na região litorânea e na região de fronteira internacional com Paraguai e Argentina. **Conclusão:** Apesar da dispersão da dengue não ser uniforme, é possível perceber que essa se mantém nas regiões norte e oeste e, mais recentemente, na região litorânea do estado com a ocorrência de hotspot, ou seja, áreas com alta incidência de DENV em comparação com a área circundante. Estes achados precisam ser identificados e valorizados como base científica para uma melhor gestão em saúde, a fim de otimizar a resposta em saúde, e, conseqüentemente, reduzir o número de casos e gastos com esse agravo.

Palavras-chave: análise espacial; dengue; epidemiologia.

Financiamento: CAPES

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE DAS FORMAS DE EXPOSIÇÃO NAS INTOXICAÇÕES POR AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ, 2010-2019

Denise Tiemi Uchida¹; Rosana Rosseto de Oliveira²; Miguel Machinski Junior³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá

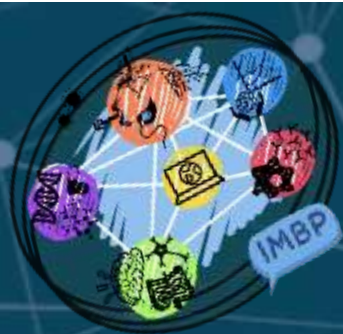
³Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O Brasil é um dos países que mais utilizam agrotóxicos no mundo. A pulverização terrestre e aérea de agrotóxicos é uma prática comum em áreas de cultivos, podendo contaminar não apenas as “pragas”, mas também lençóis freáticos, solos e as águas pluviais, trazendo risco a saúde humana e gastos de verbas públicas com atendimento médico-hospitalar. **Objetivo:** Analisar as formas de exposição mais frequentes na intoxicação por agrotóxicos no estado do Paraná. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal e ecológico das notificações de intoxicações por agrotóxicos no estado do Paraná, no período de 2010 a 2019. Os dados foram obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponível no sítio eletrônico do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus). Foram calculadas as taxas de incidência de intoxicação por agrotóxicos, para cada ano separadamente, mediante a divisão do número de casos novos de intoxicação por agrotóxicos, pelo número de pessoas sob risco de exposição durante o mesmo período, multiplicado por 100 mil. **Resultados:** As taxas de intoxicações por agrotóxicos das pessoas que tiveram uma intoxicação aguda-única foram maiores em todos os anos em comparação com as exposições aguda-repetida, crônica e aguda sobre crônica. Podemos notar também um aumento gradual nas exposições tipo aguda-repetida de 0,43 em 2010 a 0,92 em 2019. **Conclusão:** A partir dos resultados obtidos, observa-se que a exposição tipo aguda-única é a mais comum, provavelmente isto ocorra devido à falta de informação quanto ao uso correto dos equipamentos de proteção individual ao manusear os agrotóxicos, de como armazenar e descartar corretamente as embalagens e também a falta de conhecimento da melhor forma e período de aplicação do agrotóxico, trazendo risco não apenas a pessoa que vai manipulá-lo, mas também a comunidade.

Palavras-chave: agrotóxicos; intoxicações; epidemiologia.

Financiador(es): O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SPATIAL ANALYSIS OF HEPATITIS B MORTALITY IN PARANÁ STATE

Gabriele Nascimento de Oliveira¹; Natan Nascimento de Oliveira²; Dennis Armando Bertolini³

¹Pos-Graduate Academic (MSc) in Health Sciences - PCS, State University of Maringá, Maringá/PR

²Pos-Graduate Academic (MSc) in Nurse Sciences - PSE, State University of Maringá, Maringá/PR

³Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine - DAB, State University of Maringá, Maringá/PR

Introduction: When it comes to sexually transmitted infections (STIs), Brazil is an example of healthcare, even counting on free vaccination for hepatitis B by the Unified Health System (SUS); even with the improvement in the tracking and treatment of individuals affected by this infection, there's still a large number of cases in the country, as well as a high mortality. In Paraná it's possible to identify that mortality rates remains constant and despite that there's no analysis focused on these deaths.

Objective: Analyse acute hepatitis B clusters for mortality separated by gender in the state of Paraná.

Material e Methods: An ecological study was conducted measuring mortality rates associated by acute hepatitis B in Paraná in the period from 2009 to 2018 separated by gender in the Mortality Information System (SIM) which is a public system with open data use. A statistical analysis of spatial autocorrelation (Global Moran's Index) was made, detecting clusters through QGis 2.14.8 and GeoDa 1.14. **Results:** Both female and male Moran's I proved to be positive, which indicates spatial autocorrelation, with values of 0.540 for females and 0.569 for males. Cluster maps showed that for females there are high-high clusters mainly in the southwestern mesoregion of the state, as well as in the Campo Mourão health regional. In the cluster map for males we have the presence of a large low-low cluster in the central-north mesoregion. Besides that, there are high-high clusters in the Jacarezinho health regional and southwestern mesoregion, resembling the cluster map for female. From the significance maps, it appears that the most significant regions are the same for clusters of both sexes, which presented $p < 0.05$. **Conclusion:** The southwest mesoregion showed high mortality for males and females, proving to be an important region to study the possible causes for these deaths.

Keywords: hepatitis B; mortality; spatial analysis.

Financial Suport: CNPq and CAPES - financing code 001

Thematic area: Epidemiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS NOTIFICAÇÕES DE DENGUE NO BRASIL

Gabriella Letícia Bonone¹; Gabriele Nascimento de Oliveira²; Dennis Armando Bertolini³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A dengue é uma doença endêmica de países tropicais e subtropicais, transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*. Nos últimos anos ela se mostrou uma importante arbovirose no Brasil. Em 2019 pesquisas indicaram um aumento de 264% no número de casos positivos notificados e de 67% no número de óbitos. **Objetivo:** Traçar o perfil epidemiológico da dengue no território brasileiro para identificar as áreas e populações mais afetadas. **Materiais e Método:** Utilizou-se os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), com os filtros: regiões de notificação, faixa etária, sexo, raça e escolaridade, no período de 2014 a 2019. Foi realizada uma análise descritiva do perfil epidemiológico dos dados gerados. **Resultados:** Os dados obtidos para faixa etária, mostraram que a população mais atingida pelo vírus da dengue está entre 20 à 39 anos, com 2.241.586 casos notificados. Em relação ao grau de escolaridade, as pessoas com ensino médio completo foram as mais afetadas, tendo 637.890 casos notificados. As raças parda e branca lideraram as notificações com 1.793.181 e 1.688.263 casos, respectivamente. Entre os sexos, o feminino apresentou maior número de casos, com 3.262.460 notificações. Também notou-se que, para todos os parâmetros analisados, no período estudado, a região sudeste aparece como a mais afetada. **Conclusão:** Diante dos dados apresentados, a dengue atinge principalmente mulheres pardas e brancas de 20 à 39 anos com grau de escolaridade até o ensino médio completo e, que a região sudeste é a mais afetada pela doença, possivelmente por conta de sua alta densidade populacional, que reflete no alto número de construções, produção de lixo e outros fatores que elevam a proliferação do mosquito, porém, são necessários outros estudos para comprovar os reais motivos do maior número de casos na região.

Palavras-chave: dengue; notificação; epidemiologia.

Financiador (es): CAPES/CNPq

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COMORBIDADES E ÓBITOS POR COVID-19 NO BRASIL

Izabella Ventura de Souza¹; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli²; Regiane Bertin de Lima Scodro²; Rosilene Fressatti Cardoso²; Vera Lúcia Dias Siqueira².

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O novo coronavírus que surgiu em novembro de 2019 tornou-se rapidamente uma emergência da saúde pública a nível internacional, que impulsionou os estudos sobre os fatores de risco que afetam a progressão desta doença. Estudos evidenciam que o seu mau prognóstico está relacionado a presença de comorbidades, as quais aumentariam o risco de óbito 3,4 vezes. Considerando a gravidade e a falta de informações epidemiológicas sobre o impacto na população brasileira este trabalho foi proposto. **Objetivo:** Descrever casos de óbito notificados por COVID-19 no Brasil e presença de comorbidades do início dos casos a agosto de 2020. **Material e Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo, descritivo, com dados secundários dos óbitos notificados por COVID-19 no Brasil disponíveis nos sites das secretarias de saúde estaduais do período de 26 de fevereiro a 07 de agosto de 2020 coletados no último mês do período. Foram coletadas as variáveis: casos confirmados, óbitos confirmados por COVID-19, taxa de letalidade, casos com comorbidades x sem comorbidades, porcentagem de pacientes com idade superior a 60 anos, sexo, principais comorbidades notificadas. Os dados foram tabulados e frequências calculadas e analisadas utilizando o Microsoft Office Excel 2007®. **Resultados:** Foram registrados 2.946.774 casos por COVID-19 dos quais 99.388 foram a óbito com taxa de letalidade nacional de 3,37%. O perfil dos óbitos foi 74,10% dos casos idade igual ou superior a 60 anos e 57,99% sexo masculino. A presença de comorbidades foi em 61,80% dos óbitos, sendo as principais: 38,18% cardiopatias, 30,35% diabetes, 6,25% doença renal, 5,66% doenças neurológicas e 5,0,9% pneumopatias. **Conclusão:** Os resultados permitem estabelecer o perfil que tende a maior gravidade que são: pacientes homens com idade superior a 60 anos e as principais comorbidades, assim pode-se pensar no manejo clínico precocemente e evidenciam a realidade do Brasil além disso condiz com a literatura.

Palavras-chave: comorbidades; COVID-19; mortalidade.

Financiador: CNPq e CAPES - 001

Área temática: Epidemiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

TIPOS DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS NO ESTADO DO PARANÁ

Júlia Garbin Navarro¹; Denise Tiemi Uchida²; Miguel Machinski Junior³

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Historicamente, o Brasil vem apresentando um crescimento no número de acidentes por animais peçonhentos. O tipo de acidente predominante pode variar conforme a região, assim, compreender a epidemiologia deste agravo pode auxiliar no planejamento de medidas estratégicas para a assistência e prevenção dos acidentes. **Objetivo:** Identificar a evolução e os tipos de animais peçonhentos que mais causam acidentes no estado do Paraná. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal e ecológico utilizando dados secundários provenientes do Paraná registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), datados de 2010 a 2019. Foi calculado a taxa de incidência de cada tipo de acidente para cada ano, utilizando dados da população fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e os valores foram multiplicados por cem mil habitantes. **Resultados:** Os acidentes por aranhas apresentaram os maiores coeficientes de incidência em todos os anos, variando de 71,52 a 85,69. Em 2010 e 2011 as demais ocorrências eram majoritariamente causadas por serpentes e lagartas e, a partir de 2012, este lugar foi ocupado pelos escorpiões e abelhas. A taxa de escorpionismo se elevou de 7,41 em 2010 para 28,63 em 2019, semelhantemente, os acidentes por abelhas saltaram de 6,80 para 18,82. Em comparação, os casos ocasionados por lagartas e serpentes não apresentaram grande oscilação, resultando em um índice médio de 7,54 e 7,11, respectivamente. **Conclusão:** Observou-se uma mudança no perfil dos acidentes no Paraná nos últimos dez anos, embora as taxas de acidentes por lagartas, serpentes e aranhas permaneçam constantes e a última relativamente alta, os índices de acidentes por abelhas e escorpiões vêm crescendo e isso pode estar associado aos processos de urbanização sem planejamento adequado, que favoreceu a condição sinantrópica destes animais, somado ao aumento do acúmulo de resíduos sólidos em locais inadequados.

Palavras-chave: animais peçonhentos; vigilância epidemiológica; saúde pública.

Financiador: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Área temática: Epidemiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE HIV/AIDS NA 15ª REGIONAL DE SAÚDE DO PARANÁ

Juliana Karyna Romanini Cioffi¹; Natan Nascimento de Oliveira²; Rosana Rosseto de Oliveira³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Programa de Pós-graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A AIDS teve os primeiros casos registrados há quase quatro décadas e, embora existam muitos avanços desde o início da epidemia, nota-se ainda o aumento dos casos e inúmeras mortes todos os anos mundialmente. **Objetivo:** Analisar o perfil epidemiológico das pessoas com HIV/AIDS na 15ª Regional de Saúde (RS) do Paraná. **Material e métodos:** Estudo transversal, retrospectivo. Foram analisadas as notificações de HIV/AIDS do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) da 15ª RS do Paraná, no período de 2011 a 2019. Os dados foram analisados por estatística simples, segundo sexo, raça/cor, escolaridade e categoria de exposição sexual, agrupados em três triênios. **Resultados:** Foram analisados 2.668 casos de pessoas com HIV/AIDS, com predomínio do sexo masculino (78%) sendo a razão entre os sexos de 2,11, 3,30 e 4,22 no primeiro, segundo e terceiro triênios, respectivamente. A taxa de detecção de HIV/AIDS por 100.000 habitantes foi de 21,79(2011-2013), 41,71 (2014-2016) e 46,91 (2017-2019). Quanto à raça/cor, houve predomínio, em todos os anos, da branca, seguida da parda, preta e amarela. Observou-se mudança no perfil de escolaridade, sendo que 30,36%, 38,34% e 37,27% dos casos tinham ensino médio completo/incompleto e 17,98%, 21,81% e 32,45% dos casos informaram ter ensino superior completo/incompleto nos três triênios respectivamente analisados. Quanto à faixa etária, o predomínio foi de 20-34 anos, sendo 41,38%, 54,74% e 60,77% nos triênios analisados, respectivamente. Segundo a categoria de exposição sexual, houve aumento do número de casos entre homossexuais, passando de 27,70%, para 40,55% e 51,67%, sucessivamente nos triênios analisados. **Conclusão:** Os resultados indicam que esforços devem ser direcionados para monitoramento e proteção da população, considerando as constantes mudanças no perfil epidemiológico dos casos, enfatizando principalmente os jovens, homossexuais e com maior escolaridade, que na região estudada, foram os mais atingidos pela doença.

Palavras-chave: síndrome da imunodeficiência adquirida; perfil epidemiológico; epidemia.

Financiamento: CNPq e CAPES – código de financiamento 001

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ESTILO DE VIDA E COMPORTAMENTO DE RISCO DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE UMA ESCOLA PÚBLICA DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

Leticia Maria Peli Garcia¹; Claudia Regina Marchiori Antunes Araújo²; Emanuely Von Puttkammer Palma³.

¹Acadêmica de Enfermagem. Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba – PR.

²Doutora em Ciências/USP. Docente da Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba – PR.

³Acadêmica de Enfermagem. Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba – PR.

Introdução: Os hábitos e comportamentos estabelecidos na adolescência podem ocasionar inúmeros agravos à saúde, com consequências para vida adulta. **Objetivo:** Avaliar o estilo de vida e comportamento de risco em estudantes do ensino médio de uma escola pública da região Noroeste do Paraná. **Material e métodos:** Estudo transversal com abordagem quantitativa. Participaram 152 alunos do ensino médio de uma escola pública, selecionados por meio de amostragem aleatória. Foi utilizado um questionário do perfil sociodemográfico, e um instrumento validado (Estilo de Vida Fantástico), aplicados durante o período de aula. Software STATA 12.0 foi utilizado para as análises. Análise bivariada e multivariada foram realizadas, observando nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A pesquisa foi autorizada pela instituição envolvida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer 3.632.714). **Resultados:** Dos estudantes analisados, 15,1% apresentaram estilo de vida adequado, sendo 2,6% muito bom e 12,5% bom; e 84,9% apresentaram estilo de vida inadequado, sendo 56,6% regular e 28,3% necessita melhorar. Nenhum dos entrevistados apresentaram estilo de vida considerado excelente. O uso de Narguilé apresentou relação estatisticamente significativa com o estilo de vida, aumentando em 10 vezes o risco de um estilo de vida inadequado. Quanto ao comportamento de risco, 36,8% dos entrevistados fazem uso do Narguilé; 4,6% fumam de 1 a 10 cigarros por dia; 8,5% fazem uso de maconha; 14,4% ingerem bebida alcoólica semanalmente, sendo que 4,6% ingere mais de 20 doses semanais; 9,1% referem abuso de remédios diariamente ou com relativa frequência; 35,4% não utilizam cinto de segurança com frequência e 7,8% dirige após beber; 21% referiu que quase nunca pratica sexo seguro. **Conclusão:** Os adolescentes estão expostos a comportamentos de risco, o que repercute em um estilo de vida inadequado. Estratégias de saúde são essenciais para contribuir para a preservação da vida e saúde desta população tão vulnerável.

Palavras-chave: saúde coletiva; adolescente; estilo de vida.

Área temática: Epidemiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COX PROPORTIONAL-HAZARDS PARA DETERMINAR OS FATORES DE RISCO PARA ÓBITOS DE PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS EM UNIDADES DE TRATAMENTO INTENSIVO NO BRASIL

Lincoln Luís Silva¹; Pedro Henrique Iora²; Amanda de Carvalho Dutra³; Luciano de Andrade⁴; Rosilene Fressatti Cardoso^{1,5}

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A COVID-19 é uma das principais causas de morte no Brasil em 2020. Atualmente muitos estudos se concentraram na prevenção e controle da doença, porém, poucos avaliaram as variáveis envolvidas no aumento para o risco de óbito de pacientes internados devido ao agravo da doença.

Objetivo: Determinar os fatores de risco associado ao óbito de pacientes com COVID-19 em unidades de tratamento intensivo (UTI) no Brasil. **Material e métodos:** Dados públicos de pacientes diagnosticados com COVID-19 por reação em cadeia da polimerase e admitidos em UTI de fevereiro a julho de 2020 foram coletados do site openDataSus. Variáveis sexo, diabetes, hepatopatias, cardiopatias e uso de diferentes tipos de suporte ventilatório foram compiladas e analisadas para determinar o risco para óbito utilizando o modelo Cox proportional-hazards no programa R (versão 3.16) e considerados significantes com $p < 0,05$ e concordância acima de 50% quando agrupadas no modelo final. Desfecho com cura ou dados ignorados foram considerados censura. **Resultados:** De 63.254 pacientes, 33,64% (21.284) estavam com os dados adequados para análise. Desses, 66,12% (14.074) foram à óbito. As variáveis envolvidas com aumento do risco de morte foram: diabetes (HR 1,07; 95% IC 1,09-1,10; $p < 0,05$), hepatopatias (HR 1,31; 95% IC 1,17-1,46); $p < 0,05$), cardiopatias (HR 1,14; 95% IC 1,11-1,18; $p < 0,05$), uso de suporte ventilatório não invasivo (HR 1,38; 95% IC 1,28-1,49; $p < 0,05$), e uso de suporte ventilatório invasivo (HR 2,56; 95% IC 2,38-2,75; $p < 0,05$). A variável sexo não apresentou significância (HR 1,00; 95% IC 0,97-1,04); $p > 0,05$) e, portanto, não foi inserida no modelo final. Por fim, o modelo com todas as variáveis significantes apresentou concordância de 60,4%.

Conclusão: Diabetes, hepatopatias, cardiopatias, e a necessidade de uso de suporte ventilatório estão relacionadas ao aumento do risco de morte em pacientes com COVID-19 em UTI no Brasil.

Palavras-chave: coronavírus; sobrevivência; epidemiologia.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001).

Área temática: Epidemiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PREVALÊNCIA DE AIDS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA: UMA ANÁLISE COMPARATIVA SEGUNDO CATEGORIA DE EXPOSIÇÃO SEXUAL

Natan Nascimento de Oliveira¹; Juliana Karyna Romanini Cioffi²; Gabriele Nascimento de Oliveira³; Rosana Rosseto de Oliveira⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Quatro décadas após o aparecimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), diversos tratamentos foram criados, assim como métodos de prevenção. A doença, bem como seu agente etiológico, deixou de ser um mistério. Contudo, a população lésbica, gay, bissexual e transgênera (LGBT) continua a sofrer com o preconceito decorrente do início da epidemia nos anos 80, quando eram considerados os principais agentes de transmissão da doença, ainda que seja um fenômeno global a grande prevalência em pessoas heterossexuais. **Objetivo:** Analisar a prevalência de casos de AIDS, segundo categoria de exposição sexual e região brasileira de residência, nos anos de 2009 a 2018. **Material e métodos:** Estudo quantitativo, de abordagem descritiva e ecológica. Foram analisadas as notificações de AIDS de residentes no Brasil, presentes na plataforma pública do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de 2009 a 2018. Os dados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel® 2013 e analisados por estatística simples, de acordo com a categoria de exposição sexual e as regiões brasileiras. **Resultados:** Analisaram-se 218.737 notificações de AIDS no Brasil, das quais 68,99% representavam casos em pessoas heterossexuais, 24,40% em pessoas homossexuais e 6,61% em pessoas bissexuais. Quanto ao local de residência, 39,03% dos casos eram da região sudeste, seguida pela região sul (23,59%), nordeste (20,42%), norte (9,51%) e centro-oeste (7,45%). Ao analisarmos apenas a população LGBT com o agravo (67.830), a região sudeste apresentou o maior quantitativo (48,73%), enquanto a região centro-oeste apresentou o menor, com 7,42% dos casos. As regiões norte, nordeste e sul tiveram 8,60%, 18,98% e 16,27% de casos notificados, respectivamente. **Conclusão:** O estudo mostra que a maior parte dos casos está concentrada na população heterossexual. Pesquisas que analisem o perfil de cada região são necessárias para melhor delimitar a população mais vulnerável e direcionar políticas de prevenção da AIDS.

Palavras-chave: síndrome da imunodeficiência adquirida; minorias sexuais e de gênero; epidemiologia.

Financiador (es): CNPq e CAPES – código de financiamento 001

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS NO ESTADO DO PARANÁ: NO PERÍODO DE 2015 A 2019

Regivaldo Florentino Rodrigues¹; Lincoln Luis Silva²; Cíntia Akemi Tanoshi²; Isabella Harumi Yonehara Noma³; Gisleine Elisa Cavalcante da Silva⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Residência) em Residência Integrada Multiprofissional em Saúde na Atenção à Urgência e Emergência, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Farmácia (Fisiopatologia), Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

⁴Docente – Departamento Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Acidente por animais peçonhentos (AAP) é uma grande ameaça à saúde pública mundial, sendo que seus desfechos podem ser fatais. Estudos que buscam descrever o perfil epidemiológico dos AAP são importantes para criação de protocolos de prevenção, uma vez que as mortes por esse tipo de acidente são evitáveis. **Objetivo:** Descrever o perfil epidemiológico dos casos de AAP entre 2015 a 2019 com ocorrência no estado do Paraná (PR). **Material e métodos:** Estudo transversal com dados secundários dos AAP, coletados do Sistema de Agravos de Notificação do DATASUS, entre janeiro/2015 a dezembro/2019, atendimentos no Brasil, mas ocorridos no PR. Os dados foram compilados e analisados utilizando o software Microsoft Excel versão 2019. **Resultados:** Foram registrados 82.934 casos de AAP no período analisado, ou seja, em média 16.587/ano. Os tipos predominantes de AAP ocorreram por aranhas, o equivalente a 58,58% (48.583). Ocorreram também acidentes com escorpião 15,20% (12.607), abelha 10,93% (9.065), serpente 5,11% (4.234), lagarta 4,81% (3.986), e outros 5,38% (4.459). A classificação final dos AAP foi em sua maioria leve, 86,09% (71.400) e a evolução dos casos convergiu majoritariamente para cura 95,19% (78.943). Ao analisar os casos graves, n=852, o tipo de acidente foi predominantemente com serpente 51,29% (437) seguidos por aranha, 26,88% (229), abelha 11,85% (101), escorpião 6,34% (54), lagarta 2,23% (19), e outros 1,41% (12). Os casos que evoluíram para óbito pelo agravo notificado n=59 estão mais relacionados a abelha 45,78% (27) seguidos por serpente 28,81% (17), aranha 11,86% (7), escorpião 10,17% (6), e outros 3,38% (2). **Conclusão:** Este estudo permitiu categorizar os AAP no PR, que em sua maioria foram leves e evoluíram para a cura, porém houve óbitos. Assim, o conhecimento do perfil destes acidentes justifica a implantação de medidas preventivas no estado visando à redução dos AAP e trazendo maior segurança à população.

Palavras-chave: animais venenosos; epidemiologia; vigilância em saúde pública.

Financiadores: Ministério da Saúde e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 001)

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

LESÕES AUTOPROVOCADAS INTENCIONALMENTE POR PESTICIDAS: ANÁLISE DOS CASOS NOTIFICADOS NO SIM-PARANÁ ENTRE 2009 E 2018

Renata Sano Lini¹, André Inácio da Silva², Guilherme Galerani Mossini³, Maiara Basseto Sena², Rafaely de Cassia Nogueira Sanches⁴, Simone Aparecida Galerani Mossini⁵.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente - Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Medicamento é o principal agente tóxico relatado em tentativas de suicídio por intoxicação exógena no Brasil. Porém, os pesticidas são responsáveis pela maioria dos óbitos notificados dentre as categorias de Classificação Internacional de Doenças (CID-10) envolvendo autointoxicação intencional. O Paraná é o estado do Sul que apresenta maior número de óbitos registrados por autointoxicação intencional. A categoria X68 (autointoxicação por exposição intencional a pesticidas) representa 37,3% dos óbitos. Conhecer o perfil dos casos notificados é importante para subsidiar tomadas de decisões e planejamento estratégico para o enfrentamento desses agravos. **Objetivo:** Caracterizar os casos notificados como X68 no Paraná, entre 2009 e 2018. **Material e métodos:** Estudo descritivo epidemiológico, com dados obtidos por consulta ao Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Paraná, referente a mortalidade pela CID-10. A categoria X68 e o intervalo entre os anos de 2009 a 2018 foram selecionados. Os dados gerados foram compilados para o Excel® para análise estatística descritiva. Análise de tendência foi realizada pelo programa BioEstat5.3®. **Resultados:** Os homens representaram a maioria (70,5%) dos óbitos notificados. A faixa etária de adultos foi predominante, 40 a 49 anos, representou 25,9% dos casos. Quanto a escolaridade dos envolvidos, 36,5% dos casos corresponde a faixa de 4 a 7 anos de estudo. Em relação ao estado civil, a maioria dos óbitos se deu em casados (43,2%). O local de atendimento em 63,0% dos casos foi o hospital. Em análise ano a ano, foi possível observar que houve queda de 49,2%, nos casos notificados, entre os anos de 2011 e 2012. A análise de tendência, indicou decréscimo significativo com $p < 0,0001$. **Conclusão:** Os resultados apresentados pretendem auxiliar no enfrentamento de óbitos por X68. Os dados otimistas não devem descartar a necessidade do desenvolvimento de estratégias preventivas e planejamento de ações direcionadas para a população descrita neste estudo.

Palavras-chave: lesões autoprovocadas intencionalmente; pesticida; epidemiologia.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –CAPES (001)

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DEPRESSÃO E CONSUMO DE SELÊNIO: UM ESTUDO EM AGRICULTORES DO ESPÍRITO SANTO

Tatiana Lourençoni Ferreira de Almeida¹; Glenda Blaser Petarli²; Monica Cattafesta³; Eliana Zandonade⁴; Olivia Maria de Paula Alves Bezerra⁵; Kelly Guimães Tristão⁶; Luciane Bresciani Salaroli⁷

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Nutrição e Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES

²Chefe da Unidade de Nutrição do Hospital Cassano de Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES

⁴Docente – Departamento de Estatística e do Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES

⁵Docente Titular da escola de Medicina da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG

⁶Psicóloga do CEPAES - Centro de Psicologia Analítica do Espírito Santo, Vitória -ES

⁷Docente – Departamento de Educação Integrada em Saúde e do Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde e Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES

Introdução: A depressão representa um problema de Saúde Pública devido à alta prevalência e incidência nos últimos anos na população geral e, especialmente, na população rural. A deficiência do micronutriente, selênio, acarreta impacto na saúde mental contribuindo para o desenvolvimento do transtorno depressivo maior. **Objetivo:** Avaliar o consumo de selênio e sua associação com sintomas depressivos em agricultores do sudeste do Brasil. A hipótese investigada foi de que agricultores com menor quartil de consumo de selênio tem maior probabilidade de desenvolver sintomas depressivos quando comparado ao maior quartil de consumo. **Material e Métodos:** Estudo epidemiológico, transversal e analítico aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (Parecer nº 2091172). Amostra: 736 agricultores. Coleta de dados: dezembro 2016 a abril 2017. Instrumentos utilizados: questionário semiestruturado para coleta de dados sociodemográficos, estilo de vida e condição clínica; três recordatórios 24 h para o consumo alimentar e o *Mini-International Neuropsychiatric Interview* para episódios depressivos. Análise estatística: teste do Qui-quadrado, regressão logística binária e *Hosmer-Lemeshow*. Os dados foram organizados e analisados no programa *IBM SPSS Statistics for Windows* versão 22.0 **Resultados:** 16,1% (n=119) dos agricultores apresentaram sintomas de episódio depressivo maior, sendo 5,8% (n=43) episódio depressivo atual e 10,3% (n=76) episódio depressivo maior recorrente. Os fatores sociodemográficos associados à depressão foram sexo (p < 0,001), estado civil (p = 0,004) e classe socioeconômica (p = 0,015). O menor consumo de selênio foi associado a ocorrência de depressão mesmo após ajustes para as variáveis sociodemográficas, estilo de vida e intoxicação por agrotóxico (OR = 2,17; IC95% = 1,11 - 4,24). **Conclusão:** O consumo inadequado de selênio é fator de risco para a depressão. Os achados deste estudo contribuíram para limitada literatura sobre a saúde mental em trabalhadores rurais, fortalecendo as evidências da alta prevalência desta doença no meio rural.

Palavras-chave: trabalhador rural; selênio; depressão.

Financiador (es): Edital FAPES/CNPq/Decit-SCTIE-MS/SESA Nº 05/2015 – PPSUS

Área temática: Epidemiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

FUNGAL INFECTIONS IN HOSPITALIZED PATIENTS IN THE REGION OF MARINGÁ – PR (2018 TO 2020)

Vitória Monteiro de Araújo Vilela¹; Fernanda Leghi Garcia¹; Daniella Renata Faria²; Julimary Suematsu Aquino³; Cecília Saori Mitsugui⁴; Nathalie Kira Tamura⁴; Isis Regina Grenier Capoci⁵; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça⁵; Érika Seki Kioshima Cotica⁵

¹Undergraduate student in Biomedicine – Grupo de Tecnologias aplicadas às infecções fúngicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Postgraduate student (PhD degree) in Biosciences and Physiopathology, Universidade Estadual de Maringá

³Pharmaceutical-Biochemistry – Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC/UEM)

⁴Pharmaceutical-Biochemistry – Laboratório de Análises Clínicas – Hospital Regional Universitário de Maringá

⁵Professor – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introduction: In the last years, there has been a significant increase in the fungal infections in humans, especially in immunocompromised and critically ill patients. Hospital infections are a public health problem worldwide and are considered one of the main causes of morbidity and mortality. In addition, *Candida* species remain the most common agent among yeast isolates. **Aim:** To analyze the species involved in fungal infections in hospitalized patients from Maringá-PR. **Material and methods:** A retrospective observational study was conducted using clinical samples collected from patients of two hospitals in the region of Maringá-PR, between May 2018 and March 2020. The fungal species confirmation was performed by MALDI TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) methodology. All other information were collected from patients' medical reports. **Results:** The highest frequencies of fungal infections occurred in September (2018 and 2019) and October (2019). The fungal infection was observed mainly in female (58.6%) and over 60 years old (55.9%). For the clinical specimens, urine (66.0%) and blood (20.3%) were the most received samples; however, samples such as cerebrospinal fluid (3.0%), bronchial lavage (2.2%) and catheter tip (2.2%) were also analyzed. In total, 271 fungal samples were isolated, with *Candida albicans* being the most frequent species (38.4%), as expected, followed by *C. glabrata* (30.6%) and *C. tropicalis* (14.4%). In addition, other species have also been identified less frequently, such as *C. krusei* (2.9%), *C. parapsilosis* (2.6%), *C. rugosa* (0.7%), and *C. dubliniensis* (0.4%). Other genera have also been isolated, such as *Cryptococcus neoformans* (7.4%), *Kodamaea oohmeri* (1.1%), *Rhodotorula mucilaginosa var mucilaginosa* (0.4%), *Saccharomyces cerevisiae* (0.4%), *Trichosporon asahii* (0.4%), and *Paracoccidioides* sp. (0.4%). **Conclusion:** It is important to note that the cases of infection by *C. glabrata* are at alarming levels considering that they are resistant to the most widely used antifungal.

Keywords: epidemiology; fungal infection; MALDI-TOF.

Financier: CNPq

Thematic area: Epidemiology

The background of the page is a light blue color with a pattern of flowing, curved lines in various shades of blue, creating a sense of movement and depth. The lines are most prominent in the upper left and right corners, curving towards the center.

Farmacognosia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PLANTAS MEDICINAIS COM POTENCIAL AÇÃO CONTRA O VIRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Antônio Carlos Pereira Santiago¹, Gustavo Silva Bezerra²; João Carlos Vicente dos Santos³; Larissa Caroline da Silva Marinho³; Rhaissa Calazans Lameira da Silva³; Evelin Chayane Pantoja Santos³; Guilherme Nobre L. Nascimento⁴

¹Aluno(a) de pós-graduação – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

²Servidor – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

³Aluno(a) de graduação – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

⁴Docente – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

Introdução: Os medicamentos atuais utilizados por pessoas vivendo com o vírus HIV apresentam um alto índice de efeitos colaterais, necessitando a descoberta e desenvolvimento de potenciais novos fármacos provenientes de produtos naturais que apresentam eficácia na atividade Anti-HIV. **Objetivo:** Realizar um levantamento de dados disponíveis nas principais bases de dados eletrônicas sobre plantas medicinais com potencial ação contra o HIV. **Material e métodos:** Foi realizado um levantamento de dados selecionados nas bases de dados LILACS, Medline (via PubMed) e Web of Science com seleção de artigos publicados de outubro de 2013 a outubro de 2017. **Resultados:** Foram identificadas 50 espécies de medicinais diferentes submetidas à teste *in vitro*, que apresentaram atividade promissora anti-HIV, tanto por via de inibição da protease, da integrase e da transcriptase reversa ou por mecanismo de ação ainda não bem definidos. Como exemplos de plantas podemos citar: *Croton echinocarpus*; *Rheum rhabarbarum*, *Euphorbia kansui* e *Cistus incanus*. Porém tais plantas foram estudadas apenas em testes *in vitro*, sendo necessários mais estudos, tanto pré-clínicos *in vivo*, bem como testes clínicos para comprovar a eficácia e a segurança do uso destas plantas como promissoras agentes anti-HIV. **Conclusão:** Dessa forma, esta revisão reforça a necessidade da realização de estudos a fim de comprovar os meios pelos quais as plantas medicinais aqui estudadas podem vir a ser fonte de novos fármacos no combate ao vírus da imunodeficiência humana.

Palavras-chave: HIV; fitoterapia; plantas medicinais.

Financiador (es): PROPESQ/UFT e CNPQ.

Área temática: Farmacognosia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DO GEL DE *Aloe vera*: UMA DISCUSSÃO SOBRE SEU USO EM QUEIMADURAS

Dafne Nayara Quinta Barbosa¹; Haylla Freiria Maganhoto de Souza¹ Julliany Lopes Dias²; Gabriela Eustáquio Lacerda³; Larissa Caroline da Silva Marinho¹, Katarina Mirna Marinho Tenório Rodrigues⁴, Guilherme Nobre L. Nascimento²

¹Aluno(a) de graduação – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

²Docente – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

³Servidora – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

⁴Aluno(a) de pós-graduação – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

Introdução: A *Aloe vera*, conhecida como babosa, realiza um papel importante no tratamento de queimaduras, ao favorecer uma maior oxigenação dos tecidos através do aumento da vascularização e maior quantidade de colágeno na remodelagem do tecido cicatricial. **Objetivo:** Avaliar a propriedade antimicrobiana do gel da *Aloe vera*, e discutir uso tópico em queimaduras. **Material e métodos:** As folhas da *A. vera* foram coletadas na cidade de Palmas-TO. O gel obtido após o processamento das folhas foi dividido em dois grupos *in natura* (Amostra A) e liofilizado (Amostra B). A amostra A foram obtidas nas concentrações 2,5, 5, 10, 15, e 20g/ml. A amostra B foi mantida em temperatura ambiente e pelo acréscimo de água ultrapura ao gel foram obtidas concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100%. A propriedade antimicrobiana foi realizada pelo método de macrodiluição em ágar e microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), para microorganismos comumente identificados em lesões infectadas de indivíduos queimados.

Resultados: Os resultados obtidos para o gel *in natura* foram semelhantes aos encontrados para o extrato do liofilizado. Constata-se que a *A. vera* possui atividade antimicrobiana de caráter bacteriostático para *S.aureus*, *E.clocae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *E.coli* e *C.albicans*, tanto na forma *in natura* como liofilizada. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *A. vera* liofilizada para os microorganismos foram: *P. aeruginosa* (05 mg/mL), *S. aureus* (10mg/mL), *E. clocae* (10mg/mL), *A. baumannii* (10 mg/mL), *E. coli* (10mg/mL), *K. pneumoniae* (10mg/mL), *C. albicans* (1,25 mg/mL). Para *A. vera in natura*, em relação aos mesmos microorganismos, com exceção de *K. pneumoniae*, que não apresentou inibição, foram respectivamente: 12, 50%, 50%, 25%, 50% e 3, 12%. **Conclusão:** Os dados sugerem a indicação de uso a fim de evitar a proliferação microbiana, o que é interessante para o processo de tratamento de queimaduras.

Palavras-chave: *Aloe vera*; fitoterapia; medicina tradicional.

Financiador (es): PROPESQ/UFT e CNPq.

Área temática: Farmacognosia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AValiação *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO GEL DE *Aloe vera*

Klismam Marques dos Santos¹; Valdira Dias Pereira de Carvalho²; Paula Beatriz Rocha Sampaio²; Gabriela Eustaquio Lacerda³; Juliany Rocha Moraes⁴; Julliany Lopes Dias⁵; Guilherme Nobre Lima do Nascimento⁶

¹Acadêmico de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO

²Acadêmica de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO

³Servidora – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO

⁴Acadêmica de Enfermagem – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO

⁵Docente no Curso de Enfermagem – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO

⁶Docente no Curso de Nutrição – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins, Palmas/TO

Introdução: A *Aloe vera*, popularmente conhecida como babosa, é uma herbácea pertencente à família Xanthorrhoeaceae que na constituição de suas folhas há a presença de um gel que possui ação cicatrizante, antibacteriana, antifúngica, antiviral. Apesar da ampla utilização medicinal de plantas, existe pouca informação disponível acerca dos seus constituintes, havendo necessidade de estudos para avaliar os riscos potenciais de seu uso à saúde humana. **Objetivo:** Avaliar o risco de toxicidade do gel da *Aloe vera* em eritrócitos humanos. **Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo experimental. Foram coletadas folhas da *Aloe vera* em hortas comunitárias da cidade de Palmas-TO e processadas para obtenção do gel, que foi dividido em dois grupos para teste, *in natura* (Grupo A) e liofilizado (Grupo B). Ensaio de fragilidade osmótica eritrocitária utilizando sangue humano (coletado no dia de realização do ensaio *in vitro*), foram realizados para avaliação da citotoxicidade, onde a densidade óptica dos sobrenadantes é lida a 540 nm em espectrofotômetro GENESYS™ 10S UV-Vis da Thermo Scientific. Para realização da coleta sanguínea em humanos, o projeto foi submetido e aprovado sob número 066/2013, pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Tocantins. Os testes ANOVA e Tukey foram utilizados para análise estatística, com nível de significância de $p < 0,05$ no GraphPad Prism versão 6.0. **Resultados:** Não houve taxa de hemólise significativa ($p < 0,05$), bem como deformidade em membrana celular, que evidenciasse risco tóxico no uso do gel da planta para as concentrações máximas testadas 100% *in natura* e 20 mg/ml do extrato do gel liofilizado. **Conclusão:** Não houve taxa de hemólise significativa pelo teste de fragilidade osmótica que evidenciasse risco tóxico nos eritrócitos humanos.

Palavras-chave: *Aloe vera*; fitoterapia; medicina tradicional.

Financiador (es): PROPESQ/UFT e CNPq

Área temática: Farmacognosia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATIVIDADE BIOLÓGICA DA *Guazuma ulmifolia* LAMARK. - REVISÃO SISTEMÁTICA

Maria Laura Martins¹; Valdira Dias Pereira de Carvalho²; Janeth Aquino Fonseca de Brito²; Elga Lopes da Cunha Martins³; Lara Elis Freitas Leitão⁴; João Carlos Vicente dos Santos⁵; Guilherme Nobre Lima do Nascimento⁶

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

³Servidora – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

⁴Acadêmica de Graduação em Nutrição – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

⁵Acadêmico de Graduação em Enfermagem – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins

⁶Docente – Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS), Universidade Federal do Tocantins.

Introdução: A *Guazuma ulmifolia* Lamark (Malvaceae) é uma planta não endêmica, popularmente conhecida por mutamba. Suas folhas e raízes são empregadas em remédios caseiros contra disenteria e diarreias, no tratamento de próstata, como estimulante uterino e outras enfermidades. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática sobre os possíveis efeitos farmacológicos e toxicológicos da *Guazuma ulmifolia* Lamark. **Material e métodos:** Os bancos de dados selecionados para esta revisão foram: PUBMED, Science Direct, Latin American, LILACS e Google Acadêmico, com seleção de artigos publicados entre os anos de 2010 a 2017. Como estratégias de busca foram utilizados os descritores: "*Guazuma ulmifolia* e toxicidade", "*Guazuma ulmifolia* e etnofarmacologia", "*Guazuma ulmifolia* e bioatividade" e "*Guazuma ulmifolia* e farmacognosia", nas línguas portuguesa e inglesa. **Resultados:** A busca resultou em 1.379 artigos que atenderam aos critérios de inclusão. Foram excluídos, após análise de seus títulos, 1.132 manuscritos. Posteriormente, os resumos das 247 publicações restantes foram analisados. Destes, 197 manuscritos foram excluídos e em 50 artigos foi realizada a análise de toda a publicação. Após, 22 publicações foram incluídas no estudo. Como compostos ativos, os artigos citaram a presença de flavonoides, saponinas, alcaloides, taninos, compostos fenólicos e esteróides em diferentes partes da planta e extraídos com diferentes solventes. Quanto aos estudos experimentais, não foram encontrados artigos com teste clínico e, apenas 4 estudos com testes *in vivo*. Dos efeitos farmacológicos encontrados, pode-se citar atividade contra leishmaniose, hipoglicemiante, anti-inflamatório, anticolinesterásico, antiobesidade, antisséptico, cicatrizante e anti-helmíntico. **Conclusão:** Os testes toxicológicos registrados foram direcionados contra linhagens de células cancerígenas mostrando-se efetivo, porém, há necessidade de estudos para atestar a segurança de uso de *G. ulmifolia* pela população. Logo, apesar de utilizada, é imperativa a realização de mais estudos para assegurar o uso desta planta pela população e conhecer doses e forma de indicação, além de estudos clínicos que garantam uma correta terapêutica.

Palavras-chave: *Guazuma ulmifolia*; toxicidade; plantas medicinais.

Financiador (es): Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/Universidade Federal do Tocantins (PROPESQ/UFT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Área temática: Farmacognosia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ESTUDO COMPARATIVO DE SECAGEM DO EXTRATO DA CASCA DE UVA (*Vitis labrusca*) MICROENCAPSULADO

Pietra Mitiko Tateyama Pattini¹; Jéssica Bassetto Carra²; Willian Teruhiko Yamanaka Inagaki¹; Ricardo Luís Nascimento de Matos²; Renê Oliveira do Couto³; Nilton Syogo Arakawa⁴; Rubia Casagrande⁴; Sandra Regina Georgetti⁴; Marcela Maria Baracat⁴.

¹Acadêmicos de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmicos de Pós-Graduação em Química (Doutorado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Docente – Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis/MG

⁴Docentes – Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

Introdução: As cascas das uvas tintas são ricas em antocianinas que apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Apesar dos efeitos farmacológicos essas moléculas são instáveis e facilmente degradadas sob a incidência de luz, alterações de pH e exposição à altas temperaturas. Uma alternativa para proteger estes compostos são os sistemas microencapsulados.

Objetivos: Comparar o efeito de diferentes condições de secagem por *spray dryer* do extrato da casca da uva microencapsulado. **Material e métodos:** As microcápsulas foram produzidas com a proporção de 1:26 (extrato:polímero) e secas por atomização (*spray drying*). As condições de secagem utilizadas foram: 1) Temperatura (T) = 120 °C, fluxo de alimentação (FF) = 10 mL/min, e fluxo de ar (AF) = 51 m³/h; e 2) T = 160 °C, FF = 14 mL/min, e AF = 57 m³/h. Para averiguar os efeitos nos compostos bioativos, realizou-se a quantificação de compostos antioxidantes e eficiência de encapsulação (EE), ambos pelo ensaio de sequestro de radical livre 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Além disso, determinou-se os compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteau, utilizando ácido gálico como padrão, e o teor total antocianinas, obtido pelo método diferencial de pH.

Resultados: Condição 1: Quantificação de compostos antioxidantes (%) = 70,28 (desvio [d] = 1,19); EE (%) = 100,00 (d = 0,36); Fenólicos totais (mgGAE/g) = 88,84 (d = 0,72); Teor de antocianinas (mg/L) = 87,32 (d = 4,33). Condição 2: Quantificação de compostos antioxidantes (%) = 92,52 (d = 0,71); EE (%) = 80,70 (d = 0,40); Fenólicos totais (mgGAE/g) = 108,22 (d = 0,76); Teor de antocianinas (mg/L) = 125,12 (d = 3,10). **Conclusão:** A condição de secagem 2 apresentou maiores resultados para os compostos fenólicos totais e antocianinas e menor EE quando comparado com a condição 1. Estes resultados são justificados porque a condição 2 apresentou maior quantificação de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: antocianinas; microcápsulas; *spray dryer*.

Área temática: Farmacognosia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cordia verbenacea*

Roberta Bernardino Ramos do Prado¹; Karine Zanoli Bernuci²; Rogério Aparecido Minini dos Santos²

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Centro Universitário de Maringá, Maringá/PR

²Docente do Departamento de Farmácia, Centro Universitário de Maringá, Maringá/PR

Introdução: *Cordia verbenacea* é apontado nos estudos como fonte de atividade antimicrobiana, antinociceptiva e antiparasitária, atribuídas principalmente ao óleo essencial. Estes são substâncias lipossolúveis, densos e voláteis, produzidos em metabolismo vegetal secundário. Embora diversos estudos avaliem a composição química da *C. verbenacea* e os resultados divirjam bastante, todos encontraram quantidades significativamente maiores de terpenos. A indústria de alimentos e cosméticos utiliza estes compostos pelo sabor ou pelas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Os mecanismos de proteção dos óleos essenciais contra oxidação são investigados, tendo algumas espécies resultado de eficácia similar ao Butil Hidroxianisol (BHA). Todavia foi encontrado apenas um trabalho sobre a atividade antioxidante da *C. verbenacea*, com resultados satisfatórios. **Objetivo:** realizar a caracterização química do óleo essencial de *Cordia verbenacea*. **Material e métodos:** as amostras tiveram perfil químico analisado em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). A verificação ocorreu por comparação dos índices de retenção de Kovats dados pela biblioteca com os calculados. **Resultados:** neste estudo foi possível identificar 20 terpenos sendo: allo-aromadendreno (15,7%), α -pineno (15,5%); α -zingibereno (15%); β -cariofileno (10,7%); β -sesquifelandreno (8,1%); α -tujeno (6,5%); α -curcumeno (6,1%); espatulenol (3,5%); α -humuleno (2,6%); α -cubebeno (2%); óxido de cariofileno (1,8%); β -himachaleno (1,7%); germacreno d (1,5%); β -pineno (1,3%); α -epi-cadinol (1,3%); α -*trans*-bergamoteno (1,1%); delta-cadineno (1,1%); sabineno (0,9%); β -elemeno (0,8%); α -cadinol (0,8%); α -santaleno (0,7%); β -gurjuneno (0,7%). **Conclusão:** mediante os resultados observados é possível inferir que o óleo essencial analisado corresponde a *Cordia verbenacea*, com pequenas divergências com a literatura, como β -himachaleno e α -cadinol, que não foram encontrados em nenhum resultado de outro estudo.

Palavras-chave: *Cordia verbenacea*; óleo essencial; composição.

Área temática: Farmacognosia



Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DERIVADOS IMIDAZÓLICOS COMO POTENCIAIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Alícia Graziela Alves Guimarães¹; Analúcia Guedes Silveira Cabral²

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru/PE

²Docente – Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru/PE

Introdução: O tratamento da esquistossomose envolve falhas quimioterápicas que suscitam a urgência na descoberta de novos compostos, justificada pela ocorrência de cepas resistentes ao Praziquantel (PZQ), praticamente único fármaco esquistossomicida disponível, e pela baixa eficácia desta droga frente às formas juvenis do parasito. As imidazolidinas, substâncias heterocíclicas com diversas atividades biológicas, são referidas como moléculas promissoras. **Objetivo:** Buscar os derivados imidazólicos com potencial esquistossomicida já sintetizados. **Material e métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática, na qual foi realizado um levantamento de artigos dos últimos 20 anos (2000-2020), em inglês e português, nas bases de dados Scielo, Pubmed e Google Acadêmico, por meio da estratégia de busca “*Schistosoma*” AND “*imidazolidines*”. Foram incluídos apenas artigos originais completos, excluindo revisões. **Resultados:** Dentre os 256 artigos encontrados, apenas 11 abarcaram os parâmetros de inclusão. Foram identificados 36 compostos da classe das imidazolidinas demonstrando atividade sobre vermes *S. mansoni*. A análise dos artigos apontou que, em geral, os derivados imidazólicos apresentaram atividade em concentrações de 5-644 μ M, com tempo de atividade de 24-144h e menor citotoxicidade comparados ao PZQ (<1 μ g/mL). Oito compostos conseguiram induzir 100% da mortalidade de vermes adultos *S. Mansoni* em 24h, resultado similar ao PZQ, em uma faixa de 20-320 μ M. In vivo, os três testes realizados não alcançaram os critérios preconizados pela Organização Mundial da Saúde para identificar potenciais compostos: redução superior a 80% na carga de vermes após administração intraperitoneal de 100 mg/kg por cinco vezes com 10% de Dimetilsulfóxido. No entanto, os resultados desses estudos mostraram que os derivados testados, sobretudo 3-benzil-5-(4-cloro-irilazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT05) complexado com o polímero polietilenoglicol (70.5%), apresentaram promissora atividade esquistossomicida. **Conclusão:** As imidazolidinas possuem significativa atividade frente ao parasito discutido, porém, esforços devem continuar para a busca por novas moléculas e testes in vivo capazes de preencher as lacunas existentes.

Palavras-chave: imidazolidinas; *Schistosoma*; doenças negligenciadas.

Área temática: Farmacologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITO DA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO ÁCIDO VANÍLICO CONTRA A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELOS

Camilla Carolina Arriero Rodrigues¹, Ingrid Caroline Pinto¹, David Laios do Vale¹, Cristina de Paula Barros de Melo¹, Priscila Saito¹, Renata Micheli Martinez², Marcela Maria Baracat², Sandra Regina Georgetti², Waldiceu Aparecido Verri Junior³, Rúbia Casagrande²

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, UEL.

²Docente – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, UEL.

³Docente - Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL.

Introdução: A radiação ultravioleta B (UVB) é conhecida por causar danos à pele e está associada ao estresse oxidativo, inflamação, dano ao DNA e apoptose. O ácido vanílico (VA) é um derivado da oxidação da vanilina, um composto fenólico e um agente aromatizante encontrado em plantas e frutas comestíveis, que possui atividade antioxidante. **Objetivo:** Investigar a eficácia terapêutica do VA incorporado à formulação tópica (TFcVA) frente a inflamação e estresse oxidativo induzidos pela radiação UVB em camundongos sem pelo. **Materiais e Métodos:** Camundongos sem pelo (linhagem HRS/J, n=6) receberam tratamento tópico TFcVA (dose de 10 ng/animal) antes e após o período de irradiação (4,14 J/cm²). Após esse período as peles foram coletadas para os testes de edema cutâneo (variação do peso de pele), avaliação histopatológica por microscopia óptica (danos a fibra de colágeno) e metaloproteinase-9 (MMP-9) por zimografia em gel de poliacrilamida após 12h e para os testes de produção de ânion superóxido pela redução do *Nitroblue tetrazolium* e hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência após 2h, as peles coletadas foram armazenadas até a realização dos testes. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em animais (Of. Circ. CEUA nº70/2017, processo CEUA nº8225.2017.67). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA com um fator seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** O tratamento com TFcVA diminuiu a depleção dos antioxidantes endógenos pela diminuição da produção de radicais livres como o ânion superóxido e diminuiu a peroxidação lipídica induzida pela radiação UVB, o que explicam também a redução do edema de pele, atividade da MMP-9 e degradação do colágeno. Em resumo, o TFcVA foi capaz de reduzir os efeitos oxidativos e inflamatórios prejudiciais da irradiação UVB na pele dos camundongos. **Conclusão:** Foi demonstrado pela primeira vez que a TFcVA previne os danos oxidativos e inflamatórios induzidos pela irradiação UVB em camundongos sem pelo.

Palavras-chave: formulação tópica; estresse oxidativo; inflamação.

Área temática: Farmacologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL E CÂNFORA OBTIDOS DAS FOLHAS DE *Ocimum kilimandscharicum* EM CAMUNDONGOS

Caren Naomi Agüero Ito¹; Elisângela dos Santos²; Natália de Matos Balsalobre³; Arielle Cristina Arena⁴; Saulo Euclides Silva-Filho⁵, Anelise Samara Nazari Formagio⁶, Candida Aparecida Leite Kassuya⁶

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados/MS

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, UFGD, Dourados/MS

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Alimentos, Nutrição e Saúde, UFGD, Dourados/MS ⁴Docente – Departamento de Farmacologia UNESP-Botucatu-SP

⁵Docente – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

⁶Docente – Departamento de Ciências da Saúde (Curso de Medicina) UFGD, Dourados/MS

Introdução: Vários fármacos anti-inflamatórios amplamente utilizados provocam reações adversas importantes. Diante disso, a busca de produtos naturais com atividade anti-inflamatória tem sido promissora. O *Ocimum kilimandscharicum* (Camphor Brasil), por exemplo, apresenta atividades anti-inflamatória em modelo de pleurisia induzido por Carragenina em camundongos. **Objetivo:** Avaliar a atividade antiartrítica do óleo essencial das folhas e de Cânfora obtidos de *O. kilimandscharicum* (OEOK) em modelo de artrite induzida por Zymozan. **Material e métodos:** O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (nº 026/2016). Camundongos Swiss (28-30g), foram divididos (n=6) e tratados com salina 0,9% (controle), OEOK (100mg/kg, v.o.), Cânfora (30mg/kg, v.o.) e a droga de referência: Dexametasona (1mg/kg, s.c.). Após 1 hora, eles receberam injeção intra-articular de Zymozan (200 µg) no joelho direito. A hiperalgesia mecânica (HM) (analgésímetro digital) e edema (micrômetro) foram avaliados após quatro e seis horas. Após seis horas procedeu-se a eutanásia, sendo o líquido sinovial coletado para quantificação de proteínas, óxido nítrico (NO) e leucócitos. ANOVA (uma-via) e teste Student-Newman-Keuls foram utilizados para estatística. **Resultados:** O tratamento com OEOK e Cânfora reduziram a HM (76%, 70%) e o edema (61%, 81%), respectivamente. Ambos grupos também reduziram os níveis de NO (87%, 80%), proteínas totais (64%, 51%), leucócitos totais (70%, 62%) e polimorfonucleares (63%, 58%), no exsudato articular. A Dexametasona reduziu todos os parâmetros avaliados. **Conclusão:** O OEOK e a Cânfora apresentaram potencial antiartrítico. Pretende-se a realização de mais estudos para acrescentar na compreensão da atividade do óleo essencial e Cânfora.

Palavras-chave: *Ocimum kilimandscharicum*; inflamação; artrite.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001).

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ANETOL + METOTREXATO NOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E NO METABOLISMO HEPÁTICO DE RATOS ARTRÍTICOS

Carla Indianara Bonetti¹; Jackeline Joyce da Silva Moreira¹; Mariana Macedo Carmona²; Edvalkia Magna Teobaldo da Rocha³; Ciomar Aparecida Bersani Amado⁴; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi⁵, Jurandir Fernando Comar⁵; Lívia Bracht⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Farmácia (PIBIC), Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Farmacologia, Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá.

⁵Docente – Departamento de Bioquímica, Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A artrite reumatoide (AR) é uma doença multissistêmica crônica, cuja principal característica é a sinovite inflamatória persistente. O metotrexato (MTX) é o medicamento de escolha no tratamento da AR, mas sua principal limitação são os efeitos adversos. O anetol (AN), um constituinte do óleo essencial de anis, atenua a resposta inflamatória da AR. **Objetivo:** Avaliar o efeito da combinação AN + MTX em ratos portadores de AR. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados ratos Holtzman machos (200 g; CEUA nº 9937300419). A artrite foi induzida por injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund na superfície plantar da pata esquerda. Os animais foram tratados diariamente com AN (v.o.; 62,5 e 250 mg/kg); MTX uma vez por semana (i.p., 6, 12 e 24 mg/kg) ou a combinação AN (62,5 mg/Kg) + MTX (6 mg/Kg). O edema de pata foi determinado por pletismografia e os leucócitos articulares foram coletados ao final do período experimental. O fígado foi utilizado para determinação de parâmetros de estresse oxidativo. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** O tratamento com AN_{62,5mg/Kg} + MTX_{6mg/Kg} reduziu significativamente o edema da pata injetada em 47%, no 20º dia. Este efeito foi melhor que o tratamento com MTX_{6mg/Kg}, AN_{62,5mg/Kg} e AN_{250mg/Kg}. Essa combinação também reduziu o número de leucócitos da cavidade articular da pata esquerda em 70%. O fígado dos animais tratados com a associação apresentou redução da peroxidação lipídica (TBARs), da carbonilação de proteínas e da quantidade de espécies reativas de oxigênio total. Esta associação aumentou os níveis de glutatona reduzida (GSH) e diminuiu a glutatona oxidada (GSSG), melhorando a razão GSH/GSSG. A atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase também foi restaurada. **Conclusão:** Nossos resultados demonstram que o uso do anetol em combinação com o metotrexato pode ser eficaz no tratamento da AR.

Palavras Chaves: artrite reumatoide; metabolismo hepático; estresse oxidativo.

Financiador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ANETOL MICROENCAPSULADO EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA

Edvalkia Magna Teobaldo Rocha¹; Lívia Bracht²; Franciele Queiroz Ames¹; Carla Indianara Bonetti^{1,2}; Gabriel Fernando Esteves Cardia¹; Fernanda Vitória Leimann³; Odinei Hess Gonçalves³; Ciomar Aparecida Bersani-Amado¹

¹Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Farmacologia e Terapêuticas, Avenida Colombo, 5790, Jd. Universitário, Maringá, PR, Brazil.

²Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Bioquímica, Avenida Colombo, 5790, Jd. Universitário, Maringá, PR, Brazil.

³Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), POBox 271, BR 369, km 0.5, Campo Mourão, PR, Brazil.

Introdução: O trans-anetol (AN), composto natural presente nos óleos essenciais de espécies como o anis, anis-estrelado e erva-doce. Estudos recentes, em diferentes modelos de inflamação, demonstram que o AN apresenta atividade antiinflamatória. Os sistemas de encapsulamento de fármacos (micropartículas) são promissores por sua capacidade de proteger o composto permitindo melhor eficácia farmacológica em dose menor. **Objetivo:** Avaliar a eficácia do AN microencapsulado (MLSAN) no modelo de inflamação crônica induzida pelo adjuvante completo de Freund (ACF). **Material e métodos:** Os experimentos utilizando ratos Holtzman (200-220g) CEEA/UEM (3001210819). As MLSAN foram obtidas pelo método de homogeneização a quente com Compritol® e Tween 80. A artrite foi induzida pela administração subcutânea de ACF (0,5%) na pata posterior esquerda dos ratos (n = 5-7). Os tratamentos, com MLSAN (12,5, 25 e 50 mg/Kg) e com AN (250 mg/Kg), dose única diária, foram iniciados no mesmo dia da indução e continuado por 21 dias. O volume de ambas as patas traseiras, foi medido por pletismografia nos dias 1, 3, 6, 9, 13, 15, 17 e 21, os resultados expressos como aumento do volume final da pata em relação ao seu volume inicial. A gravidade das lesões secundárias foram avaliadas por um sistema de graduação numérica de 0 a 5. Os dados finais (Mean±EPM) foram submetidos à one-way ANOVA e teste de Tukey. *P < 0.05 foi considerado significativo. **Resultados:** Os resultados de FTIR mostraram eficiência do encapsulamento do AN na matriz do Compritol. O tratamento com a MLSAN nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu o edema da pata e retardou o aparecimento das lesões secundárias quando comparado ao AN na dose de 250 mg/kg. **Conclusão:** Nossos resultados mostraram que as MLSAN de AN foram obtidas com alta eficiência de encapsulação, e apresentaram uma eficácia anti-inflamatória semelhante à do AN em dose cinco a dez vezes menor.

Palavras-chave: artrite por adjuvante; microparticulas; anetol.

Financiador (es): CAPES, CNPq, FA.

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

A BERBERINA INIBE A PRODUÇÃO DE GLICOSE E O CONSUMO DE OXIGÊNIO NO FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO

Evelyn Silva Moreira¹; Mateus José de Oliveira¹; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi^{2,3}; Jurandir Fernando Comar^{2,3}; Adelar Bracht³; Lívia Bracht^{2,3}.

¹Acadêmico de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá.

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A berberina (ou umbelatina) é um alcalóide obtido de plantas, que possui inúmeras atividades bioativas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-mutagênica, antidiabética, hipolipemiante. Estudos mostram que o fígado é um órgão central na biodistribuição e biotransformação da curcumina, sendo o órgão onde a berberina mais se acumula. **Objetivo:** Avaliar o efeito da berberina sobre a gliconeogênese hepática, utilizando o modelo de perfusão de fígado isolado de rato. **Material e métodos:** Foram utilizados ratos machos Wistar (200 a 250 g). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UEM (CEUA n. 2535301019). O modelo de perfusão não-recirculante de fígado de rato, livre de hemoglobina, foi utilizado. O fígado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. O substrato gliconeogênico L-lactato (2mM) e a berberina (5 a 50 μ M) foram dissolvidos diretamente no líquido de perfusão. O perfusado efluente foi coletado e analisado em relação à concentração dos metabólitos glicose e piruvato. O consumo de oxigênio foi determinado por polarografia. **Resultados:** A berberina inibiu a gliconeogênese hepática de maneira dose-dependente. Na concentração de 50 μ M, a inibição da produção de glicose causada pela berberina chegou a 91%, em condições de estado estacionário. A concentração de berberina que causou 50% de inibição da produção de glicose (IC50) foi de 16,4 μ M. O consumo de oxigênio foi expressivamente inibido pela berberina (-145% na concentração de 50 μ M). O IC50 para o consumo de oxigênio foi de 3,1 μ M. A berberina também provocou redução, embora em menor grau, da concentração de piruvato do perfusado efluente. Na concentração de 50 μ M a inibição da produção de piruvato foi de 23%. **Conclusão:** A berberina inibe expressivamente a gliconeogênese e o consumo de oxigênio do fígado em baixas concentrações. Estes resultados contribuem com a elucidação dos efeitos farmacológicos da berberina, haja vista sua atividade antidiabética.

Palavras-chave: umbelatina; gliconeogênese; fígado.

Financiador (es): CNPq

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COMBINAÇÃO DE ANÁLISES ESPECTROSCÓPICA VIBRACIONAL E HISTOLÓGICA É EFETIVA PARA O ESTUDO DE ALTERAÇÕES NA MEMBRANA SINOVIAL DE RATOS ARTRÍTICOS E PARA AVALIAR O EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO

Franciele Queiroz Ames¹; Livia Bracht²; Lidiane Vizioli de Castro³; Francielle Sato³; Larissa Carla Lauer Schneider⁴; Roberto Kenji Nakamura Cuman¹; Edvalkia Magna Tebaldo Rocha¹; Mauro Luciano Baesso³; Ciomar Aparecida Bersani-Amado¹

¹Laboratório de Inflamação/Departamento de Farmacologia e Terapêutica (DFT), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Laboratório de Metabolismo Hepático/Departamento de Bioquímica (DBQ), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Grupo de Estudo de Fenômenos Fototérmicos/Departamento de Física (DFI), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Laboratório de Histologia/Departamento de Ciências Morfológicas (DCM), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A espectroscopia no infravermelho (FTIR) é uma técnica não destrutiva, que apresenta alta especificidade e fornece resultados rápidos. Embora alguns trabalhos mostrem a aplicação da FTIR na área biomédica, não encontramos estudos que aplicaram esta técnica para a avaliação de alterações na membrana sinovial (MS) de ratos artríticos. **Objetivo:** Caracterizar as alterações estruturais, moleculares e morfológicas da MS de ratos artríticos, utilizando a combinação de técnicas espectral e histológica, e avaliar a aplicabilidade destas técnicas em estudos que avaliam o efeito de compostos com atividade anti-inflamatória sobre estas alterações. **Métodos:** A artrite (AIA) foi induzida por injeção subcutânea de 0,1 mL de adjuvante completo de Freund (0,5%) na pata posterior esquerda de ratos Holtzman (CEUA/UEM-896220716). Os ratos (200-220g) foram tratados p.o., em dose única diária, com a associação anetol+ibuprofeno (AN+IB - 62,5+8,75mg/kg), IB (35mg/kg) e AN (250mg/kg) por 21 dias. No 21º dia os animais foram eutanasiados para a coleta da MS. A avaliação espectral foi feita em espectrômetro FTIR-ATR. As análises histológicas foram realizadas utilizando técnicas de HE, Azan e Picro-Sirius. Os resultados (Média±EPM) foram submetidos à ANOVA-Tukey (P<0,05). **Resultados:** Os dados da análise espectral mostraram um aumento da área da banda centrada em 2922 cm⁻¹, atribuída ao colágeno tipo III. As análises histológicas mostraram graves alterações na MS dos animais artríticos, como intenso infiltrado inflamatório, hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais, e aumento do depósito de colágeno total, representado pelo aumento do colágeno tipo III. O tratamento dos animais com a associação AN+IB preveniu todas estas alterações, de maneira similar à monoterapia com AN e IB em doses altas. **Conclusão:** No conjunto, os dados evidenciaram que a combinação de técnicas espectral e histológica pode contribuir efetivamente para o melhor entendimento da fisiopatologia da AIA, e para avaliar o efeito de compostos com finalidade terapêutica.

Palavras- chave: artrite induzida por adjuvante; espectroscopia no infravermelho; associação de fármacos.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária (FA).

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

β -MYRCENE PROTECT AGAINST ACUTE ACETAMINOPHEN HEPATOTOXICITY IN MICE

Gabriel Fernando Esteves Cardia¹; Carla Indianara Bonetti¹, Edvalkia Magna Teobaldo da Rocha¹, Saulo Euclides Silva Filho²; Francielli Maria de Souza Silva-Comar¹; Roberto Kenji Nakamura Cuman¹

¹Department of Pharmacology and Therapeutics, State University of Maringá, Maringá, Paraná.

²Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Matogrosso do Sul.

Introduction: Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, APAP), overdose is one of the most common causes of drug-induced acute liver failure. β -myrcene is a natural product with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Aim:** Investigate the protective effects of β -myrcene (MYR) on liver damage induced by **Methods:** In the present study, the hepatoprotective effects and the underlying mechanisms MYR in APAP-induced hepatotoxicity were investigated. Balb/c mice were pretreated with MYR (100 and 200 mg/kg), Silymarin or vehicle once daily for seven days. On the seventh day, mice were injected with a single dose of APAP (250 mg/kg) to induce acute liver injury. After 12 hours of APAP administration, the animals were anesthetized with thiopental and the peritoneal cavity was exposed. Blood was collected for biochemical analysis of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyltransferase (γ GT). Results are reported as the mean \pm standard error of the mean. Significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. **Results:** ALT, AST, ALP and γ GT values were significantly increased with the administration of APAP, indicating hepatic injury. However, the MYR 100 mg/kg and MYR 200 mg/kg groups significantly prevented changes in ALT (82.4% and 72.3%, respectively), AST (71.4% and 59.1%, respectively), ALP (80.9% and 35.0%, respectively) and γ GT (55.7% and 61.4%, respectively), when compared to the APAP group. Treatment with 200 mg/kg silymarin inhibited APAP toxicity and the values of the above mentioned serum parameters were significantly reversed. **Conclusion:** Our results demonstrated that treatment with MYR improves hepatic functions in paracetamol-induced hepatotoxicity as evidenced by reduction in serum liver enzymes.

Key-words: acute hepatic injury; β -myrcene; hepatotoxicity.

Financial support: This study was supported by grants from CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

Thematic area: Pharmacology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AValiação dos Efeitos do β -Cariofileno no Modelo de Lesão Pulmonar Aguda Induzido por Lipopolissacarídeo

Gabriella Saory Kondo¹; Louise Ferreira Iunklaus²; Guilherme Henrique Oliveira Silva³; Roberto Kenji Nakamura Cuman⁴; Francieli Maria de Souza Silva⁵; Jurandir Fernando Comar⁶

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá

⁵Docente – Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome de insuficiência respiratória que é caracterizada por infiltração pulmonar, edema e hipoxemia grave. A fisiopatologia da LPA envolve uma intensa resposta inflamatória pulmonar, que é caracterizada por recrutamento de neutrófilos e ativação de macrófagos alveolares, os quais secretam citocinas, principalmente interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, e IL-10 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O β -cariofileno é um dos componentes mais abundantes do óleo de copaíba, e apresenta diversas propriedades farmacêuticas já descritas na literatura, tais como anti-inflamatória, antioxidante e antiviral. **Objetivo:** Esta pesquisa teve como objetivo determinar os efeitos anti-inflamatórios do β -cariofileno no modelo experimental de LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS). **Material e métodos:** Os animais foram tratados por via oral com β -cariofileno (50, 100, 200 e 400mg/kg), dexametasona (DEX, 1 mg/kg) + Zafirlucaste (ZAR, 5 mg/kg). Foi utilizado 42 animais no total, e este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá (9908100120). Uma hora após o tratamento, foi realizada a indução da LPA pela administração intranasal de uma solução de LPS. Vinte e quatro horas após a indução, foi realizada a coleta do lavado bronco alveolar (LBA) e do tecido pulmonar. Com o LBA realizou-se a contagem de células totais e polimorfonucleares (PMN), e o tecido pulmonar foi utilizado para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). **Resultados:** Os animais pré-tratados com β -cariofileno (200 e 400 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa no número de células totais e PMN quando comparados com o grupo que só recebeu a administração intranasal de LPS (grupo LPS). O pré-tratamento com β -cariofileno (200 e 400 mg/kg) também reduziu significativamente a atividade da MPO em comparação ao grupo LPS. **Conclusão:** Baseado nos dados obtidos, pode-se concluir que o β -cariofileno presente no óleo de copaíba, possui efeito anti-inflamatório na atenuação da migração de neutrófilos nos pulmões.

Palavras-chave: lesão pulmonar aguda; β -cariofileno, anti-inflamatório

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO BETA-MIRCENO NO MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Guilherme Henrique Oliveira Silva¹; Gabriella Saory Kondo², Louise Ferreira Iunklaus³; Jurandir Fernando Comar⁴; Roberto Kenji Nakamura Cuman⁵; Francieli Maria de Souza Silva Comar⁵.

¹Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente - Departamento de Bioquímica

⁵Docente - Departamento de Farmacologia e Terapêutica

Introdução: Na lesão pulmonar aguda (LPA) ocorre uma intensa resposta inflamatória, caracterizada por formação de edema, ruptura do epitélio com lesão do parênquima pulmonar e recrutamento de neutrófilos. O β -mirceno é um terpeno derivado de óleos essenciais que apresenta diversas propriedades farmacológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias. **Objetivo:** avaliar os efeitos do β -mirceno sobre parâmetros inflamatórios no modelo de LPA induzida por LPS em camundongos.

Material e métodos: A indução da LPA foi realizada pela administração intranasal de LPS em camundongos Balb-C. Os animais foram pré-tratados com β -mirceno, nas doses: 125, 250, 500 e 750 mg/kg uma hora antes da indução. Vinte e quatro horas após a administração do LPS realizou-se a coleta do lavado broncoalveolar (LBA), o qual foi utilizado para a contagem de células totais e polimorfonucleares (PMN), dosagem de óxido nítrico (NO) e verificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM sob o CEUA nº 3919220419. **Resultados:** Os animais foram divididos em 7 grupos: controle, LPS, LPS + β -mirceno (125, 250 e 500mg/kg), LPS + dexametasona e LPS + zafirlucaste. Os animais que receberam somente a administração de LPS apresentaram aumento significativo do número de leucócitos totais no LBA quando comparados ao grupo controle, confirmando a viabilidade do modelo experimental de LPA. O pré-tratamento via oral com β -mirceno nas doses 125, 250 e 500mg/kg mostrou-se eficaz em reduzir a migração de leucócitos totais. Essa diminuição na migração de leucócitos ocorreu principalmente devido a uma redução do número de células PMN no LBA. A atividade da MPO e os níveis de NO também foram reduzidos após o pré-tratamento com β -mirceno 125, 250 e 500mg/kg. **Conclusão:** Esses dados, em conjunto, sugerem que o β -mirceno possui efeito anti-inflamatório no referido modelo, por atenuar a migração de células nos pulmões.

Palavras-chave: β -mirceno; lesão pulmonar aguda; migração celular.

Área temática: Farmacologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO RESOLVINA D2 NO MODELO DE LESÃO CUTÂNEA INDUZIDA PELA RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO

Ingrid Caroline Pinto¹; Priscila Saito¹; Clóvis Minoru Kumagai²; Camilla Carolina Arriero Rodrigues¹; Claudia Tiemi Nakano²; Ricardo Luís Nascimento de Matos³; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense⁴; Renata Micheli Martinez⁵; Waldiceu Aparecido Verri Junior⁶; Rúbia Casagrande⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmico (a) de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁴Docente – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina

⁵Docente – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina

⁶Docente – Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

Introdução: Um conceito atualmente descrito é o papel anti-inflamatório de mediadores lipídicos pró-resolução. A resolvina D2 (RvD2) é um mediador gerado durante a fase resolutive da inflamação aguda a partir do metabolismo do ácido docosahexaenoico (DHA), proveniente da família dos ácidos graxos ômega-3 e tem apresentado atividade terapêutica em outros modelos de doença. Entretanto, não existe conhecimento da sua ação contra os danos cutâneos causados pela exposição excessiva à radiação ultravioleta B (UVB). **Objetivo:** Investigar o efeito do tratamento da formulação tópica contendo RvD2 no modelo de dano inflamatório induzido pela radiação UVB em camundongos sem pelo. **Material e métodos:** Camundongos (linhagem HRS/J, n=6) receberam tratamento tópico com 0,5 g de formulação com e sem RvD2 (dose de 3,0 ng/animal) na superfície dorsal cutânea 1 hora antes, 5 minutos antes e logo após a irradiação (4,14 J/cm²). Doze horas após a irradiação, amostras de pele dorsal foram coletadas para avaliação do edema (expresso pela variação do peso de pele), atividade da mieloperoxidase (MPO) por método espectrofotométrico, atividade da metaloproteinase-9 (MMP-9) por zimografia em gel de poliácridamida e também para a avaliação histopatológica por microscopia óptica (determinação da espessura epidérmica e dano às fibras colágenas). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA com um fator seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (n° 017/2015, processo 1447.2015.10). **Resultados:** Os resultados *in vivo* demonstraram que o tratamento tópico contendo RvD2 protegeu a pele contra o dano inflamatório induzido pela radiação UVB, pois reduziu a infiltração de células inflamatórias (ensaio da mieloperoxidase), edema de pele, atividade da MMP-9, espessamento epidérmico e a degradação das fibras colágenas. **Conclusão:** O uso da formulação tópica contendo RvD2 pode ser uma abordagem promissora para controlar doenças cutâneas causadas pela exposição à radiação UVB.

Palavras-chave: radiação UVB; inflamação; resolvina.

Financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DA COENZIMA Q10 NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON

Jackeline Joyce da Silva Moreira¹; Carla Indianara Bonetti¹; Edwalkia Magna Teobaldo da Rocha¹; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi²; Jurandir Fernando Comar²; Ciomar Aparecida Bersani-Amado³; Lívia Bracht^{2,3}

¹Acadêmico de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá.

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Introdução: A coenzima Q10 (CoQ10) é uma benzoquinona hidrofóbica produzida endogenamente, que possui papel importante na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Esta substância possui atividades antioxidante e anti-inflamatória já comprovadas em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Todavia, embora a CoQ10 seja amplamente utilizada em formulações cosméticas comerciais, o efeito anti-inflamatório tópico desta substância ainda não foi investigado. **Objetivo:** Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da CoQ10 no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC).

Material e métodos: Aprovado pelo comitê de ética (CEUA n. 9987080420), foram utilizados camundongos Swiss machos. O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 200 µg de OC dissolvido em 20 µl de acetona 70% na face interna das orelhas dos camundongos. A seguir foram aplicados topicamente a CoQ10 nas doses de 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 e 0,03 mg/orelha, ou a dexametasona (0,1 mg/orelha), também na face interna das orelhas, dissolvidos em acetona. Após 6 horas, os animais foram submetidos à eutanásia, as orelhas cortadas em seções circulares de 6 mm de diâmetro, pesadas e utilizadas para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

Resultados: O tratamento tópico com a CoQ10 foi capaz de reduzir de maneira dose-dependente o edema de orelha induzido pelo OC, resultando em 53% de inibição na dose de 0,5 mg, 44% na dose de 0,125 mg e 23% na dose de 0,03 mg/orelha. Dexametasona (0,1 mg/orelha) reduziu o edema em 79%. Adicionalmente, a aplicação tópica de CoQ10 diminuiu expressivamente o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, uma vez que a atividade da MPO foi reduzida em 90%, 115%, 117% e 111% nas doses de 0,5; 0,25; 0,125 e 0,03 mg/orelha, respectivamente. **Conclusão:** A coenzima Q10 possui atividade anti-inflamatória tópica, como demonstrado neste modelo de edema de orelha induzido pelo OC em camundongos.

Palavras-chave: inflamação; mieloperoxidase; ubiquinona.

Financiador (es): CAPES

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA NA INDUÇÃO DE CISTITE EM RATAS WISTAR POR VIA INTRAPERITONEAL

Liandra Ferreira Minhos¹; Ana Cláudia da Silva Lima Gehlen²; Felipe Francisco Bittencourt Júnior³; Márcio Eduardo de Barros⁴.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS

²Acadêmica de Pós-Doutorado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS

³Docente – Departamento de Bioquímica clínica, Centro Universitário da Grande Dourados

⁴Docente- Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande

Introdução: A ciclofosfamida é um agente antineoplásico, que é também causador de cistite aguda em humanos e ratos. A cistite aguda é um problema de saúde pública pela falta de tratamentos que sejam menos prejudiciais ao organismo. **Objetivo:** Estabelecer um modelo experimental de cistite inflamatória pela administração intraperitoneal de ciclofosfamida em ratas Wistar. **Material e métodos:** Para este estudo inicial, utilizou-se 10 ratas fêmeas Wistar, com cerca de 150 g que foram alojadas no biotério experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (ração e água *ad libitum*). Os animais foram divididos em 2 grupos: Controle (sem nenhuma administração, n=5) e Inflamação (com administração de ciclofosfamida, n=5) que receberam uma dose de 150 mg/Kg de ciclofosfamida por via intraperitoneal. Após 24 horas as ratas foram anestesiadas e eutanasiadas para coleta de amostras e realização de exame de urina tipo I, análises bioquímicas e hematológicas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA/UFGD (nº 05/2020). Os dados hematológicos e bioquímicos foram analisados estatisticamente através de ANOVA, seguido de teste de Tukey (M±EP, com p≤ 0,05). **Resultados:** Houve ligeiro aumento da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média do Grupo Inflamação (35,98±0,31) em comparação ao Grupo Controle (35,20±0,63) (p = 0,038), em relação aos exames bioquímicos, houve diminuição significativa entre os valores de triglicérides do Grupo Inflamação (68,78±14,03) em relação ao Grupo Controle (110,24±30,25) (p=0,023) e por fim, o exame de urina tipo I demonstrou que as ratas do Grupo Inflamação estavam com a urina alcalina (pH=8) em relação ao grupo controle (pH=7) e com presença de leucócitos na urina (125 cel./µl). **Conclusão:** Portanto, estamos indicando um caminho de pesquisa para comprovar ou não o efeito da ciclofosfamida na indução de cistite, porém acreditamos que a dose deve ser ajustada para se obter resultados mais relevantes.

Palavras-chave: cistite; ciclofosfamida; ratos Wistar.

Financiador (es): Capes

Área temática: Farmacologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ACETYLSALICYLIC ACID REDUCES SKIN INFLAMMATION CAUSED BY UVB IRRADIATION: ROLE OF THE 15-EPI-LIPOXIN A4 - ALX/FPR2 AXIS

Nathalia Yurika Fukuda¹; Renata Micheli Martinez²; Priscila Saito³; Ingrid Caroline Pinto³; Camilla Carolina Arriero Rodrigues³; Victor Fattori³; Cristina de Paula Barros de Melo³; Allan James de Castro Bussmann³; Waldiceu Aparecido Verri Junior⁴; Rubia Casagrande¹

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina

²Docente – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina

⁴Docente – Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

Introduction: Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins (AT-LXA4) are mediators generated during inflammation that elicit anti-inflammatory and pro-resolution bioactions by binding to a high-affinity, G protein-coupled lipoxin A4 receptor (ALX)/formyl peptide receptor (FPR2). **Objective:** to determine if the effect of acetylsalicylic acid (ASA) on UVB radiation-induced collagen degradation, and production of anti-inflammatory cytokines would be inhibited by BOC-2 (an ALX/FPR2 receptor antagonist) indicating the dependence on AT-LXA4, and then if AT-LXA4 would mimic the ASA activity on the inflammatory response induced by UVB in mice. **Material and methods:** Hairless mice were randomly designed to different groups with 5 mice each. Mice were pretreated with ASA (100 mg/kg, via oral [po]) or AT-LXA4 (3 ng/mice, via intraperitoneal [ip]) in the absence or presence of BOC-2 (30 g/kg, ip, 30 min before ASA or AT-LXA4 treatment). After 1 hour, animals received UV irradiation (4.14 J/cm²). Degradation of collagen was determined in samples dissected 12 h after the irradiation by Masson's trichrome showed in blue and analyzed by ImageJ Program. IL-10, and TGF- β levels were assessed in skin samples dissected out 12 h after the UV exposure by ELISA kits. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test, $p < 0.05$. The Animal Ethics Committee (CEUA process 1447.2015.10) of the Londrina State University approved this study. **Results:** Pretreatment with ASA and AT-LXA4 ameliorated the signs of UV-induced inflammation by reducing collagen degradation, and by increasing anti-inflammatory cytokines (transforming growth factor [TGF]- β and IL-10). All effects were abrogated by BOC-2, indicating that AT-LXA4 is involved in the beneficial effect exerted by ASA on UVB-induced skin inflammation. **Conclusion:** AT-LXA4 action on ALX/FPR2 receptor explains the modulation of inflammatory parameters by ASA in UVB induced skin inflammation further contributing to understand ASA therapeutic applicability in UVB radiation-induced skin pathology scenario.

Palavras-chave: aspirin; lipid mediators; cytokines.

Financiador (es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária and Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Área temática: Farmacologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO RESOLVINA D5 INIBE O PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR RADIAÇÃO UVB EM CAMUNDONGOS SEM PELO

Priscila Saito¹; Ingrid Caroline Pinto¹; Clóvis Minoru Kumagai²; Claudia Tiemi Nakano²; Camilla Carolina Arriero Rodrigues¹; Ricardo Luís Nascimento de Matos³; Cristina de Paula Barros de Melo¹; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense⁴; Waldiceu Aparecido Verri Junior⁵; Rúbia Casagrande⁶

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁴Docente – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina

⁵Docente – Departamento de Patologia, Universidade Estadual de Londrina

⁶Docente – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina

Introdução: A pele está exposta a uma série de agentes deletérios e um dos principais é a radiação ultravioleta B (UVB). A radiação UVB induz danos cutâneos inflamatórios que podem levar ao câncer de pele. Nesse contexto, uma alternativa para proteção da pele seria o uso tópico de mediadores lipídicos. A resolvina D5 (RvD5) é um mediador lipídico endógeno anti-inflamatório gerado a partir do ácido graxo poli-insaturado omêga-3. Apesar do estabelecimento das propriedades anti-inflamatória e pró-resolução da RvD5 em alguns modelos de doença, ainda não existem evidências do seu efeito terapêutico no dano inflamatório induzido pela radiação UVB. **Objetivo:** Investigar a eficácia da RvD5 nos danos cutâneos inflamatórios induzidos pela radiação UVB em camundongos sem pelo. **Material e métodos:** O projeto foi aprovado pela CEUA da UEL (registro no CEUA sob o nº 148/2016, processo no 11146.2016.97). Camundongos sem pelo (HRS/J) foram alocados em grupos de 6 animais e submetidos a radiação UVB (4,14 J/cm²) para indução do processo inflamatório. Foram realizados 3 tratamentos tópicos com 0,5 g de formulação com e sem RvD5 na superfície dorsal cutânea 1h antes, 5 min antes e logo após a irradiação na dose de 0,03 ng/animal. 12h após a irradiação as amostras de pele do dorso dos animais foram coletadas e foi determinado o edema, expresso pela variação do peso de pele, a atividade da mieloperoxidase (MPO) por método espectrofotométrico, a atividade da metaloproteinase-9 (MMP-9) por zimografia em gel de poliacrilamida e análise histológica do colágeno. A análise estatística foi feita por análise de variância seguido de Tukey. **Resultados:** RvD5 reduz o edema de pele, a migração de leucócitos (MPO), a atividade da MMP-9 e, por fim, a degradação das fibras de colágeno induzidos pela radiação UVB. **Conclusão:** RvD5 é um lipídeo anti-inflamatório/pró-resolução promissor para o tratamento da inflamação induzida pela radiação UV.

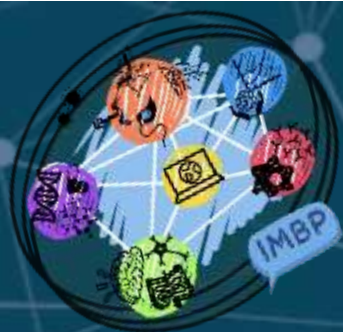
Palavras-chave: colágeno; RvD5; inflamação.

Financiador (es): CNPq

Área temática: Farmacologia

The background of the page is a light blue color with a series of darker, flowing, curved lines that create a sense of movement and depth. These lines are most prominent on the left side and curve towards the right, framing the text.

Fisiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DIETA COM BAIXO TEOR DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DIMINUI A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM RATOS

Any Carolina Chagas¹; Maísa Trevisan Nosse²; Naiara Cristina Lucredi³; Heloísa Pereira Maróstica³; Vanesa Oliveira Pateis⁴; Lucas Paulo Saavedra⁴; Lívia Bracht⁵; Anacharis Babeto de Sa Nakanishi⁵; Adelar Bracht⁵; Jurandir Fernando Comar⁵

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Indivíduos com dietas cetogênicas de alto teor de gordura têm desenvolvido resistência à insulina e esteatose hepática. Ratos tratados com dietas cetogênicas de baixo teor de carboidratos e proteínas (LP-KD) permanecem magros, desenvolvem cetose, acumulando triglicérideo hepático, desenvolvendo resistência à insulina hepática e intolerância à glicose sistêmica. **Objetivos:** investigar os efeitos de uma dieta LP-KD suplementada com colina e metionina na homeostase da glicose e no metabolismo hepático de ratos. **Material e métodos:** Ratos Wistar foram tratados por 15-30 dias com LP-KD (aprovado pelo CEUA: N°6039280220). Cetogênese e gliconeogênese foram medidos em fígados perfundidos. A expressão de mRNA de enzimas-chave foi medida no fígado. Foram realizados testes de tolerância à insulina e glicose oral e o perfil lipídico determinado no plasma. **Resultados:** A cetogênese hepática de palmitato e cetonas plasmáticas aumentaram em ratos LP-KD, apesar de não haver perda significativa de peso. O peso dos tecidos adiposos brancos foi 50% maior em ratos LP-KD. Sem substrato exógeno, a produção de glicose aumentou nos fígados perfundidos de ratos LP-KD após 18h de jejum, como consequência do aumento da glicogenólise. A gliconeogênese hepática de lactato e glicerol diminuiu em ratos LP-KD. As expressões hepáticas de mRNA de frutose-1,6-bifosfatase e fosfoenolpiruvato-carboxicinase foram igualmente diminuídas nesses animais. Glicogênios hepáticos e os conteúdos lipídicos eram 2 vezes maiores em ratos LP-KD. A glicemia do jejum e a intolerância à glicose foram modestamente aumentadas em ratos LP-KD, mas a sensibilidade à insulina foi preservada. **Conclusão:** Não houve perda significativa de peso em animais LP-KD, devido a suplementação da metodologia, mas a gliconeogênese é reduzida no fígado, provavelmente devido ao baixo teor de proteína. O aumento de glicogênio e lipídios no fígado ocorre devido ao alto teor de gordura da dieta, apesar de lipídios hepáticos e resistência à insulina serem minimizados quando há suplementação com colina.

Palavras-chave: dieta cetogênica; gliconeogênese; metabolismo hepático.

Área temática: Fisiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DO CONSUMO SEMANAL DE RAÇÃO NUTRICIONAL E ÁGUA EM ANIMAIS HIPERTRIGLICERIDÊMICOS QUE SUPER EXPRESSAM A APOLIPOPROTEÍNA apoCIII SUBMETIDOS A TREINAMENTO AERÓBICO DE 8 SEMANAS EM ESTEIRA

Cristiany Schultz¹; Nilton Rodrigues Teixeira Junior²; Diogo Rodrigues Jimenes³; Ramon Valério⁴; Carmem Patrícia Barbosa⁵; Jairo Augusto Berti⁶

¹Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Educação Física, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Doutorando em Educação Física, Departamento de Educação Física, Universidade Estadual de Maringá/ Universidade Estadual de Londrina, Maringá/PR

⁴Acadêmico de Educação Física, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O alimento fornecido aos animais submetidos a estudo científico deve conter em sua composição nutrientes que permitam atender as necessidades nutricionais de crescimento dos animais jovens e a manutenção do peso dentro da normalidade na fase adulta destes animais, bem como deve haver ainda água em quantidade necessária conforme a espécie em estudo. O consumo diário de ração nutricional e água se faz necessário para melhor desempenho relacionado ao estado nutricional do animal submetido a estudo, estando diretamente relacionada a sua condição metabólica. Animais que super expressam a apoCIII submetidos a atividade física diária adquirem condição de estresse físico alterando seu metabolismo levando a adaptações estruturais e metabólicas. **Objetivo:** Avaliar o consumo semanal de ração e água em animais hipertigliceridêmicos submetidos a treinamento aeróbico de 8 semanas em esteira ergométrica. **Material e métodos:** Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Interna de Biossegurança- CIBio e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 7925010719 da Universidade Estadual de Maringá. Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6 divididos em 4 grupos, transgênico treinado (n=10) e seu controle sedentário (n=8), não transgênico treinado (n=10) e seu controle sedentário (n=08). O treinamento consistiu em 3 sessões de 44 minutos, por 8 semanas. O consumo de ração e água de ambos os grupos de animais foi analisado e documentado para posterior análise estatística. **Resultados:** Nossos resultados apontaram diferença significativa no consumo diário de ração no grupo apoCIII exercitado ($23,7 \pm 2,1$ g) e quando comparado com o seu controle apoCIII sedentários ($20,4 \pm 1,2$ g). No grupo não-transgênico exercitado também houve aumento ($25 \pm 2,8$ g) quando comparados ao grupo de animais e não transgênico sedentário ($21,4 \pm 1,7$ g). **Conclusão:** Diante dos resultados obtidos confirmamos a importância do acompanhamento diário da nutrição destes animais hipertigliceridêmicos submetidos a rotina de exercício intenso em esteira ergométrica. Observando que em ambos os grupos, os animais que treinaram apresentaram maior consumo de ração.

Palavras-chave: hipertigliceridemia; atividade física; nutrição.

Financiador (es): FADEC- Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico UEM

Área temática: Fisiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

A EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE COBRE EM RATOS DIABÉTICOS REDUZ A REATIVIDADE DE VASOS DE CONDUTÂNCIA

Julia Antonietta Dantas da Silva¹; Dalton Valentim Vassallo²; Karolini Zuqui Nunes³

¹Acadêmica de graduação em Enfermagem, Multivix.

²Docente - programa de Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo

³Docente – Enfermagem Médico-Cirúrgica no Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Introdução: Sabe-se que a diabetes mellitus está associado à diversas alterações cardiovasculares como o aumento da rigidez arterial. Além disso, o aumento da concentração plasmática de cobre é característico nesses indivíduos. Sugere-se que exista uma relação entre esse aumento do cobre plasmático e o desenvolvimento das alterações cardiovasculares, porém até o momento esses mecanismos não foram elucidados. **Objetivo:** O presente estudo busca investigar o efeito da sobrecarga crônica de cobre sobre a reatividade vascular em segmentos isolados de aorta torácica de ratos diabéticos **Material e métodos:** Trata-se de um estudo experimental, onde foram utilizados cerca de 20 ratos Wistar de 12 semanas, com aproximadamente 200g, provenientes do biotério central da UFES. Os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA – UFES N° 22/2019. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: controle (CT); cobre (Cu); diabetes (DM); diabetes+cobre (DM+Cu). O diabetes tipo 1 foi induzido por injeção única de estreptozotocina 50mg/kg/i.v.; os animais foram tratados com o dobro da dose recomendada diária de cobre (1.8mg/kg). Após 30 dias de tratamento, foram sacrificados e a aorta torácica foi retirada para realização de experimentos de reatividade vascular. Utilizou-se testes estatísticos como ANOVA uma e duas vias para análise dos resultados. **Resultados:** Quando avaliada a reatividade vascular, observou-se uma redução na reatividade vascular no grupo DM+Cu, provavelmente causada por aumento de óxido nítrico (NO). Incubando os anéis de aorta com fármacos para verificar as vias afetadas, encontramos em ratos diabéticos expostos a sobrecarga de cobre: um aumento da biodisponibilidade de NO; ação de fatores vasodilatadores da NADPH oxidase, sugere-se a participação de H₂O₂; atuação de canais para potássio; possível participação da angiotensina II como vasodilatadora, atuando em receptores AT₂. **Conclusão:** A sobrecarga de cobre em ratos diabéticos causa uma redução na reatividade vascular da artéria aorta, devido a um aumento de fatores vasodilatadores, possivelmente o NO e H₂O₂.

Palavras-chave: cobre; diabetes mellitus; aorta.

Área temática: Fisiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS DE COMPOSIÇÃO CORPORAL E PERFIL BIOQUÍMICO DE ADOLESCENTES DO SEXO FEMININO COM OBESIDADE

Marielle Priscila de Paula Silva-Lalucci¹; Fabiano Mendes de Oliveira²; Braulio Henrique Magnani Branco³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Promoção da Saúde, Universidade Cesumar, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Promoção da Saúde, Universidade Cesumar, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Universidade Cesumar, Maringá/PR

Introdução: No Brasil, a prevalência de adolescentes do sexo feminino com excesso de peso e obesidade, conjuntamente, impactaram 23,8% da população em 2015, sendo que a quantidade relativa de gordura nas meninas, aumenta progressivamente durante o envelhecimento. Sabe-se que o excesso de peso pode aumentar os riscos de acometimento por dislipidemias, diabetes *mellitus* e de hipertensão arterial. A obesidade quando instalada precocemente nas crianças e adolescentes, eleva o risco cardiovascular na vida adulta. **Objetivo:** Correlacionar índices antropométricos, variáveis da composição corporal e perfil bioquímico, de adolescentes do sexo feminino, com excesso de peso ou obesidade. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal, realizado com 71 adolescentes entre 12 a 17 anos de idade, ingressantes em um programa interdisciplinar para o tratamento da obesidade, no período de 2017 a 2020. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa local, sob o número: 3.837.408, da Universidade Cesumar. As seguintes variáveis foram analisadas: massa livre de gordura (MLG), índice de massa magra (IMM), massa musculoesquelética (MME), colesterol total (CT), glicose e lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c). Após a confirmação da normalidade, utilizou-se a correlação de *Pearson*, a fim de testar possíveis associações entre as variáveis, através do Software SPSS®, assumindo um nível de significância de 5%. **Resultados:** As principais correlações observadas foram: MLG e LDL-c ($r = -0,22$), IMM e CT ($r = -0,30$), IMM e LDL-c ($r = -0,27$), MME e LDL-c ($r = -0,23$), glicose e LDL-c ($r = 0,40$), CT e MME ($r = -0,25$), todas com $p < 0,05$. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo sugerem que níveis mais elevados de MLG, IMM e MME, são fatores protetores da saúde cardiometabólica. Finalmente, o monitoramento da composição corporal e das variáveis bioquímicas, são substanciais para determinar possíveis riscos à saúde cardiovascular de adolescentes do sexo feminino.

Palavras-chave: adiposidade; promoção da saúde; saúde do adolescente.

Financiador: Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação.

Área temática: Fisiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBICO DE 8 SEMANAS EM ESTEIRA NA MASSA CARDÍACA DE ANIMAIS DISLIPIDÊMICOS POR SUPEREXPRESSION DA ApoCIII: DADOS PRELIMINARES

Nilton Rodrigues Teixeira Junior¹; Cristiany Schultz²; Diogo Rodrigues Jimenes³; Ramon Valério¹; Carmem Patrícia Barbosa⁴; Jairo Augusto Berti⁵.

¹Graduando em Educação Física, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Doutorando em Educação Física, Departamento de Educação Física, Universidade Estadual de Maringá/ Universidade Estadual de Londrina, Maringá/PR, Londrina/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵Docente – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: Camundongos transgênicos que superexpressam a apoCIII-humana tornam-se hipertrigliceridêmicos e dislipidêmicos, condições que propiciam o animal a doenças cardiometabólicas. O exercício físico é uma condição de estresse que modifica tanto o metabolismo quanto a musculatura esquelética e/ou cardíaca de quem realiza. O coração, um dos principais órgãos afetados durante exercício, garante o suprimento sanguíneo ao músculo periférico, e remove metabólitos produzidos pela contração muscular intensa. **Objetivo:** Analisar se o efeito do treinamento em esteira e o estado dislipidêmico modificam a massa cardíaca dos animais dislipidêmicos por super expressão da apoCIII.

Material e métodos: Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança - CIBio e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 7925010719) da Universidade Estadual de Maringá. Camundongos machos (linhagem C57Bl/6) foram distribuídos em 4 grupos (transgênico treinado n=10 e seu controle sedentário n=8, não-transgênico treinado n=10 e seu controle sedentário n=8). O treinamento consistiu em sessões de 44 minutos três vezes por semana, por 8 semanas. Após o treinamento, os animais foram submetidos a eutanásia e laparotomia para remoção cirúrgica do coração. Após remoção, o órgão foi pesado, e os dados foram analisados estaticamente por teste t de Student comparando as médias \pm desvio padrão. **Resultados:** Comparando os grupos sedentários, não obtivemos alterações significativas nos grupos transgênico para apoCIII ($0,18 \pm 0,04$ g) e controle ($0,17 \pm 0,02$ g). Porém, ao analisarmos a massa cardíaca dos animais treinados, identificamos redução significativa no grupo transgênico exercitado ($0,15 \pm 0,01$ g) quando comparado ao grupo de animais não-transgênicos também treinados ($0,17 \pm 0,01$ g). **Conclusão:** A massa cardíaca dos animais transgênicos para apoCIII pós treinamento é menor quando comparado ao grupo controle, efeito esse, potencializado pelo exercício, visto que os animais sedentários não apresentaram alterações. Ressaltamos ainda que os resultados passarão por análises futuras, para maiores elucidações a respeito do tema.

Palavras-chave: dislipidemia; exercício físico; metabolismo.

Financiador (es): FADEC- Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico UEM

Área temática: Fisiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS POR SUPEREXPRESSION DA ApoCIII APRESENTAM CONSERVAÇÃO DA MASSA TOTAL DE GORDURA APÓS 8 SEMANAS DE TREINAMENTO AERÓBICO: DADOS PRELIMINARES

Ramon Valério¹; Nilton Rodrigues Teixeira Junior¹; Cristiany Schultz²; Diogo Rodrigues Jimenes³; Carmem Patrícia Barbosa⁴; Jairo Augusto Berti⁵.

¹Graduando de Educação Física, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Doutorando em Educação Física, Departamento de Educação Física, Universidade Estadual de Maringá/ Universidade Estadual de Londrina, Maringá/PR, Londrina/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR. ⁵Docente – Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: Camundongos transgênicos para super expressão da apoCIII humana tornam se hipertrigliceridêmicos e dislipidêmicos. Tal condição torna o animal propenso a ser aterosclerótico, obeso, entre outras patologias relacionadas ao seu metabolismo. O Exercício físico, é uma condição de estresse físico que pode modificar o metabolismo daquele que o pratica de forma sistematizada. Já é bem difundido na literatura que essas alterações metabólicas podem consumir ácidos graxos oriundos do tecido adiposo, como substrato energético. **Objetivo:** Identificar se o treinamento de 8 semanas em esteira tem efeitos sobre o tecido adiposo total em camundongos dislipidêmicos por super expressão da apoCIII e seu controle normal. **Material e métodos:** Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança - CIBio e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 7925010719) da Universidade Estadual de Maringá. Camundongos machos (linhagem C57Bl/6) foram divididos em 4 grupos (transgênico treinado n=10 e seu controle sedentário n=8, não-transgênico treinado n=10 e seu controle sedentário n=8). O treinamento consistiu em 8 semanas, com 3 sessões semanais, cada sessão com 44 minutos de treino. Após o treinamento, os animais foram submetidos à eutanásia, para remoção cirúrgica das gorduras viscerais, perigonadais, subcutâneas, retroperitoneais e tecido adiposo marrom. Após a coleta, o material foi pesado e os dados foram analisados estaticamente por teste t de Student comparando as médias \pm desvio padrão. **Resultados:** Diante nossos resultados não identificamos alterações significativas entre os animais transgênicos treinados ($1,02 \pm 0,2$ g) e seu controle sedentário ($1,22 \pm 0,48$ g), assim como os animais não transgênicos treinados ($0,80 \pm 0,15$ g) não diferiu para seu controle sedentário ($0,96 \pm 0,28$ g). **Conclusão:** Concluímos que o treinamento de 8 semanas não alterou o tecido adiposo total destes animais. Todavia são dados preliminares, os resultados passarão por análises futuras para maiores elucidações a respeito do tema.

Palavras-chave: dislipidemia, exercício físico, tecido adiposo.

Financiador (es): FADEC- Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico UEM

Área temática: Fisiologia

The background of the page is a light blue color with a series of darker, flowing, curved lines that create a sense of movement and depth. The lines are most prominent on the left side and curve towards the right.

Genética



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EXPRESSÃO DA PROTEASE PRINCIPAL 3CL DE SARS-CoV-2

Ingrid Garcia de Araujo¹; Jose Renato Pattaro Junior²; Maria Aparecida Fernandez³; Flavio Augusto Vicente Seixas⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente - Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Docente – Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama/PR

Introdução: A Covid-19, doença causada pelo coronavírus (SARS-CoV-2), atualmente é o maior desafio de saúde pública em todo o mundo, com mais de 750 mil mortes descritas. Trata-se de um vírus altamente transmissível que utiliza suas proteínas estruturais para infectar células humanas. Na ausência de uma vacina, a busca por fármacos antivirais capazes de inibir a progressão da doença é de relevância médica e científica. Assim, a protease principal NSP5(3C-like proteinase, E.C.3.4.22.69) é um alvo promissor para o tratamento da doença, visto sua função na replicação viral. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é expressar e purificar a NSP5 protease de SARS-CoV-2 para avaliação *in vitro* de potenciais medicamentos contra Covid-19. **Materiais e métodos:** O plasmídeo contendo o gene NSP5(GenBank 43740578) no vetor pET22b foi obtido da FastBio e utilizado para transformar bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3), por meio de choque térmico. Para superexpressão, foram utilizados 200 ml de meio LB com 50µg.ml⁻¹ de ampicilina. Após a cultura atingir 0,6 de OD600, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5mM, e incubado por 14h a 16°C. A expressão foi confirmada por método qualitativo em SDS-PAGE, e a purificação realizada em coluna HisTrap por cromatografia de afinidade. A confirmação da pureza foi feita por nova SDS-PAGE com quantificação no software ImageJ. **Resultados:** Houve crescimento bacteriano em meio com ampicilina após a transformação. A expressão da NSP5 foi observada pela análise em SDS-PAGE, através da comparação das bandas obtidas com o peso molecular estimado para a proteína de interesse (34,9 kDa). Com a purificação da proteína, obteve-se uma concentração de 0,735mg/ml com pureza de 92%. **Conclusão:** A transformação bacteriana por meio de choque térmico mostrou-se eficaz. O sucesso da expressão de NSP5 foi observado através análise qualitativa. A purificação também apresentou bons resultados, isolando a protease de interesse para ensaios futuros de atividade proteolítica.

Palavras-chave: coronavírus; protease; antivirais.

Financiador (es): Capes, Fundação Araucária, CNPq.

Área temática: Genética



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

MICRORNA-155 AS THERAPEUTIC OPTION FOR CANCER TREATMENT

Edmara de Toledo Ninzoni Menon¹; Jessica Amanda de Paula²; Julia Alejandra Pezuk³

¹Graduated student. Programa de Farmácia. Universidade Anhanguera de São Paulo, UNIAN/SP, São Paulo/SP

²Undergrad student. Programa de Farmácia. Universidade Anhanguera de São Paulo, UNIAN/SP, São Paulo/SP

³Professor – Programa de Farmácia, Biotecnologia e Inovação em Saúde, Ensino de Ciências e Saúde, Universidade Anhanguera de São Paulo, UNIAN/SP, São Paulo/SP

Introduction: MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs that regulate gene expression by interacting with mRNAs (messenger RNAs). MiRNAs are dysregulated in cancer, and have been widely explored as biomarkers, and recently also as therapeutic targets. However, to be able to propose miRNA as cancer therapeutic it is necessary to understand its expression level and its mRNAs targets to fathom the biological consequences. Cobomarsen (MRG-106), a miR-155 inhibitor, is the only compound that is being tested in clinical trials, nonetheless there is still a lack of information to predict its effect on cancer. **Objectives:** Compare miR-155 expression in cancer and its mRNAs' targets to predict its utility for oncology treatment. **Materials and Methods:** MiR-155 expression data were collected from dbDMEC 2.0 and miRCancer. MiR-155-5p and miR-155-3p predicted targets were obtained from TargetScanHuman and miRDB. MirTarbase and Tarbase were used for experimentally validated targets. **Results:** Analyzing mRNAs targets we found 280 predicted common targets on both datasets for miR-155-5p and 385 mRNAs for miR-155-3p. When predicted targets were compared with validated datasets, there were 123 common mRNAs for miR-155-5p in all databases, however, there were only 10 predicted mRNAs to interact with miR-155-3p, that were listed at least in one mRNA target validated database. Moreover, we were able to show that miR-155 has been described both up and down-regulated in Burkitt's lymphoma; chronic myelogenous leukemia, hepatocellular carcinoma; melanoma; breast, lung; colorectal, kidney, pancreatic, bladder, gastric, cervical and lung cancer pointing to the need of defining miR-155 level according to subtype before treatment. **Conclusion:** Despite the large amount of information about miR-155, miRNA-mRNA interaction is not completely understood to be able to use those molecules in the clinic. Data for miR-155 present divergence, evidencing the need to determine the expression level and mRNAs cell's profile to predict an accurate outcome during cancer treatment.

Keywords: miR-155; cancer; therapy.

Financial Support: Universidade Anhanguera de São Paulo. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -Cnpq

Tematic area: Genetic



Imunogenética



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EXTRAÇÃO DE DNA DE LEITE HUMANO POR DIFERENTES METODOLOGIAS

Joana Maira Valentini Zacarias¹, Fernando Hideki Fuyama², Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka³, Giovana Paola Bemvides Zaccarias⁴, Jeane Eliete Laguilha Visentainer⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵Docente – Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: O leite humano (LH) é um fluido fisiológico que apresenta, além de caráter nutritivo, biomoléculas não nutritivas, como células da lactente. Assim, este fluido de coleta não invasiva pode ser uma fonte de DNA. **Objetivo:** Avaliar a melhor metodologia de extração de DNA e qual a melhor fase do LH para se obter material genômico de qualidade. **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo COPEP-UEM número 2.797.476/2018. A partir das diferentes fases do LH (colostro=C, transição=T e maduro=M) foram realizadas extrações de DNA pela metodologia de *salting out* (*in house*) com modificações e por dois diferentes kits comerciais, Qiagen DNA blood mini kit™ e BioPur®, destinados à extração de DNA do sangue. A qualidade e quantidade do DNA obtido foram avaliadas em equipamento Nanodrop 2000® e gel de agarose 2% corado com Syber® Safe. Comparações foram realizadas para definir qual a melhor fase do LH para extração de DNA e qual a técnica que garante material de maior qualidade. A viabilidade do DNA extraído foi avaliada por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores do hormônio do crescimento (HGH). Amostras de DNA extraídas de sangue total foram utilizadas como controle positivo de amplificação. **Resultados:** Na quantificação de DNA por Nanodrop2000®, maior concentração foi observada na extração por Qiagen™ (C=33,9ng/μL; T=14,9ng/μL e M=55,6ng/μL), seguida da extração por *salting out* modificado (C=7,4ng/μL; T=13,2ng/μL e M=12,0ng/μL). Ambas extrações apresentaram grau de pureza satisfatório. Não é possível quantificar a extração de DNA por Biopur® em Nanodrop 2000®, no entanto, todas as amostras foram visualizadas em gel de agarose. As reações de PCR foram possíveis para todas as metodologias nas diferentes fases de lactação. **Conclusão:** Foi observado DNA nas três fases de lactação por todas as metodologias utilizadas, com viabilidade para amplificação.

Palavras-chave: leite humano; DNA; biologia molecular.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária do Estado do Paraná, Brasil e Laboratório de Imunogenética: LIG-UEM.

Área temática: Imunogenética.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PCR-ARMS PARA A GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs2073618 NO GENE OSTEOPROTEGERINA

Leticia Cristina de Almeida Silva¹; Marlon Massayoshi Oshida²; Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka³;
Joana Maira Valentini Zacarias⁴; Quirino Alves de Lima Neto⁵; Ana Maria Sell

¹Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Pós Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

⁵Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O gene que codifica osteoprotegerina (*OPG* ou *TNFRSF11B*) é membro da superfamília do receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Essa proteína atua como receptor para RANK-L, regulando negativamente a reabsorção óssea. Dentro do gene *OPG*, existem SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo Único), dentre os quais, se destaca o rs2073618. Essa mutação caracteriza-se pela troca de guanina por citosina (G>C), alterando asparagina por lisina na proteína codificada. A análise genética de polimorfismos de *OPG* pode indicar a predisposição no desenvolvimento de patologias ósseas. **Objetivo:** Desenvolver e otimizar uma técnica de genotipagem eficiente para detectar o polimorfismo rs2073618 no gene *OPG*. **Material e métodos:** A técnica escolhida de genotipagem foi *Polymerase Chain Reaction - Amplification Refractory Mutation System* (PCR-ARMS), no qual constrói-se *primers* com uma sequência específica para cada alelo possível do polimorfismo. Realizou-se a otimização das etapas e a concentração de reagentes, testando a reação com três amostras de genótipos conhecidos: C/C, G/G e C/G. Como controle de amplificação, utilizou-se *primers* do gene do hormônio do crescimento (*hGH*) para evitar que falhas na reação fossem confundidas com falsos negativos. Para visualizar os produtos de PCR realizou-se corrida eletroforética em gel de agarose 2% à 150W, 300mA, 150V por 10 minutos. O estudo foi executado conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEM (Parecer nº 719/2011 e 1.866.509/2016). **Resultados:** Após os testes, determinou-se que a melhor temperatura de anelamento e concentração de MgCl₂ foram, 60°C e 1,5mM, respectivamente. Ao testar a reação para falsos positivos e negativos, observou-se boa distinção entre os genótipos. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem que a técnica de PCR-ARMS é eficaz para a determinação dos genótipos para o SNP rs2073618 no gene *OPG*. No entanto, mais testes são necessários utilizando outra técnica, para validar os resultados obtidos.

Palavras-chave: osteoprotegerina; polimorfismo de nucleotídeo único; reação em cadeia da polimerase.

Financiador (es): Laboratório de Imunogenética – Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária (FA).

Área temática: Imunogenética.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PADRONIZAÇÃO DE PCR-SSP PARA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs1800896 NO GENE *IL10*

Natalia Teles Pereira¹; Matheus Braga²; Larissa Danielle Bahls³; Jeane Eliete Laguila Visentainer⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina imunorreguladora com atividade imunossupressora e estimuladora na resposta imune. Na região promotora do gene *IL10* existem polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que influenciam na taxa de expressão da citocina. Entre eles, o polimorfismo na posição -1082A/G (rs1800896), cuja troca de uma guanina por uma adenina é associada à níveis baixos de IL-10, pode estar associada à predisposição de algumas doenças.

Objetivo: padronizar uma genotipagem eficiente na detecção do polimorfismo rs1800896 no gene *IL10*.

Material e métodos: A genotipagem foi determinada pela reação em cadeia da polimerase utilizando primers específicos (*Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers* - PCR-SSP), com os três genótipos obtidos: A/A, A/G e G/G, de aproximadamente 550pb. Amostras previamente genotipadas foram usadas como controle positivo. Como controle interno, utilizou-se *primers* do gene do hormônio do crescimento (HGH) de aproximadamente 431pb. Os produtos finais de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% a 150W, 300mA, 120V por 20 minutos. O estudo foi executado conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEM (CAAE 687.222 / 2014). **Resultados:** As melhores concentrações para cada reagente foram 50 ng de DNA, 1,8 ng/ μ M de cada *primer IL10*, 0,75 ng/ μ M de cada *primer HGH*, 0,19 mM de cada mix dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ para o alelo G e 2,0 mM para o alelo A, tampão 0,47 X e 0,55 U de DNA Taq polimerase. As condições ideais de PCR para amplificação foram: 94 °C / 5 min, seguido por 32 ciclos: 95 °C / 40s, 65 °C / 50s, 72 °C / 40s e extensão final de 72 °C / 7 min. **Conclusão:** os resultados sugerem que a padronização da técnica de PCR-SSP foi adequada na determinação dos genótipos para o SNP rs1800896 no gene *IL10*.

Palavras-chave: interleucina 10; polimorfismo de nucleotídeo único; reação em cadeia da polimerase.

Financiador (es): Laboratório de Imunogenética – UEM.

Área temática: Imunogenética

The background of the page is a light blue gradient with several thick, flowing, curved lines in a slightly darker shade of blue. These lines sweep across the top and left sides of the page, creating a sense of movement and depth. The overall aesthetic is clean, modern, and professional.

Imunologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AValiação dos Níveis Séricos de Antígeno Prostático Específico em Pacientes do Município de Campo Erê-SC

Bruno Xavier Kemper¹; Débora Fiorentin Vandresen².

¹Acadêmico de Graduação em Farmácia, Centro Universitário UNISEP.

²Docente – Centro Universitário UNISEP.

Introdução: A próstata pode ser acometida por certas patologias, como a prostatite, hiperplasia benigna e o câncer de próstata. Os portadores dessa neoplasia geralmente não apresentam sintomas iniciais, podendo vir a demonstrar alguns semelhantes aos observados na hiperplasia prostática. Alguns exames são necessários para se estabelecer o diagnóstico, como o toque retal, ultrassonografia transretal, biópsia e histopatológico, análise da urina, e dosagem de antígeno prostático específico (PSA). A realização prévia destes exames auxilia no processo de diagnóstico precoce e facilita o prognóstico do paciente, uma vez que o câncer de próstata se encontra em segundo lugar como de maior incidência em homens acima de 60 anos. **Objetivo:** o presente estudo teve como objetivo avaliar a incidência de PSA alterado nos pacientes masculinos do município de Campo Erê – SC e suas principais condições clínicas. **Material e métodos:** pesquisa de campo, transversal, com caráter quantitativo, realizado em um laboratório de análises clínicas do município, com 101 participantes, aprovado pela plataforma Brasil com o parecer número 3943539 as variáveis analisadas foram obtidas por meio de questionários, denominados de qualidade de vida e escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS), e consulta de laudos dos exames de urina, os resultados foram inseridos em tabelas do programa Excel 2016, e as variáveis estatísticas submetidas ao programa SPSS 25.0. **Resultados:** 84,16% apresentaram níveis normais de antígeno, e 15,84% com valores alterados de PSA. Desses pacientes alterados observou-se uma idade média de $66,87 \pm 6,28$ anos, a maioria (68,25%) apresentou sintomas leves segundo a escala IPSS e não foi possível associar os fatores do uso de cigarro e bebida alcoólica com aumento de PSA. **Conclusão:** Pode-se concluir com o estudo que a incidência de alteração de PSA foi baixa na população do município, e que a idade avançada é um fator que colabora para a elevação dos níveis de antígeno.

Palavras-chave: câncer de próstata; antígeno prostático específico; interferências.

Área temática: imunologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE DERIVADOS DIESTERIFICADOS DO ÁCIDO URSÓLICO EM MACRÓFAGOS RAW264.7

Elaine Carlos Scherrer Ramos¹; Caio César de Souza Alves²; Ydia Mariele Valadares³; Sandra Bertelli Ribeiro de Castro³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares.

²Docente da Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri campus Mucuri.

³Docente do Instituto de Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares.

Introdução: O ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-12-en-28-oic) se encontra em diversas plantas medicinais. Estudos tem evidenciado seus efeitos biológicos devido à inibição da ativação do Fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator de transcrição envolvido na ativação de mediadores inflamatórios.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos de três derivados diesterificados do ácido ursólico (DAUDs). **Material e métodos:** As células RAW264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços a 2×10^5 células/mL em RPMI-1640 suplementado, mantidas a 37°C em 5% de CO₂ e estimuladas ou não com Lipopolissacarídeo (LPS) a 1 μ g/mL e Interferon- γ (IFN- γ) a 0,9 ng/mL. Mantidas durante 3 ou 48 h na presença ou ausência de ácido ursólico (AU) ou DAUDs a 90 μ M. Para o controle foram realizadas células estimuladas ou não estimuladas sem os tratamentos, células estimuladas ou não na presença de dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%. O óxido nítrico (NO) foi medido nos sobrenadantes de 48 h de cultura. A expressão de NF- κ B e a produção de fator de necrose tumoral (TNF) foi analisada nas culturas de 3 horas de tratamento. A viabilidade celular foi medida em culturas não estimuladas. Os dados foram analisados utilizando one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni (GraphPad Prism 5.0) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados: Os DAUD1(6,10 \pm 1,759), DAUD2(8,94 \pm 0,271), DAUD3(5,83 \pm 1,534) foram capazes de inibir a produção de NO quando comparado com o controle (14,77 \pm 2,523), sem afetar a viabilidade celular. Todos reduziram a expressão de NF- κ B, DAUD1(8,76 \pm 0,2), DAUD2(10,47 \pm 0,164), DAUD3(11,84 \pm 0,139), comparado ao controle (17,24 \pm 0,41) e foram capazes de reduzir a produção de TNF DAUD1(33,01 \pm 2,72), DAUD2(32,64 \pm 4,11), DAUD3(14,82 \pm 2,14) comparado ao controle (100%).

Conclusão: Os derivados diesterificados apresentaram baixa citotoxicidade e foram capazes de reduzir a expressão de NF- κ B e inibir a produção de NO e TNF na concentração testada. Portanto, esses derivados são promissores na atividade imunomoduladora.

Palavras-chave: ácido ursólico; macrófagos RAW264.7; atividade imunomoduladora.

Financiador (es): FAPEMIG, CNPq e CAPES.

Área temática: Imunologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS UTILIZANDO PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE ENVELOPE

Fernando Américo Jorge¹; Alice Bianchi de Oliveira²; Mateus Vailant Thomazella³; Deborah de Castro Moreira¹; Luciana Dias Ghiraldi Lopes⁴; Dennis Armando Bertolini⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Aluno de Iniciação Científica pelo programa PIBIC, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O Zika vírus (ZIKV) é um vírus de RNA de fita simples, envelopado e é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. A semelhança de sintomas com outras arboviroses torna sua distinção clínica um desafio. Devido à sua reatividade cruzada com outros flavivírus em exames laboratoriais, muitos esforços têm sido feitos para encontrar um teste confiável com bom custo-benefício para o diagnóstico de ZIKV. O diagnóstico sorológico é feito por meio da detecção de anticorpos circulantes contra o vírus. No entanto, a principal limitação deste método são as reações cruzadas com anticorpos produzidos por infecções prévias ou vacinação para outros flavivírus. Por isso, o diagnóstico ainda é impreciso, caro e não existe um modelo padronizado. O momento da evolução clínica e o teste realizado podem ser cruciais para detectar a infecção pelo ZIKV. **Objetivo:** Padronizar uma ferramenta de diagnóstico para a detecção do ZIKV por meio de um antígeno recombinante específico para este vírus, baseado em partes da proteína E do envelope viral, realizando a padronização do sorodiagnóstico através de ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). **Materiais e métodos:** Duas regiões da proteína E do ZIKV foram selecionadas para construção das proteínas quiméricas com expressão em *Escherichia coli*. Os testes de ELISA foram realizados com as proteínas recombinantes purificadas, utilizando plasmas positivos para IgM e IgG com anticorpos de cabra anti-IgG e anti-IgM humano conjugados com peroxidase (HRP) e sistema biotina-avidina. Revelação realizada com OPD (o-phenylenediaminedihydrochloride). **Resultados:** Resultados preliminares mostraram uma boa reatividade do ELISA com a proteína produzida. Conjugados peroxidase reagiram apenas para IgM. O sistema biotina-avidina apresentou boa reatividade com IgM e IgG. **Conclusão:** Os resultados são promissores, porém novos testes devem ser realizados para verificar especificidade da proteína para anticorpos contra o ZIKV, visando viabilidade e a padronização final do teste para ambos os anticorpos.

Palavras chave: Zika vírus; diagnóstico; Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.

Financiador: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná

Área temática: Imunologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

NÍVEL DE IL1 β E TNF α SALIVAR E O DESFECHO DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Kethllen Stephanie Beranger¹; Mayara Chiamulera²; Antuani Rafael Baptistela³.

¹Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

²Mestre em Biociências e Saúde, Hospital Universitário Santa Terezinha (HUST), Joaçaba/SC

³Professor do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Joaçaba/SC

Introdução: O carcinoma espinocelular (CEC) é o tumor mais comum de cabeça e pescoço, sendo frequentemente diagnosticado na cavidade oral, faringe e laringe. No Brasil, excluindo o câncer de pele, o câncer oral e de faringe são o 5º tipo de câncer mais incidente em homens e o 7º em mulheres. O uso do tabaco é o fator predisponente em aproximadamente 75% dos pacientes diagnosticados com CEC. Por vezes os pacientes são assintomáticos ou têm sintomas inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico precoce desses tumores, impactando em maior morbi-mortalidade. Proteínas salivares, como as interleucinas têm sido estudados como potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce, marcadores prognósticos e de recidiva tumoral. **Objetivo:** Avaliar a associação dos níveis das interleucinas 1 β (IL1 β) e TNF α com o desfecho de pacientes com CEC de cabeça e pescoço. **Material e métodos:** Esta pesquisa foi desenvolvida de acordo com a Resolução CNS 466/2012 do Ministério da Saúde e teve aprovação pelo Comitê de Ética conforme número do parecer: 3.716.708. A saliva de pacientes com CEC de cabeça e pescoço foi coletada no momento do diagnóstico. Os níveis de IL1 β e TNF α foram avaliadas através do método ELISA, e o desfecho em 3 anos coletado do prontuário dos pacientes. A análise estatística foi realizada com o programa Graphpad Prism. **Resultados:** Foram incluídos no estudo 10 pacientes com diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço. Destes, após 3 anos do diagnóstico, 4 estão em acompanhamento oncológico, 2 apresentaram recidiva tumoral e 4 foram a óbito. Ao comparar os níveis de IL1 β e TNF α ao diagnóstico, entre os 3 grupos de pacientes, não foi observada diferença estatisticamente significativa. **Conclusão:** Nessa coorte de pacientes com CEC de cabeça e pescoço, os níveis de IL1 β e TNF α salivar não apresentaram associação com o desfecho dos pacientes em 3 anos pós diagnóstico.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço; citocinas; biomarcadores.

Área temática: Imunologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EXPRESSÃO DE IL-6 EM EPITÉLIO DE AMOSTRAS DE CÉRVICE UTERINA POSITIVAS PARA HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO

Maria Gabrielle dos Santos Corrêa¹; Alda Maria Teixeira Ferreira²; Inês Aparecida Tozetti²; Carlos Eurico Fernandes²; Camila Mareti Bonin Jacob³; Marco Antonio Moreira Puga⁴; Andrielli Rodrigues dos Santos⁵; Milena Sonchine de Souza¹; Cacilda Tezelli Junqueira Padovani²

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

²Docente – Instituto de Biociências - INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

³Técnica - Instituto de Biociências - INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

⁴Pesquisador – Instituto de Biociências - INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

⁵Pesquisadora – Instituto de Biociências - INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

Introdução: A infecção persistente por *Papilomavírus* humano de alto risco oncogênico (HR-HPV) é um fator necessário para o desenvolvimento de lesões neoplásicas de cérvix uterina, sendo a resposta imunológica essencial para sua eliminação. Evidências sugerem que a Interleucina-6 (IL-6) pode estar relacionada com a formação do microambiente tumoral, sendo considerada um indicador de pior prognóstico. **Objetivo:** Detectar a expressão da IL-6 em células epiteliais de biópsias de cérvix uterina positivas para DNA de HR-HPV classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL) e de alto grau (HSIL). **Materiais e métodos:** Foram utilizadas 7 amostras de biópsia de cérvix uterina de pacientes submetidas à detecção de HR HPV-DNA (Cobas® HPV Test) e à análise histopatológica (CEP nº 2.685.400). Para identificação da IL-6 foram feitas reações de imunohistoquímica de marcação simples, utilizando o anticorpo primário monoclonal anti-IL-6 (Abcam, ab9324) com a diluição 1:500. A leitura das lâminas imunomarcadas foi feita por dois observadores, utilizando o aumento de 100x e 10 campos aleatórios do epitélio foram capturados utilizando o programa Motic Images Plus 2.0 acoplado ao microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon, NY, USA) e câmera digital Moticam 2300 3.0 Megapixels, e por fim, a imunomarcagem foi classificada em leve, moderada e forte. **Resultados:** Os tipos virais encontrados foram HPV 16 (n=2), HPV 16 e outros menos HPV 18 (n=2) e outros HR-HPV – 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (n=3). Todas as amostras classificadas como HSIL (5/5) apresentaram moderada expressão de IL-6 em células epiteliais, enquanto que entre as LSIL a expressão apresentou-se de leve (1/2) a moderada (1/2). **Conclusão:** A expressão moderada de IL-6 por células epiteliais nas amostras da cérvix uterina com lesões intraepiteliais de alto grau pode indicar uma facilitação na persistência viral e progressão do desenvolvimento tumoral.

Palavras-chave: imunohistoquímica; papilomavírus humano; interleucina 6.

Área temática: Imunologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EXPRESSÃO DE p16 EM CÉRVICE UTERINA DE PACIENTES INFECTADAS POR HPV DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO

Milena Sonchine de Souza¹; Inês Aparecida Tozetti ²; Alda Maria Teixeira Ferreira²; Camila Mareti Bonin³; Carlos Eurico dos Santos Fernandes ²; Marco Antonio Moreira Puga⁴; Andrielli Rodrigues dos Santos⁴; Maria Gabrielle dos Santos Corrêa¹; Cacilda Tezelli Junqueira Padovani²

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

²Docente – Instituto de Biociências – INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

³Técnica – Instituto de Biociências – INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

⁴Pesquisador – Instituto de Biociências – INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS

Introdução: A presença de *Papilomavírus* humano de alto risco oncogênico (HR-HPV) é um fator necessário para o desenvolvimento de lesões malignas do colo uterino. A presença da proteína p16 pode auxiliar na detecção de lesões escamosas associadas ao HR-HPV, por estar relacionada às alterações que ocorrem durante a infecção. **Objetivo:** Detectar a p16 em amostras de biópsia de cérvix uterina de pacientes positivas para DNA de HR-HPV, com lesões intraepiteliais escamosas de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL). **Material e métodos:** Foram utilizadas 7 amostras de biópsia de cérvix uterina de pacientes submetidas à detecção de HR HPV-DNA (Cobas ® HPV Test) e à análise histopatológica (CEP nº 2.685.400). A detecção de p16 em células epiteliais foi feita com imunohistoquímica (marcação simples), recuperação antigênica por calor úmido, HiDef Detection HRP Polymer System (Cell Marque, Califórnia 95677, USA), cromógeno líquido DAB e anticorpo primário monoclonal anti-p16 (Abcam 2D9A12, ab9324), diluído em proporção 1:1000. A leitura das lâminas imunomarcadas foi realizada com aumento 100x, por dois observadores independentes, em 10 campos aleatórios no epitélio escamoso, programa Motic Images Plus 2.0, microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon, NY, USA) e câmera digital Moticam 2300 3.0 Megapixels. Dividiu-se o epitélio em 3 terços, avaliando toda a sua extensão e a intensidade da marcação. **Resultados:** Os tipos virais encontrados foram HPV 16 (n=1), 18 (n=1) e outros HR-HPV - 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (n=5). Houve predomínio de expressão moderada/acentuada tanto nas amostras designadas HSIL (4/5), quanto nas LSIL (2/2), em toda a espessura do epitélio. **Conclusão:** Conclui-se que todas as amostras foram positivas para HR-HPV e para a presença de p16, sua superexpressão está relacionada as alterações que ocorrem durante a infecção, mostrando seu possível papel como biomarcador de progressão neoplásica no colo de útero.

Palavras-chave: imunohistoquímica; lesões escamosas; ciclo celular.

Área temática: Imunologia.

The background of the page is a light blue gradient with several thick, flowing, curved lines in a slightly darker shade of blue. These lines sweep across the top and left sides of the page, creating a sense of movement and depth. The overall aesthetic is clean, modern, and professional.

Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SELEÇÃO DE EPITOPOS ESPECÍFICOS DO VÍRUS DA DENGUE COM FOCO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Amauri Donadon Leal Junior¹; Flávio Augusto Vicente Seixas²; Erika Seki Kioshima³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama/PR

³Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: No primeiro trimestre de 2020, os casos prováveis de dengue quase dobraram quando comparados ao mesmo período de 2019. A similaridade dos sintomas e a co-circulação com outros arbovírus, como Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV), tornaram o diagnóstico diferencial um desafio ainda maior. **Objetivo:** Selecionar epítopos específicos do vírus da Dengue (DENV), através de ferramentas biotecnológicas, para desenvolver um teste diagnóstico capaz de distinguir entre seus quatro sorotipos, ZIKV e CHIKV. **Material e métodos:** As sequências de aminoácidos dos arbovírus ZIKV, CHIKV e DENV (quatro sorotipos), depositadas nas plataformas Virus Variation e UniProt, foram alinhadas para selecionar regiões de baixa identidade. Uma análise estrutural foi realizada para avaliar a exposição destas regiões na partícula viral. A especificidade das regiões selecionadas foi avaliada com auxílio do BLAST. O potencial imunogênico dos fragmentos e a estabilidade e dobramento das quimeras desenhadas foram preditas por ferramentas *in silico*. **Resultados:** Três epítopos específicos para DENV, um na proteína M e dois na proteína E foram selecionados. Esta mesma região foi analisada para diferenciar os quatro sorotipos do DENV. As duas regiões da proteína E estavam mais expostas na superfície do DENV, quando comparado a região estudada da proteína M. Na predição de epítopos tanto os lineares quanto os conformacionais foram considerados. As análises estruturais *in silico* das quimeras desenhadas para cada sorotipo do DENV foram consideradas estáveis e majoritariamente globulares. **Conclusão:** As ferramentas de bioinformática nos permitiram identificar regiões do DENV com baixo grau de identidade entre seus sorotipos e os arbovírus que co-circulam em nossa região: ZIKV e CHIKV, possibilitando a construção de quimeras candidatas a compor um diagnóstico sorológico diferencial.

Palavras-chave: sorologia diferencial; proteína recombinante; bioinformática.

Financiador (es): CAPES/ CNPq

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AValiação PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS POLISSUBSTITUÍDOS FRENTE A *Candida spp.* E *Paracoccidioides brasiliensis*

Arthur Antunes Ferrarezi¹; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini²; Raquel Cabral de Melo³; Érika Seki Kioshima Cotica⁴; Arildo José Braz de Oliveira⁵; Fernanda Andreia Rosa⁶; Regina Aparecida Correia Gonçalves⁵

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Profissional (Biomédica), Mestra em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

⁵Docente – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Os compostos heterocíclicos compõem uma importante classe da Química Orgânica: a Química de Heterociclos. Os aza-heterociclos de 5 membros são estruturas moleculares interessantes e presentes em fármacos, devido às suas propriedades físico-químicas e eletrônicas. A pesquisa de novos potenciais antifúngicos é de grande relevância, tendo em vista o surgimento de resistência aos antifúngicos azólicos tradicionais. Nesse contexto, os núcleos pirazolínico e tetrazólico mostram-se muito promissores no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. **Objetivo:** Avaliar o potencial antifúngico e a citotoxicidade de novos 3-tetrazolil-4-(hidroximetil)-5-aryl-*N*-fenilpirazóis e ácidos 5-aryl-4-(hidroximetil)-*N*-fenilpirazol-3-carboxílicos frente a *Candida spp.* e *P. brasiliensis*. **Material e métodos:** Realizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placa de 96 poços. As leveduras *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, e o fungo *P. brasiliensis*, foram obtidos da coleção do Laboratório de Micologia Médica do DAB-UEM. A citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazólio (MTS; leituras em 490-500 nm), utilizando células HeLa, Vero e HaCat. **Resultados:** O composto tetrazólico contendo o grupo 5-(4-nitrofenila) foi ativo frente a *C. tropicalis* (CIM = 64 µg/mL); já aquele com o grupo 5-(4-clorofenila) foi ativo frente a *C. glabrata* e *C. tropicalis* (CIM = 256 µg/mL). Ambos os compostos foram fungistáticos. Para o *P. brasiliensis*, o ácido carboxílico e o tetrazol contendo o grupo 5-(4-clorofenila) apresentaram valores de CFM de 128 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. Nenhum composto foi citotóxico nas concentrações em que exerceram ação fungistática ou fungicida. **Conclusão:** Os resultados, obtidos preliminarmente, mostraram que os derivados pirazolínicos contendo o núcleo tetrazólico são promissores agentes antifúngicos, pois exerceram atividade sobre os fungos sem citotoxicidade. A determinação da CIM e CFM dos demais compostos será realizada, a fim de se estabelecer as relações entre estrutura química *versus* atividade.

Palavras-chave: pirazol; tetrazol; antifúngico.

Financiadores: CAPES e CNPq

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

Ex vivo PHOTOACOUSTIC SPECTROSCOPY FOR MONITORING DERMATOPHYTOSIS AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY WITH HYPERICIN IN P-123

Camila Barros Galinari¹; Pollyanna Cristina Vicenzi Conrado¹; Glaucia Sayuri Arita¹; Tiago de Paula Bianchi²; Raquel da Silva Pálacios³; Monique de Souza³; Mauro Luciano Baesso⁴; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski⁵; Erika Seki Kioshima Cotica⁵; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁵

¹Graduate student (Doctorate degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

²Graduate student of Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

³Graduate student (Doctorate degree), Program of Physics, State University of Maringá, Maringá, PR

⁴Professor, Department of Physics, State University of Maringá, Maringá, PR.

⁵Professor, Department of Clinical Analyzes and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR.

Introduction: The superficial nature of dermatophytosis and the facility of application of light sources, credit the use of nanoencapsulated hypericin in P-123 associated with photodynamic therapy (P123-Hy-PDT) as a powerful tool to treat this pathology. This efficiency can be observed with Photoacoustic spectroscopy (PAS) that has been shown to be an effective method in dermatological research to characterize tissue and lesions. **Aim:** To evaluate the efficiency of P123-Hy-PDT against the dermatophytosis occasioned by *Microsporum canis* using the PAS. **Materials and methods:** The procedures were approved by the CEUA-UEM (nº 5708300418). Male Swiss mice were infected with a cell suspension containing 1×10^6 *M. canis* conidia/mL. The P123-Hy-PDT was applied using 6.25 µmol/L P123-Hy and LED system with 70.5 J/cm² fluence, performed every 48 h. Animals were divided into four groups: healthy, negative control, positive control and P123-Hy-PDT, the euthanasia was performed on day 1, 4, 10, and 16 of the experiment, subsequently, the skin was removed and analyzed immediately for PAS *ex vivo*. All spectra were obtained in the spectral range of 300 to 750 nm, using the power of the lamp at 800 W and the light modulation frequency at 13 Hz. **Results:** On day 10, the negative control spectrum showed the same behavior of a healthy animal, whereas the infected animal (positive control) exhibited absorption between 300 and 650 nm due to the *M. canis* skin infection process. The absorption spectrum of the treated animal (P123-Hy-PDT) on this day indicated attenuation of the infection because there was a reduction in absorption intensity associated with the infectious process. On day 16, all spectra were similar to the spectrum of a healthy animal due to spontaneous healing. **Conclusion:** Our study evidenced that PAS is satisfactory for monitoring of effectiveness of P123-Hy-PDT against *M. canis* infection.

Keywords: dermatophytosis; photodynamic therapy; photoacoustic spectroscopy.

Thematic Field: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SPECIES AND SUSCEPTIBILITY TO AZOLIC ANTIFUNGALS IN *Aspergillus* spp ENVIRONMENTAL STRAINS FROM THE SOUTHEAST REGION OF BRAZIL

Carlos Alberto Passinho Campos¹; Gabriel Manzi Oliboni²; Rogério Antônio de Oliveira³; Cibele Aparecida Tararam⁴; Larissa Ortolan Levy⁴; Juliana Possato Fernandes Takahashi⁵; Lucas Xavier Bonfietti⁶; Akira Watanabe⁷; Maria Luiza Moretti⁸; Marcia de Souza Carvalho Melhem⁹

¹Graduate Student (Doctorate) in Clinical Medicine, Graduate Program at the Faculty of Medical Sciences - UNICAMP

²Graduate Student (Master's) in Science, Graduate Program of the Disease Control Coordination – CCD, SP

³Collaborator (Biologist), Adolfo Lutz Institute - Rio Claro Regional Laboratory Center, SP

⁴Collaborator (Biologists), Laboratory of Molecular Epidemiology and Infectious Diseases - FCM - UNICAMP

⁵Collaborator (Biomedical), Adolfo Lutz Institute - Quantitative Pathology Unit, SP

⁶Collaborator (Biomedical), Adolfo Lutz Institute - Nucleus of Medical Mycology, SP

⁷Professor, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Japan

⁸Professor of Infectious Diseases, Internal Medicine Department, Faculty of Medical Sciences - FCM - UNICAMP

⁹Visiting Professor, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul

Introduction: The genus *Aspergillus* comprises the main species that are responsible for severe invasive fungal infections. The species identification and the antifungal susceptibility testing are extremely important to determine the best clinical treatment. The phenomenon of *Aspergillus* resistance, to azole drugs, has been increasingly reported in the medical literature related to prolonged treatment, or the use of azole fungicides in the environment. **Objectives:** This project aimed to determine the species and susceptibility of environmental isolates of *Aspergillus* isolated from different substrates (vegetable washing water, irrigation water, organic fertilizer, vegetables and condiments) from the Southeast region of Brazil. **Material and methods:** Species identification were performed by sequencing β -tubulin gene and their susceptibility profile to the following antifungal drugs: itraconazole, voriconazole and posaconazole, and to agricultural fungicides: tebuconazole, metconazole and difenoconazole. The antifungal susceptibility was determined according to the reference document by microdilution (MIC) (M38-A2, CLSI). **Results:** A total of 28 isolates were studied and 5 species were identified: *A. fumigatus* (22), *A. flavus* (3), *A. tamaritii* (1), *A. awamorii* (1), *A. allahabadii* (1). The MIC variation for *A. fumigatus* isolates was: itraconazole (0.06 – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), voriconazole (0.03 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posaconazole (0.03 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), metconazole (0.06 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tebuconazole (0.5 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and difenoconazole (0.25 - 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Two (9.1%) isolates of *A. fumigatus* were resistant to voriconazole (MICs 4 and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and above the breakpoint (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) established by CLSI. **Conclusion:** More *Aspergillus* isolates need to be identified and submitted to susceptibility tests in order to enlarge the knowledge on species characteristics. In addition to elucidate the resistance mechanism in isolates with low susceptibility to antifungal drugs.

Keywords: *Aspergillus*; antifungals; resistance.

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE BACTERIANA DE TRÊS LINHAS DO TRANSPORTE COLETIVO DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ.

Débora Toribio Carvalho Costa¹; Giovanna Souza de Cristo¹; Marielle Priscila de Paula Silva-Lalucci²

¹Acadêmicas de Graduação em Biomedicina, Universidade Cesumar (UNICESUMAR), Maringá/PR.

²Docente – Departamento de Biomedicina, Universidade Cesumar (UNICESUMAR), Maringá/PR.

Introdução: As bactérias são associadas com patógenos de varias doenças, entretanto existem micro-organismos presentes na microbiota humana sem causar patogenias, podendo estes ser transmitidos e causar infecções em pessoas com imunidade comprometida. O transporte público vem sendo usado em grande escala pela sociedade, tornando-se um reservatório para micro-organismos, podendo causar infecções em seres humanos. **Objetivo:** Analisar a flora bacteriana presente nos veículos do sistema de transporte público de passageiros da cidade de Maringá/PR. **Material e Métodos:** Trata-se de um estudo descritivo e quantitativo das amostras coletadas em quatro locais distintos (assentos, corrimão, alerta de descida e catraca) de 3 diferentes linhas de ônibus. A coleta foi realizada com swab estéril umedecido em NaCl 0,9%, sendo realizada a análise microbiológica pelo método de coloração de Gram e semeaduras em meios de cultura Ágar MacConkey, Ágar Manitol e Ágar Sangue. Os dados foram tabelados, para determinar a média através do programa Microsoft Excel. **Resultados:** Entre as 33 amostras obtidas dos três ônibus pesquisados para análise bacteriana todas apresentaram crescimentos de um ou mais micro-organismos. Foi encontrada uma grande diversidade de espécies bacterianas como *Staphylococcus* coagulase-negativa (39,4%), *Staphylococcus aureus* (27,3%), *Citrobacter amalonaticus* (6,1%), *Enterobacter agglomerans* (6,1%), *Citrobacter diversus* (3%), *Enterobacter aerogenes* (3%), *Escherichia coli* (3%), *Klebsiella ozaenae* (3%), *Serratia liquefaciens* (3%) e *Yersinia pseudotuberculosis* (3%). **Conclusão:** O presente estudo demonstrou que existe presença de micro-organismos em assentos, corrimão, alerta de descida e catraca do transporte coletivo, sendo que todas as amostras coletadas apresentaram positividade, sendo o *Staphylococcus* coagulase-negativa a espécie mais encontrada, por estar presente na microbiota da pele dos seres humanos, porem em indivíduos suscetíveis podem causar patogenias. Portanto, é de extrema importância a implantação de medidas básicas de higienização do transporte e conscientização dos usuários, como lavagem das mãos, para minimizar a contaminação e os riscos para a população.

Palavras-chave: fômites; bactérias; contaminação.

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE CULTURA DE CALOS DE *Cereus hildmannianus* EM MEIO ALTERNATIVO

Everton da Silva Santos¹; Glaucia Sayuri Arita²; Aline Savam³, Thaila Fernandes da Silva¹; Arildo José Braz de Oliveira⁴; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁵; Regina Aparecida Correia Gonçalves⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

⁵Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A biotecnologia vegetal, é uma ferramenta promissora para conservação de espécies, bem como para bioprodução de substâncias de interesse biológico. Extratos obtidos de culturas de calos de *Cereus hildmannianus* (sin. *C. peruvianus*), já demonstraram atividades antitumorais e anti-ulcerogênicas. A busca por novas estratégias terapêuticas no tratamento de *Candida* spp. é importante, e produtos naturais obtidos de culturas *in vitro* apresentam um grande potencial para suprir esta demanda. **Objetivo:** Estabelecer culturas alternativas, sem a utilização de ágar, e avaliar a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. **Material e métodos:** Os calos foram sub-cultivados em placas de Petri, contendo uma fina camada de algodão coberta com papel de filtro embebido em meio MS (cultura alternativa). As culturas foram incubadas a 30±1 °C por 90 dias no fotoperíodo de 16 h. As culturas convencionais foram sub-cultivadas sob as mesmas condições, com adição de ágar (3%). Os calos liofilizados foram submetidos a um processo de despigmentação com clorofórmio:metanol (3:1, V/V), após os extratos etanólicos foram obtidos em Soxhlet por 6 h com etanol 70% (EECA, cultura alternativa; EECC, cultura convencional), rota-evaporados e liofilizados em seguida. A atividade antifúngica foi avaliada por meio do teste de microdiluição em caldo seguindo o documento CLSI (M27-A3) com modificações. **Resultados:** As culturas alternativas se desenvolveram bem, em comparação a convencional, mostrando-se promissora em relação à economia de materiais. A melhor atividade foi exibida contra *C. glabrata* para ambos os extratos (EBCA e EBCC), com uma concentração inibitória mínima de 312 µg mL⁻¹, e frente a *C. parapsilosis* 1250 µg mL⁻¹. **Conclusão:** A cultura de calos de *C. hildmannianus* em algodão representa uma alternativa promissora e sustentável para bioprodução de compostos de interesse farmacológico, e este é o primeiro relato de atividade antifúngica com extratos obtidos destas culturas.

Palavras-chave: biotecnologia vegetal; *Candida* spp.; *Cereus hildmannianus*;

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq).

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA *IN VITRO* COM O USO DE CURCUMINA SOBRE A ESPÉCIE DE *Candida albicans*

Gabriela Franco de Oliveira Barbosa¹; Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado²; Karina Mayumi Sakita²; Glaucia Sayuri Arita²; Camila Barros Galinari²; Renato Sonshine Gonçalves³; Gabriel Batista Cesar³; Wilker Caetano³; Érika Seki Kioshima⁴; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁴.

¹Acadêmico de Graduação pelo Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) pelo Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A inativação fotodinâmica (IF) é considerada uma técnica inovadora e promissora, baseada na interação entre um comprimento luminoso adequado e um composto fotossensibilizador na presença de oxigênio, que gera espécies reativas capazes de inativar ou causar morte de células e microrganismos. A curcumina, utilizada como fotossensibilizador, é um composto isolado da planta *Curcuma longa*, conhecida por suas propriedades farmacológicas, antibactericidas e antifúngicas. Dentre os casos de infecções fúngicas que vêm aumentando substancialmente, leveduras do gênero *Candida* são os principais agentes causadores. Além de oportunistas, são capazes de causar infecções superficiais e sistêmicas e têm desenvolvido mecanismos de resistência aos antifúngicos clássicos utilizados nas terapias convencionais. **Objetivo:** Testar a atividade antifúngica da IF com curcumina sobre a espécie *C. albicans*. **Material e métodos:** A IF foi realizada com *C. albicans* ATCC 90028 ($1,0 \times 10^6$ leveduras/mL). A solução de curcumina foi preparada em dimetilsulfóxido e diluída em salina para obtenção da concentração de $10 \mu\text{M}$ e diluída seriadamente razão 2 em uma placa de 96 poços. A placa foi irradiada com LED de 440nm a 460nm, por 15 minutos e deixada no escuro por mais 15 minutos. Após esse tempo, as amostras foram plaqueadas em *Sabouraud dextrose agar* e incubadas a $37^\circ\text{C}/24\text{h}$ para avaliação da concentração fungicida mínima. O resultado foi avaliado comparativamente com um controle sem ação da IF e analisado estatisticamente com o *test t* de Student. **Resultados:** Foi possível observar considerável diminuição no crescimento das colônias a partir de uma concentração de $0,625 \mu\text{M/L}$ de curcumina, sendo que na concentração de $1,25 \mu\text{M/L}$ foi observado a ação fungicida ($p < 0,05$). **Conclusão:** Os resultados foram considerados promissores e compatíveis com a literatura mostrando que apesar de serem necessários mais estudos, podemos avaliar que a IF+curcumina é eficaz na inativação de *C. albicans in vitro*.

Palavras-chave: fotodinâmica; curcumina; *Candida albicans*.

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

HEMOCULTURAS POSITIVAS DE PACIENTES NO PRONTO ATENDIMENTO DE UM HOSPITAL DE ENSINO: PREVALÊNCIA DE MICROORGANISMOS E ANÁLISE DA MORTALIDADE

Giovanna Natsumi Eiri¹; Alessandra Arruda Lemos¹; Jhonny Kendy Okuma¹; Felipe Carnaval Chitolina¹; Nathália de Oliveira Bizetti Cano¹; Daniela Dambroso Altafini^{2,3}; Cecília Saori Mitsugui³; Josmar Mazucheli⁴; Maria Cristina Bronharo Tognim⁵.

¹Acadêmico(a) de Graduação em Medicina, Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

³Bioquímica – Hospital Universitário Regional de Maringá, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá.

⁵Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: Infecções da corrente sanguínea (ICS) são caracterizadas pela presença de microrganismos viáveis no sangue e associadas a alta morbimortalidade. Estes microrganismos, particularmente as bactérias, são detectadas em hemoculturas coletadas em pacientes com sinais de infecções que poderão estar em vários setores hospitalares incluindo o pronto atendimento (PA), onde segundo literatura concentra grande parte dos casos de bacteremia e sepse. Conhecer qual grupo bacteriano está associado às ICS no PA de um hospital poderá favorecer a terapêutica mais adequada reduzindo a mortalidade. **Objetivo:** Avaliar a prevalência das bactérias: Gram-positiva (ICS-GP) e Gram-negativa (ICS-GN) identificadas em pacientes com hemoculturas provenientes do PA e avaliar a frequência da mortalidade. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo com análise de prontuários de pacientes com ICS-GP e ICS-GN no PA do Hospital Universitário de Maringá (HUM) entre 2013 e 2018. Incluímos, 175 pacientes com hemocultura positiva, sendo 90 (51.4%) ICS-GN e 85 (48.6%) ICS-GP. Dados foram organizados e analisados em software Excel 2007 (Microsoft®) e p-valor calculado pelo teste do qui-quadrado. Estudo aprovado pelo COREA-HUM e COPEP-UEM. **Resultados:** A mortalidade relacionada às ICS-GN e às ICS-GP foi de 42.2% e 34.1%, respectivamente. Embora tenha sido verificada maior frequência de óbitos entre ICS-GN, esta não apresentou significância estatística ($p=0.27$). Estratificando-se a análise nos anos do estudo, verificou-se maior mortalidade por ICS-GN em quase todo período, exceto nos anos 2015 e 2017. ICS-GN foram causadas majoritariamente pelo grupo das enterobactérias (62.3%), enquanto a principal espécie isolada em ICS-GP foi *Staphylococcus aureus* (55,3%). **Conclusão:** Dados apontaram maior mortalidade nas ICS-GN no PA, que pode refletir a falta de novas opções terapêuticas e o aumento da resistência antimicrobiana de GN nos últimos anos. Este conhecimento associado aos dados clínicos e exames laboratoriais nos pacientes do PA podem auxiliar na escolha da antibioticoterapia empírica mais adequada, reduzindo a morbimortalidade destes pacientes.

Palavras-chave: mortalidade; bacteremia; pronto atendimento.

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

MORPHOLOGICAL ALTERATION OF *Candida albicans* AFTER MURINE CANDIDEMIA

Glauucia Sayuri Arita¹; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini¹; Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado¹; Bruna Lauton Simões²; Daniella Renata Faria¹; Karina Mayumi Sakita ¹; Eliane Martins da Silva¹; Erika Seki Kioshima³; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça³; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski³

¹Postgraduate student (PhD degree) in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa/PR

²Postgraduate student (Master's degree) in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa/PR

³Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa

Introduction: *Candida albicans* expresses virulence factors that contribute to cause disease, such as adhesion, biofilm formation, and yeast-to-hyphae transition. This yeast is also able to spontaneously and reversibly switch from different phenotypes that can be evaluated by colony morphology. **Objective:** to compare the colony morphology from yeast recovered from a systemic infection in a murine model and a wild-type strain. **Material e methods:** Female Balb/c mice were infected by *C. albicans* wild-type strain SC5314 (WT) with 3.5×10^5 cells via the lateral tail vein. The animals were euthanized five days post-infection, kidneys were removed, macerated in lysis buffer, and 100 μ l of the lysate, named R1, was added to 10 ml of YPD broth, and incubated for 24 h at 25°C. After that, this suspension was plated onto YPD agar at a density of 30 colony-forming units per plate, and incubated for 7 days at 25°C. This procedure was also performed for the WT strain. The morphology of each colony was scored in three categories according to the peripheral filaments: category 1: 0-5 filaments; category 2: more than 5 filaments; category 3: more than 5 long and dense filaments. All animal experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Use in Experimentation (CEUA number 7261020418). **Results:** More than 500 colonies were analyzed for each sample. Although the surface of the colony was smooth, we could observe the presence of filaments penetrating the agar. While WT presented 29.89% and 70.11% of category 1 and 2, respectively, R1 presented 45.86% and 53.27%. R1 also had 0.87% of category 3. **Conclusion:** After recovering yeast from a murine model of systemic candidiasis, it presented different proportions of colony morphologies when compared to WT, which might be resulted from adaptational changes in response to the host environment, and could implicate in *C. albicans* virulence.

Keywords: *Candida albicans*; systemic candidiasis; virulence factor.

Financial support: CAPES and CNPq

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

OBTENÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DO CARVACROL E SUA AVALIAÇÃO ANTIMICOBACTERIANA

Isabelly Karolayne dos Santos Henrique¹; Fabrício Amaro Aguiar de Oliveira²; Maria Cristina da Silva Lourenço³; Carla Cristina Perez⁴; Marcelle de Lima Ferreira Bispo⁴

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Mestre em Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Pesquisadora – Instituto de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ

⁴Docente – Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

Introdução: O *Mycobacterium tuberculosis* é responsável por causar a tuberculose, considerada a principal doença infecciosa de origem bacteriana no mundo. Apesar de existir um tratamento de baixo custo disponível, sua longa duração e diversos efeitos adversos existentes aumentam os índices de abandono do tratamento, contribuindo para o desenvolvimento de bactérias resistentes. Com isso, faz-se necessário ampliar a busca por novas substâncias capazes de combater eficientemente essa doença. Nesse contexto, foi relatado na literatura que o carvacrol apresenta potencial atividade antimicrobiana. **Objetivo:** Síntese de ésteres do carvacrol que apresentem substituintes com diferentes características estereoeletrônicas na porção acílica, a fim de se avaliar tais substâncias frente ao *M. tuberculosis* em um estudo de relação estrutura-atividade. **Material e métodos:** Foram utilizadas diferentes metodologias sintéticas para as reações de esterificação, partindo de cloretos ou ácidos caboxílicos. Os derivados foram caracterizados por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. A atividade antimicobacteriana foi realizada em *M. tuberculosis* H37Rv pelo método colorimétrico de microdiluição em caldo que utiliza o corante vital Alamar Blue (MABA) como indicador de viabilidade celular. **Resultados:** Doze ésteres do carvacrol foram obtidos em rendimentos que variaram de 14 a 87%, sendo nove derivados benzoilados, sendo seis inéditos, um derivado acetilado e um derivado híbrido com o ácido trans-cinâmico. Somente o derivado que possui o grupo metoxila (OMe) na posição 2 do grupo benzoíla apresentou atividade antimicobacteriana, com uma concentração inibitória mínima de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. **Conclusão:** Os derivados que apresentaram os melhores rendimentos foram obtidos pela reação entre carvacrol e cloreto de acila sob condições brandas. Apesar de somente um derivado ter sido ativo, isso ressalta a importância da presença do substituinte OMe em posição *orto* para a atividade antimicobacteriana. Assim, esse resultado pode ser considerado um bom ponto de partida para o planejamento e síntese de novos derivados com atividade aprimorada.

Palavras-chave: carvacrol; tuberculose; agentes antibacterianos.

Financiador (es): CAPES e Fundação Araucária.

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANTIBIOTIC ADJUVANTS INCREASING POLYMYXIN B ACTIVITY IN MULTIDRUG RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

João Paulo Salvaterra Pasquini¹; Bruna Renata Silva¹; Paula Assis Queiroz²; Amanda Dias Pedro³; Pedro Henrique Rodrigues Amaral³; Fábio Vandresen⁴; Regiane Bertin de Lima Scodro⁵; Vera Lucia Dias Siqueira⁶

¹Postgraduate student (Master's degree), Postgraduate Program in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Parana, Brazil

²Postgraduate student (Doctoral degree), Postgraduate Program in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Parana, Brazil

³Graduate Student in Biomedicine, State University of Maringa, Parana, Brazil

⁴Professor, Department of Chemistry, Federal Technological University of Parana, Londrina, Parana, Brazil

⁵Professor, Postgraduate Program in Health Science, State University of Maringa, Parana, Brazil

⁶Professor, Postgraduate Program in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Parana, Brazil

Introduction: Polymyxin B (PMB) represents one of the few options for treatment of the multidrug resistant Gram-negative (MDR-GN) bacteria infections. PMB is cationic polypeptides that have affinity for the outer membrane, especially the lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative, increasing the cell permeability and leading to bacterial death. However, polymyxin-resistant MDR-GN, usually due to LPS remodeling, have been reported and has encouraged the search for therapeutic alternatives. Antibiotic adjuvants are chemicals that shows little or no antimicrobial activity alone, but that act by inhibiting bacterial resistance or increasing the activity of a classic antimicrobial agent. **Objective:** Determine the *in vitro* activity of the PMB and antibiotic adjuvants combination against PMB-susceptible and -resistant MDR-GN. **Materials and methods:** *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. multidrug resistant clinical isolates were tested. The antimicrobial activity of PMB and PMB + adjuvants combination was evaluated using a broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The modulatory factor (FM) was calculated from the formula $FM = MIC_{PMB} / MIC_{PMB + Adjuvant}$, to reflect the reduction in the MIC of PMB when combined with an adjuvant. Thiosemicarbazide (TSC) and 4-hydroxy-thiosemicarbazone (4-OH-TSZ), both derived from (-)-camphene, a 3,5 dinitrobenzoyl-hydrazonic derivative (DNH11), nicotinamide (NAM) and isoniazid (INH) were employed as antibiotic adjuvants. **Results:** (-)-Camphene derivatives, TSC and 4-OH-TSZ, in dependent concentration, modulated the PMB activity ($FM > 4$) and reduced MIC, rescuing its activity ($MIC \leq 2$) in more than 80 % of the PMB-resistant MDR-GN isolates. Preliminary results with DNH11 were also promising, reducing the MIC of PMB, with $FM > 4$ in PMB-resistant isolates. NAM and INH did not modulate the PMB activity in the tested isolates ($FM = 1$). **Conclusion:** TSC, 4-OH-TSZ and DNH11 represents potential antibiotic adjuvants to increase the activity of PMB and even rescue the activity of this antimicrobial against MDR-GN.

Keywords: polymyxin B; adjuvants; Gram-negative bacteria.

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE IS DOWN-REGULATED AFTER PHOTOINACTIVATION BY ROSE BENGAL

João Vitor de Oliveira Silva¹; Jean Eduardo Meneguello²; Maíra Dante Formagio¹; Andreia Farias Pereira Batista³; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá⁴; Jane Martha Graton Mikcha⁴

¹Academic of Postgraduate Program in Health Sciences (doctorate), State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

²Academic of Postgraduate Program in Biosciences and Physiopathology (doctorate), State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

³Academic of Postgraduate Program of Food Science (doctorate), State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

⁴Teacher – Department of Clinical Analyses and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

Introduction: *Staphylococcus aureus*, an important human pathogen, is responsible for hospital and community-acquired infections and associated with a wide variety of diseases including staphylococcal food poisoning. In this context, antimicrobial photodynamic therapy is novel technique that involves the synergistic action of visible light with photosensitizer molecules in the presence of oxygen leading to cell damage and death. **Aim:** This study evaluated the trigger protein changes in *Staphylococcus aureus* after photoinactivation mediated by rose bengal (RB). **Material and methods:** *S. aureus* ATCC 25923 was cultured to be used in photoinactivation assays. Bacterial suspension was treated with RB at concentration 10 nmol/l and irradiated by green LED (λ_{max} . 511 nm; 0.17 J/cm²) for 49 min. In addition to treatment, three control groups were included: positive control, photosensitizer control group and light control group. Thereafter, protein extraction was performed through sonicated in lysis solution and protein concentrations were estimated by the Bradford method. The protein digest (250 μ g/mL) was separated by Liquid Chromatography Electrospray and the data were processed and searched using the ProteinLynx Global Server. **Results:** Among the protein identified, ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit was down regulated only in treatment compared with the control groups. The genomic studies revealed that the deletion of *clpP* gene, which encodes this protein, in *S. aureus* resulted in massive changes in proteins related to pathogenicity and stress response. **Conclusion:** Our results suggest that ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit is involved in adaptation against reactive oxygen species generated by photoinactivation mediated by RB.

Keywords: photoinactivation; *Staphylococcus aureus*; stress response.

Financier: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

UTILIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Klebsiella oxytoca* COMO AGENTE QUELANTE DE FERRO BIODEGRADÁVEL

José Rivaldo dos Santos Filho¹; Letícia de Melo Teixeira²; Éverton da Silva Santos¹; Susana Tavares Cotrim Ribeiro¹; Regina Aparecida Correia Gonçalves³; Arildo José Braz de Oliveira³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá/PR

Introdução: A bactéria *Klebsiella oxytoca*, isolada da rizosfera de *Aspidosperma polyneuron*, produz um exopolissacarídeo (EPS) que apresenta diversas aplicações industriais. Os EPS caracterizam-se como metabólitos primários produzidos por microrganismos, principalmente durante a fase estacionária de crescimento. Estes polímeros naturais podem agir como agentes quelantes de ferro, tornando-se uma alternativa viável para a substituição do EDTA em produtos, um dos principais agentes quelantes, que apesar de uma boa capacidade complexante, possui uma biodegradação lenta. **Objetivo:** Encontrar uma forma alternativa para a quelação de íons de ferro utilizando o EPS produzido pela bactéria *K. oxytoca*. **Material e métodos:** O EPS de *K. oxytoca* foi obtido através do cultivo da bactéria em meio S modificado em agitador orbital a 28 °C, 200 rpm por 120 horas. Após este período os meios foram centrifugados (sedimentação das bactérias), seguida da precipitação do EPS com álcool etílico P.A. (3:1, v/v). Para purificação do EPS, foram utilizadas técnicas como a remoção das proteínas com ácido tricloroacético a 20%, diálise em membrana de 10 kDa e o procedimento de congelamento e descongelamento. O teste de quelação de ferro foi realizado por meio de um ensaio colorimétrico com ácido gálico como reagente cromogênico utilizando várias concentrações do EPS, avaliando a sua capacidade de complexar os dois tipos de íons de ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}), as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 370 nm e após, calculados a porcentagem de sequestro de ferro (PSF%). **Resultados:** O EPS produzido pela *K. oxytoca* apresentou uma boa capacidade de quelação de íons ferro (PSF%) de $41,9 \pm 2,2$ e $34,1 \pm 3,9$ para Fe^{+2} e Fe^{+3} , respectivamente. **Conclusão:** Este polímero natural produzido pela *K. oxytoca* apresentou uma boa atividade de quelação de ferro, mostrando ser uma alternativa sustentável no desenvolvimento de produtos com esta finalidade.

Palavras-chave: exopolissacarídeo; *Klebsiella oxytoca*; polímeros.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

GLUTATHIONE REDUCTASE INHIBITORS SELECTED BY VIRTUAL SCREENING

Karina Mayumi Sakita¹; Erika Seki Kioshima²; Bernard Maigret³

¹Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa, PR

²Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR

³Emeritus CNRS Research Director, Capsid team, LORIA Institute, Nancy, France

Introduction: Glutathione (GSH) system, as thioredoxin system, is of major importance for the maintenance of the cell reduced environment. Glutathione reductase (GR) catalyzes the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to reduced GSH. Inhibition of GR/GSH system directly impacts the increasing elemental sulfur contents. Excessive oxidation of the protein sulfhydryl groups results in oxidative damage to cellular functions and retarded growth. Virtual screening of compounds targeting important cell components of pathogens is a valuable tool to development of new drugs. **Aim:** To select compounds inhibitors of GR from *Aspergillus fumigatus* using *in silico* methods, for new antifungal drug development. **Material and methods:** Computational model of GR was generated by using Robetta webserver starting from Q4WRK8 sequence (Uniprot). The stability model was analyzed by molecular dynamics of 200 ns. The chemical library was composed of molecules from Drug Central, Drug Bank, ZINC, PubChem, Life Chemicals, Withdrawn and Super Drug 2. Ensemble docking was performed using GOLD software version 5.8.0 and ChemPLP scoring function. The best fitting protein structure in the ensemble was positioned with the highest score. The twenty top-ranked compounds were selected for *in vitro* activity evaluation. **Results:** Robetta generated a 3D model of an apoprotein structure based on the similarity of GR from *H. sapiens* (3DK9), sharing 49.27% of identity. Four protein conformations were selected from MD simulation analysis. These conformers were retrieved for ensemble docking. For each compound, fifty docking runs were performed and conformer 2 was the most preferred in 60% of the ensemble docking, followed by conformers 3, 4 and 1, with 21%, 14% and 5%, respectively. Only 12 from 20 top-ranked compounds are available for purchase. **Conclusion:** *In silico* methodologies improve the ability to select inhibitors compounds of interest. The validation of the compounds selected as GR inhibitors will be performed.

Keywords: glutathione reductase; virtual screening; antifungal.

Funders: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Edital N° 41/2018

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

MONITORAMENTO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Pseudomonas* spp. RECUPERADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA NO PERÍODO DE DEZ ANOS

Larissa dos Santos Fávaro¹; Suelen Balero de Paula-Petrolí²; Joyce Karoline Coimbra³; Renato Eiki Radoski³; Rodrigo Vilela Resende de Oliveira³; Luana Szlachta Cavalcanti dos Santos³; Maria Vitória Ferreira da Silva³; Floristher Elaine Carrara-Marroni⁴; Emerson José Venâncio⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Acadêmica (o) do Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁴Co-orientadora, Doutora, Docente - Departamento de Patologia, Análises Clínica e Toxicológica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁵Orientador, Doutor, Docente - Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

Introdução: *Pseudomonas* spp. é um importante patógeno responsável por infecções hospitalares de difícil tratamento. Isolados multirresistentes (MR) e extensivamente resistentes (ER) aos antimicrobianos, em especial, são considerados um grande problema clínico e de saúde pública. O monitoramento das taxas de resistência aos antimicrobianos norteiam as terapias empíricas, possibilitam o aprimoramento do tratamento, aumentam a chance de sucesso terapêutico e diminui o tempo de permanência do paciente nos hospitais. **Objetivo:** Determinar as taxas de resistência aos antimicrobianos e classificar o perfil de resistência de isolados clínicos de *Pseudomonas* spp. recuperados no Hospital Universitário de Londrina (HUL) no período de agosto de 2009 a julho de 2019.

Material e métodos: Foram analisados dados referentes às culturas positivas para *Pseudomonas* spp. quanto ao sexo do paciente, tipo de amostra biológica, setor de internação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. **Resultados:** Um total de 2549 *Pseudomonas* spp. foram incluídos no estudo. A maioria (65,6%) foi recuperada de pacientes do sexo masculino e de pacientes internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (37,9%), Pronto Socorro (22,6%) e Enfermaria Masculina (12,6%). As secreções do trato respiratório (31,7%), urina (30,4%) e swab de vigilância (12,7%) foram às amostras clínicas com maior frequência de isolamento destes microrganismos. Do total de isolados incluídos no estudo, 19,8% foram classificados MR e 14,3% como ER. Elevadas taxas de resistência foram verificadas para os carbapenêmicos (>45,7%), fluoroquinolonas (>41,8%) e aminoglicosídeos (>33,2%). **Conclusão:** As taxas de resistência e o número de isolados MR e ER observados demonstram a dificuldade terapêutica enfrentada no HUL em infecções causadas por *Pseudomonas* spp., reforçando a importância do monitoramento da resistência, de medidas de controle de infecções, bem como o estabelecimento de programas *stewardship* para o uso racional dos antimicrobianos neste hospital.

Palavras-chave: epidemiologia; *Pseudomonas* spp.; resistência aos antimicrobianos.

Financiador: CAPES

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPOSTO SINTÉTICO LMM6 CONTRA *Staphylococcus aureus*

Maíra Dante Formagio¹; João Vitor de Oliveira Silva¹; Lorena Fortunato Prohmann²; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá³; Isis Regina Grenier Capoci⁴; Érika Seki Kioshima Cotica⁴; Jane Martha Graton Mikcha³.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Micologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes etiológicos das doenças transmitidas por alimentos, capaz de se multiplicar nos alimentos e produzir enterotoxinas responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica. O composto sintético LMM6 pertence à classe dos 1,3,4-oxadiazóis, selecionado por varredura virtual e apresenta atividade antifúngica. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana do composto sintético LMM6 frente à diferentes isolados de *S. aureus*. **Material e métodos:** Foram utilizados: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 629/94 isolado de alimento envolvido em surto alimentar e *S. aureus* FRI S-6 produtor de toxinas. LMM6 foi adquirido da Life Chemicals Inc. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, as concentrações variaram de 1000 a 0,48 µg/ml. Após adição de resazurina 0,01% a CIM foi definida como a menor concentração de LMM6 capaz de inibir a mudança de cor. Para a determinação da concentração bactericida mínima, uma alíquota foi removida dos poços onde não houve crescimento bacteriano, diluída e semeada para determinação de Unidade Formadora de Colônias (UFC). O ensaio da curva de morte foi realizado nas concentrações de CIM, 2 x, 4 x e 8 x CIM e, avaliados em intervalos de 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. As amostras foram diluídas e semeadas em *Mueller-Hinton Agar* para determinação de UFC. Análise estatística one-way ANOVA e teste Tukey de múltipla comparação. **Resultados:** A CIM do LMM6 foi 0,97 µg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923 e 1,95 µg/mL contra *S. aureus* 629/94 e *S. aureus* FRI S-6. Não foi observado efeito bactericida de LMM6, no entanto houve redução de aproximadamente 4 log₁₀ UFC/mL ($p < 0.05$) em todas as concentrações de LMM6, tanto na avaliação quantitativa de viabilidade celular quanto na curva de morte (96h). **Conclusão:** LMM6 apresentou potente efeito antibacteriano contra um potencial patógeno de origem alimentar.

Palavras-chave: oxadiazóis; microbiologia; *Staphylococcus aureus*.

Financiador (es): Capes

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIMICOBACTERIANA DE DERIVADOS INDÓLICOS

Mariana Luiza Silva¹; Wellington da Silva²; Marcelle de Lima Ferreira Bispo³

¹Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Mestre em Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina

Introdução: A tuberculose (TB), causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma das dez doenças infecciosas mais letais do mundo. Apesar de já existirem fármacos eficazes contra a TB, o tratamento dura 6 meses com administração de 4 fármacos, os quais apresentam muitos efeitos adversos, que contribuem para o abandono do tratamento, que pode levar a resistência micobacteriana. Tendo em vista todos esses problemas relacionados ao tratamento, é necessária a descoberta de novos fármacos anti-TB. Nesse contexto, o núcleo indólico se destaca devido a sua versatilidade sintética e biológica, apresentando inclusive atividade frente ao *M. tuberculosis*. **Objetivo:** Planejamento e síntese de nove derivados indólicos contendo substituintes alifáticos e aromáticos no C2 e/ou substituintes no nitrogênio indólico, a fim de verificar suas atividades antimicobacterianas e a realização de um estudo de relação estrutura-atividade (REA). **Material e métodos:** A síntese dos derivados indólicos foi realizada pela adição das fenilhidrazinas e das cetonas correspondentes em ácido polifosfórico a 120 °C por 4h. As substâncias foram purificadas por recristalização ou por cromatografia em coluna e foram caracterizadas por ponto de fusão e RMN de ¹H e ¹³C. A atividade antimicobacteriana foi realizada em *M.tuberculosis* H37Rv pelo método MABA. **Resultados:** Todos os derivados indólicos foram devidamente sintetizados em rendimentos que variaram de 2 a 51%. A avaliação da atividade antimicobacteriana mostrou que dois derivados apresentaram uma concentração inibitória mínima entre 25 e 100 µg.mL⁻¹. O estudo preliminar de REA identificou que um átomo de cloro na posição 5 do núcleo indólico, bem como a presença de um grupo alifático volumoso em C2 influenciam positivamente na atividade frente ao *M. tuberculosis*. **Conclusão:** Foram sintetizados com sucesso nove derivados indólicos, sendo que um deles pode ser um bom ponto de partida para novas modificações estruturais visando a obtenção de derivados ainda mais promissores.

Palavras-chave: indóis; tuberculose; relação estrutura-atividade.

Financiador (es): CAPES e Fundação Araucária.

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DINÂMICA DE MORTE DE *Staphylococcus aureus* APÓS EXPOSIÇÃO A EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO

Nicole Lohana de Souza¹; Raquel Garcia Isolani²; João Vitor de Oliveira Silva³; Andreia Farias Pereira Batista⁴; Maíra Dante Formagio³; Daniela Cristina de Medeiros⁵; Jane Martha Graton Mikcha⁶; João Carlos Palazzo de Mello⁷; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá⁶.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá/PR

⁵Acadêmica de Pós-Graduação (Pós doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá ⁷Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias envolvidas em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), causando um considerável impacto econômico, por meio de custos diretos com assistência médica e indiretos como a redução da produtividade. Nesse sentido, compostos naturais têm sido considerados como alternativa no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos. A Epigalocatequina-3-galato (EGCG), um flavonoide presente nas folhas da planta *Stryphnodendron adstringens*, apresentou anteriormente potencial atividade antimicrobiana, mas foi pouco avaliada contra *S. aureus*. **Objetivo:** Este estudo avaliou a dinâmica de morte de *S. aureus* após exposição a EGCG. **Material e métodos:** A concentração inibitória mínima (CIM) do composto foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. O ensaio da curva de morte foi realizado com inóculo bacteriano de *S. aureus* ATCC 25926, (10^5 UFC/ml) exposto a CIM, 2xCIM e 4xCIM de EGCG. Em intervalos de tempo de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24h, foram retirados 100 μ L de cada tubo, diluídos em série e semeados em Agar Mueller Hinton (MHA). As placas foram incubadas a 35 °C por 24h e então realizada a contagem do crescimento comparando-as com o controle (sem EGCG). **Resultados:** A CIM da EGCG foi de 125 μ g/ml. A CIM e 2xCIM de EGCG não foram capazes de reduzir significativamente o crescimento de *S. aureus* em nenhum dos tempos avaliados. Já a concentração de 4xCIM demonstrou redução de 1 log em 4 h, 3 log em 8 e 12 h e foi capaz de eliminar as células viáveis de *S. aureus* com 24 h de exposição. As placas foram lidas visualmente. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a EGCG possui atividade antibacteriana contra *S. aureus* e pode ter ação bactericida quando utilizada na concentração de 500 μ g/ml por 24 h contra esse microrganismo.

Palavras-chave: Catequina; *Staphylococcus aureus*; curva de morte.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes CAPES/CNPq - código 001

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PROTEOMIC PROFILING OF KPC-PRODUCER *Klebsiella pneumoniae* AFTER INDUCED POLYMYXIN B RESISTANCE

Paula Assis Queiroz¹; Jean Eduardo Meneguello¹; João Paulo Salvaterra Pasquini²; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli³; Regiane Bertin de Lima Scodro³; Rosilene Fressatti Cardoso³; Rogério Marchiosi⁴; Vera Lucia Dias Siqueira³.

¹Postgraduate student (Doctoral degree), Postgraduate Program in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Parana, Brazil

²Postgraduate student (Master's degree), Postgraduate Program in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Parana, Brazil

³Professor - Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Parana, Brazil

⁴Professor - Department of Biochemistry, State University of Maringa, Maringa, Parana, Brazil

Introduction: Polymyxin resistance has increased gradually for the last few years, made treatment of *Klebsiella pneumoniae* KPC producing infections a difficult task. In this context, proteomic profiling might play an important role in the development of drug resistance. **Objective:** To understand the potential mechanisms associated with polymyxin B (PMB) resistance we carried out a comparative proteomic analysis of two paired PMB-susceptible and -resistant *K. pneumoniae* KPC producing (Kp-KPC). **Methods:** We applied the label-free quantitative proteomic to characterize the proteome profiling of the *K. pneumoniae* ATCC® BAA 1705: S-Kp/ATCC (PMB MIC <0.25 µg/mL) and its paired mutant: R-Kp/ATCC (PMB MIC 16 µg/mL) and *K. pneumoniae* blood culture clinical isolate: S-Kp/Clinical (PMB MIC <0.25 µg/mL) and its paired mutant: R-Kp/Clinical (PMB MIC 64 µg/mL). Resistance induction was performed in cultures with increasing concentration of PMB sulfate. Proteomics analysis, bioinformatics and statistical analysis approaches were employed. **Results:** Two hundred and thirty eight proteins were identified and quantified. Comparing PMB-susceptible with -resistant Kp-KPC, 68 proteins from this core-proteome presented change in abundant with statistically significant differences; 31 proteins were differentially expressed when compared S-Kp/Clinical:R-Kp/Clinical and 37 proteins in analysis S-Kp/Clinical:R-Kp/Clinical. Our results showed that the proteomic in PMB resistance involving several biological processes and protein functions, including transmembrane transporter activity, oxidoreductases, catalytic activity, stress response, translation, metal ion bind, metabolism, rRNA binding and others. Omp A, integral component of membrane was significantly down regulated in both PMB-resistant Kp-KPC. Outer membrane lipoprotein SlyB (conserved protein member of the PhoPQ regulon) and multidrug efflux pump AcrA (RND-type) were up-regulated in PMB-resistant strains. **Conclusion:** The evaluation of proteins differentially expressed in this study suggested their direct or indirect role in the PMB resistance and could help in understanding the mechanisms of resistance and might be used for development of novel therapeutics.

Keywords: proteomic; polymyxin resistance; *Klebsiella pneumoniae*.

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFFECTIVENESS OF CURCUMIN PHOTODYNAMIC THERAPY IN A PATIENT WITH ONYCHOMYCOSIS

Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado¹; Karina Mayumi Sakita¹; Glaucia Sayuri Arita¹; Camila Barros Galinari¹; Ana Adélia Vaine²; Gabriel Batista Cesar³; Renato Sonshine Gonçalves⁴; Wilker Caetano⁴; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁵; Érika Seki Kioshima⁵

¹Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, University of Maringá-PR

²*Clinica de Podologia e Quirodatilogia*, Maringá-PR

³Doctor, Department of Chemistry, State University of Maringá-PR

⁴Professor Doctor, Department of Chemistry, State University of Maringá-PR

⁵Professor Doctor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá-PR

Introduction: Onychomycosis (OM) or nail mycosis is characterized as an infection that affects the nail plate, with an incidence of up to 8% of the world population, commonly caused by dermatophyte fungi (DM), yeasts (YST) and non-dermatophyte fungi (NDM). Conventional antifungals are classically used for OM treatment, however, the “mycological cure” rate is low. Photodynamic Therapy with Curcumin (PDT+CUR) can be an alternative, a non-invasive therapy composed of a photosensitizer (PS), like CUR, that in the presence of oxygen, when excited by a specific wavelength, promotes photochemical reactions, causing damage to the target, inactivating microorganisms. **Objective:** To evaluate the efficacy of PDT+CUR for treatment of patients with onychomycosis. **Material and methods:** The case report was approved by human ethics committee (CAAE, number 14107419.4.0000.0104), with collaboration of *Clinica de Podologia e Quirodatilogia*. Female patient, N.V.D., 26 years old, complaining of almost total detachment of the nail plate on the thumb of her right hand, reporting pain. The patient was screened to the clinic, where the material was collected for direct mycological examination and culture. After, positive for OM, the patient was treated with ten sessions of PDT+CUR (two times a week). In the first session, the nail was debrided, removing the part affected by the fungus. Then, a liquid solution CUR (25 µmol) was added in nail, at 15 minutes protected from light and irradiated by blue LED (440-460nm, at 4.65 mW/cm² for 11.04 J/cm²). **Results:** The mycological exam identified *Candida albicans* and *C. tropicalis* as the etiological agent responsible for the OM. The follow-up was performed for up to 4 months after the PDT+CUR sessions. The nail showed healthy growth. The collection of the nail material was performed again, to confirm the absence of yeasts post-treatment. **Conclusion:** PDT+CUR was effective to treat OM caused by *C. albicans* and *C. tropicalis*.

Keywords: photodynamic therapy; curcumin; onychomycosis.

Funders: *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.*

Thematic area: Microbiology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL CULTIVÁVEL DE *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) COM PROSPECÇÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO

Rodrigo José Nunes Calumby¹; Davi Porfirio da Silva²; Jorge Andrés García Suárez³; Jayane Omena de Oliveira⁴; Laís Nicolly Ribeiro da Silva⁴; Rossana Teotônio de Farias Moreira⁵; Márcia de Souza Carvalho Melhem⁶; Lara Mendes de Almeida⁷; Valter Alvino⁷; Luciano Aparecido Meireles Grillo⁷

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL;

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL;

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG;

⁴Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL;

⁵Docente – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL;

⁶Docente – Escola de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS;

⁷Docente – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió/AL.

Introdução: *Rhynchophorus palmarum* L. é uma praga agrícola que afeta diversas culturas, incluindo as plantações de coco (*Cocos nucifera*) que ocupam um lugar de destaque na economia do Nordeste brasileiro. O trato intestinal dos insetos é uma importante interface entre o animal e o meio ambiente. Conhecer os eventos associados a essa interface pode revelar novos alvos a serem explorados por programas de controle, manejo ou erradicação de pragas e vetores. A caracterização da microbiota intestinal de *R. palmarum*, bem como a elucidação de aspectos relacionados à bioquímica e fisiologia da digestão do inseto são essenciais para a intervenção em processos metabólicos específicos como forma de controle da praga. **Objetivo:** Caracterizar a microbiota intestinal cultivável de *R. palmarum* e os processos metabólicos associados à interação microbiota-hospedeiro visando a exploração de novas formas de controle biológico. **Material e métodos:** Dissecções intestinais de quatro insetos adultos de *R. palmarum* foram conduzidas em câmara de fluxo laminar. Os intestinos foram inseridos em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubados a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Subsequentemente, diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) dessas culturas foram plaqueadas em meios de cultivo seletivos ao isolamento de bactérias e fungos. Os microrganismos foram identificados presuntivamente por meio de testes fenotípicos. **Resultados:** Foram selecionados 159 tipos morfológicos, com 56,6% de toda diversidade morfológica observada em ágar nutriente e ágar sangue. Houve um predomínio de bacilos Gram-negativos (39,6%), seguido por cocos Gram-positivos (31,4%). Foi possível identificar 56,2% dos isolados ao nível de gênero, sendo esses representados por *Enterococcus* (17,6%), Enterobactérias (16,3%), *Staphylococcus* (11%), *Candida* (8,2%) e *Saccharomyces* (3,1%). Os demais isolados (43,8%) não foram identificados e serão caracterizados posteriormente por MALDI-TOF/MS. **Conclusão:** Esses achados abrem perspectivas para novas técnicas de controle de *R. palmarum*, incluindo o desenvolvimento de novos bioinseticidas.

Palavras-chave: *Rhynchophorus palmarum* L.; microbiota intestinal; controle biológico.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Área temática: Microbiologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PREVALÊNCIA DE COLONIZAÇÃO POR *Candida* spp. EM PREMATUROS DE HOSPITAL TERCIÁRIO DA REGIÃO NORDESTE, BRASIL

Rossana Teotônio de Farias Moreira¹; Jayane Omena de Oliveira²; Thamires Ester Alves de Arruda²; Davi Porfírio da Silva³; Rodrigo José Nunes Calumby⁴; Iramirton Figueiredo Moreira⁵; Gabriel Manzi Oliboni⁶; Lucas Xavier Bonfietti⁷; Mirian Rando Araujo⁷; Marcia de Souza Carvalho Melhem^{7,8}

¹Docente, Universidade Federal de Alagoas, Brasil;

²Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Brasil;

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Brasil;

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Brasil;

⁵Docente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas, Brasil;

⁶Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências, Coordenação de Doenças, Secretaria de Saúde, Governo do Estado de São Paulo, Brasil;

⁷Pesquisador Científico, Unidade de Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil;

⁸Docente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, Brasil.

Introdução: Nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), infecções por *Candida* spp. representam a terceira causa de infecção relacionada à assistência à saúde, cuja incidência de 25 a 60% de mortalidade varia entre prematuros de baixo peso. **Objetivo:** Monitorar colonização da microbiota de prematuros por leveduras do gênero *Candida* spp. **Material e métodos:** Estudo prospectivo, amostras da cavidade bucal e mucosa retal foram colhidas de prematuros com menos de 1.500 gramas, por swab em intervalos de 12, 48 e 96 horas pós-nascimento. A partir de então, uma vez por semana até a alta do setor ou óbito do prematuro. Estas amostras foram semeadas em meio ágar Sabouraud com Cloranfenicol e depois de purificadas foram semeadas em meio cromogênico para identificação presuntiva. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Alagoas, CAEE 02839618.1.0000.5013. **Resultados:** A amostra foi composta por 19 prematuros, onde 31,5% (6) apresentaram-se colonizados. A idade gestacional variou de 28 a 30 semanas e o peso, de 850 a 1.360 gramas, sendo 66,6% (4) dos colonizados nascidos de parto cirúrgico. A cavidade bucal apresentou-se colonizada em 66% (4), a partir das primeiras 48 horas de vida em 16% (1), porém a mucosa retal foi a mais prevalente, presente em 83,3% (5) dos prematuros, evidenciada já na primeira semana em 16% (1) deles. Das 16 amostras originadas, nove foram identificadas presuntivamente como *Candida* spp., mantendo sua coloração natural, bege, e sete por *Candida albicans* (coloração esverdeada). **Conclusão:** Alguns prematuros originaram mais amostras que outros, em virtude do tempo de permanência no setor, no entanto, *C. albicans* foi a espécie que mais colonizou prematuros, isolada já nas primeiras 48 horas de vida, sendo as demais não identificadas pelo meio cromogênico. A mucosa retal colonizou-se com o avançar do tempo de internação, podendo apresentar mais de uma espécie.

Palavras-chave: neonato prematuro; microbiota; *Candida* spp.

Financiador (es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas - FAPEAL

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AValiação DO POTENCIAL PREBIÓTICO DE RESÍDUO FOLIAR DE *Stevia rebaudiana*

Thaila Fernanda Oliveira da Silva¹; Juliana Cristina Castro²; Susana Tavares Cotrim Ribeiro¹; Everton da Silva Santos¹; Laura Paulino Mardigan³; Arildo José Braz de Oliveira⁴; Regina Aparecida Correia Gonçalves⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni apresenta interesse econômico devido aos esteviosídeos em suas folhas. A indústria de edulcorantes, responsável pela extração desses esteviosídeos, gera resíduos que são descartados sem aproveitamento integral do material vegetal.

Objetivo: Avaliar a atividade prebiótica do extrato sobrenadante (ESRS) e precipitado (EPRS) do resíduo foliar de *S. rebaudiana* fornecido pela indústria de edulcorante Stevia Soul.

Material e métodos: Para a determinação da atividade prebiótica *in vitro* foram utilizadas as cepas *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271, *L. acidophyllus* ATCC 4356, disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz, e *Bacillus coagulans* obtida da farmácia de manipulação. As bactérias probióticas foram adicionadas em meio basal De Man Rogosa e Sharpe (MRS) contendo 1% (p/v) do composto prebiótico padrão (fruto-oligossacarídeos e inulina) e 1% dos frutanos extraídos do ESRS e EPRS. O inóculo bacteriano padronizado em densidade ótica 0,300 ($\lambda=600$ nm) foi adicionado no meio com diferentes fontes de carboidrato e incubado à 37 °C por 24h em condições de microaerofilia. A avaliação do crescimento bacteriano foi realizada por leitura espectrofotométrica dos meios de cultivo e expressos em densidade ótica. Os testes foram realizados em triplicata. **Resultados:** As cepas *L. fermentum* e *B. coagulans* apresentaram uma alta capacidade de fermentar as moléculas de ESRS ($0,8485 \pm 0,01$ e $0,9075 \pm 0,01$, respectivamente), sendo significativamente ($p < 0,05$) maior ao encontrado no meio contendo fruto-oligossacarídeos comercial ($0,6348 \pm 0,01$ e $0,7259 \pm 0,03$). EPRS também proporcionou um alto crescimento das cepas *L. fermentum*, *L. acidophyllus* e *B. coagulans* ($1,5950 \pm 0,01$; $1,6449 \pm 0,05$ e $1,6784 \pm 0,02$), sendo significativamente ($p < 0,05$) maior ao meio contendo inulina padrão ($0,6506 \pm 0,04$; $1,5116 \pm 0,02$ e $0,7871 \pm 0,03$). **Conclusão:** O extrato sobrenadante e precipitado do resíduo foliar de *S. rebaudiana* apresentaram potencial prebiótico, podendo ser empregado em formulações que tragam benefícios a saúde.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*; bactérias probióticas; resíduo industrial.

Financiador (es): UEM, CAPES, CNPq e Stevia Soul

Área temática: Microbiologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

***Microsporium canis* AS A FUNGAL AGENT CLOSELY RELATED TO *Tinea capitis* AT MARINGÁ/PR**

Tiago de Paula Bianchi¹; Camila Barros Galinari²; Érika Seki Kioshima³; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça³; Terezinha Estivalet Svidzinski³

¹Graduate Student in Biomedicine, State University of Maringá/PR

²Master in Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá/PR

³Lecturer - Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá/PR

Introduction: Epidermophytosis and *Tinea capitis* are the major causes of fungal infection by *Microsporium canis*. They are lesions in glabrous skin and hair, representing the leading dermatophytosis on pediatric care. In addition, this is an infection closely related to the presence of dogs and cats at home, and highly transmissible to their guardians. Thus, it is very important to know the epidemiology of this type of infection, in order to establish preventive actions. **Objective:** Evaluate the epidemiological profile of infection by *M. canis*, from 2007 to 2018, in examined patients on Laboratory of Teaching and Research in Clinical Analysis of the State University of Maringá (LEPAC-UEM).

Material e methods: Epidemiological profile related to the fungus *M. canis* were investigated through exams of scales of the scalp (hair) and body scales (skin) positively for dermatophytes due to the fungal culture, from the registry book of the Medical Mycology Sector/UEM (COPEP nº2.748.843). **Results:** Of the positive cultures found during the 12 years (n=387), *M. canis* was isolated in 23.51%, representing the second most isolated fungus in cases of dermatophytosis. Of the hair cultures (n= 92), 86.96% were attributed to the fungus, however, in the skin samples, it was responsible for 3.88%. The analysis of the last six years showed an increase in relation to the positive culture for *M. canis*, reaching 55.67% in 2018, and in relation to the scalp culture, it was 100%. Regarding age, 97.83% of the positive scalp cultures by *M. canis* were children up to 12 years old, with the male sex being more prevalent 61.96%.

Conclusion: Our data corroborate with the literature, with children being more affected, data that is closely related to the zoophilic characteristic of the disease, and preventive investigation in animals can be useful in this way to prevent transmission.

Keywords: dermatophytosis; *Tinea capitis*; *Microsporium canis*.

Financer: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

Thematic area: Microbiology

The background of the page is a light blue color with a pattern of flowing, curved lines in various shades of blue, creating a sense of movement and depth. The lines are most prominent on the left side and curve towards the right.

Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL NÃO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM NEURÔNIOS ENTÉRICOS DE RATOS WISTAR

Anne Caroline Santa Rosa¹; João Victor Guedes Duda²; Glaucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo³; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes⁴; Lainy Leiny de Lima⁵; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁶; Larissa Carla Lauer Schneider⁷

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Doutora em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/ PR

⁴Docente – Departamento de Ciências Patológicas e Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/ PR

⁵Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/ PR

⁷Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/ PR

Introdução: A privação de sono é uma condição de estresse que promove o aumento na concentração plasmática do cortisol, que atua no metabolismo sistêmico desregulando a sinalização dos neurotransmissores e influenciando em processos inflamatórios. O trato gastrointestinal (TGI) responde a estes estímulos modulando respostas via Sistema Nervoso Entérico (SNE). **Objetivo:** Avaliar se a restrição de sono por 21 dias altera o perfil dos neurônios HuC/D-IR dos plexos submucoso e mientérico do íleo de ratos Wistar. **Material e métodos:** Segundo o CEUA- UEL (n° 3467.2014.86), foi obtido 14 *Rattus norvegicus* Wistar, distribuídos em, Grupo Controle (GC, n=7) e Grupo com restrição de sono (R/S, n=7; submetido ao método da plataforma múltipla modificada por privação do sono paradoxal-PSP). Após 21 dias, foi realizada a eutanásia, com dose letal de Tiopental Sódico®, por laparotomia vertical coletamos o íleo, que foi lavado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS 0,1M, pH 7,4), fixado em paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,4), e submetido à técnicas de imunofluorescência. Foram capturadas 32 campos na objetiva de 16x por animal, com microscópio FSX 100 Olympus. As imagens foram analisadas com software Image- Pro Plus 4.5, e mensuradas as áreas (μm^2) de 100 corpos neuronais do plexo submucoso e mientérico por animal, totalizando 700 células por grupo. Para estatística, utilizamos o teste t de Student, com o programa Graph Pad Prism 5.0, e os resultados expressos por média \pm erro padrão, com 95% de significância. **Resultados:** Para o perfil neuronal, o resultado de RS foi similar ao GC, sem diferença significativa, em ambos os plexos entéricos analisados. **Conclusão:** O modelo experimental adotado não alterou morfológicamente os neurônios HuC/D-IR do plexo submucoso e mientérico de ratos Wistar, em 21 dias. Estudos similares ao nosso demonstraram alterações morfológicas. Possivelmente, o tempo experimental de 21 dias não é o suficiente para esta mudança.

Palavras-chave: restrição de sono; sistema nervoso entérico; trato gastrointestinal.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Fundação Araucária, Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM e Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

REGENERAÇÃO ÓSSEA DA CALVÁRIA DE RATOS APÓS IMPLANTE DO COMPÓSITO HIDROXIAPATITA- β -TRICÁLCIO FOSFATO (HA- β TCP) ASSOCIADO À CURCUMINA

Cecilia Valente Rodrigues Truite¹; Jessica Naiara Gimenez Noronha²; Gabriela de Castro Prado³; Leonardo Niero Santos⁴, Raquel da Silva Palácios⁵; Adriane do Nascimento⁵; Francielle Sato⁶; Luzmarina Hernandes⁷; Graciette Matioli⁸; Wilson Ricardo Weinand⁶.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

⁴Acadêmico do Curso de Medicina, Universidade Estadual de Maringá

⁵Acadêmicas de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente, Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá

⁷Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

⁸Docente, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Quando a estrutura óssea não pode ser reparada espontaneamente, uma alternativa viável para o restabelecimento do compartimento danificado é recompô-lo com biomateriais, sendo as cerâmicas de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita (HA) e o β -tricálcio fosfato (β -TCP), as principais utilizadas na regeneração óssea. A incorporação da curcumina em *scaffolds* à base de HA- β TCP pode, além de auxiliar na redução da severidade da inflamação, produzir mudanças benéficas na regeneração e crescimento do osso. **Objetivo:** Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um arcabouço a base de HA- β TCP e curcumina para avaliar *in vivo* o potencial osteogênico deste biomaterial. **Material e métodos:** Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM protocolada sob o CEUA nº 3379090218. Foram utilizados ratos Wistar machos que, após cirurgia de defeito de tamanho crítico (8mm), receberam implantes de HA- β TCP ou HA- β TCP associado a curcumina. Após os períodos de 15, 30, 45 e 60 dias, os animais foram submetidos a eutanásia, sendo as amostras encaminhadas diretamente para análise de Micro-raman. Para o estudo histológico, as amostras de 45 dias foram fixadas, processadas e coradas em hematoxilina e eosina. **Resultados:** O estudo morfológico dos implantes após 45 dias de observação mostrou que ambos os materiais favoreceram a proliferação e migração de células e vasos para o interior do *scaffold*, sem diferença entre os grupos com e sem curcumina. Neste período todos os poros apresentaram-se preenchidos por algum tipo de tecido, seja conjuntivo, tecido ósseo primário, tecido ósseo maduro ou ainda por cartilagem hialina. Quando realizada a análise de Micro-raman, foi observado que os *scaffolds* com curcumina apresentaram retardo na absorção da HA- β TCP. **Conclusão:** A incorporação da curcumina ao biomaterial não influenciou a regeneração do tecido ósseo em comparação com o grupo HA- β TCP, retardando a absorção do HA- β TCP.

Palavras-chave: curcumina; regeneração óssea; hidroxiapatita.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

NEONATAL METFORMIN AMELIORATE THE REPRODUCTIVE INJURIES BY ADULTHOOD HIGH-FAT DIET INTAKE

Celso Vitor Alves Queiroz Calomeno¹; Julia Calvi Mori²; Henrique Rodrigues Vieira³; Josana Klagenberg⁴; Paulo Cezar de Freitas Mathias⁵; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁶.

¹State University of Maringa, Department of Morphological Science, undergraduate in Biotechnology, Maringa, PR, Brazil.

²State University of Maringa, Department of Clinical Science, postgraduate in Biosciences and Pathophysiology - PBF, Maringa, PR, Brazil.

³State University of Maringa, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology - DBC, MSC in Biological Science, Maringa, PR, Brazil.

⁴State University of Maringa, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology - DBC, graduated in Biological Sciences, Maringa, PR, Brazil.

⁵State University of Maringa, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology - DBC, research professor, PR, Brazil.

⁶State University of Maringa, Department of Morphological Science - DCM, research professor of Program in Biosciences and Pathophysiology, Maringa, PR, Brazil.

Introduction: Metformin has been used to control the glucose blood levels. However, it has also been shown that metformin could increase reproductive harms caused by obesity and/or type-2-diabetes.

Objective: In this sense, we evaluated the impacts of metformin exposure in early lactation on sperm motility and ventral prostate (VP) morphology of rats that were feed high-fat diet in adulthood. **Material**

and Methods: Twelve animals (9 pups each) were distributed in two experimental groups: saline (S; 0.9% of NaCl/day) and metformin (M; 100mg/ Kg/day) were the male offspring received S or M daily via intraperitoneal injection until postnatal day 12 (PND). At postnatal day 60 (PND60) males were subdivided in normal fat diet (S-NFD and M-NFD; 4.5% fat) or high fat diet (S-HFD and M-HFD; 35% fat). At PND90, the animals were euthanized VP and vas deferens (VD) were dissected and weighted. VP was used to morphological analysis. The sperm from VD was used to motility analysis. The data was analyzed by Two-way ANOVA with post-hoc Turkey's test (Ethical Approval by CEUA/UEM 5869020418). **Results:** It was observed an increase in body weight in both groups feed with HFD in adulthood in relation to their controls. There is no statistical difference in VP and VD relative weight between groups. There was a reduction in number of mobile and immobile sperms in the S-HFD group compared with S-NFD ($p < 0.05$). Histopathological analysis revealed prostatitis in the PV of S-HFD and M-HFD; hyperplasia and epithelial mucinous degeneration in PV of S-HFD, but not in M-HFD.

Conclusion: Our results suggest that metformin ameliorate the injuries by adulthood high-fat diet intake.

Key-words: sperm motility; histopathology; ventral prostate.

Financial Support: CNPq.

Area: Morphology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EXPRESSÃO DE BMP-2 EM DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATOS, APÓS IMPLANTE DE SCAFFOLDS DE HIDROXIAPATITA (HAp) NATURAL E SEU NANOCOMPÓSITO COM Nb₂O₅ (HAp-Nb)

Gabriela de Castro Prado¹, Celso Vataru Nakamura², Wilson Ricardo Weinand³, Luzmarina Hernandez⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A matriz extracelular (MEC) é fundamental para o processo de mineralização e de regeneração óssea. Estudos têm mostrado que scaffolds constituídos por cerâmicas à base de fosfato de cálcio, extraídas de ossos de peixe, associadas ou não com pentóxido de nióbio (Nb₂O₅), estimulam a regeneração óssea em defeitos ósseos de tamanho crítico (DTC) na calvária de ratos e representam um biomaterial promissor para atuar como substituto ósseo. Porém, a qualidade da matriz óssea formada sobre os *scaffolds* não é conhecida. **Objetivo:** Avaliar a expressão da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) no tecido ósseo neoformado em *scaffolds* de HAp e do compósito HAp-Nb após implante em DTC na calvária de ratos. **Material e Métodos:** Para a realização dos DTC (8mm), foram utilizados 60 ratos Wistar (90 dias, 200 e 250g) sob aprovação do CEUA-UEM (nº9595200717). Os animais foram divididos em dois grupos: (1) Grupo HAp e (2) Grupo HAp-Nb. A eutanásia foi realizada 30 e 45 dias após o implante. O estudo imunohistoquímico foi realizado nas lâminas previamente cortadas (7µm), utilizando anticorpo primário policlonal anti-BMP2. O estudo descritivo foi realizado após observação em microscopia óptica. **Resultados:** No período de 30 dias, em ambos os grupos, foi observada imunocoloração em osteoblastos, osteócitos e em vasos localizados no interior dos poros. A matriz óssea madura, lamelar presente nos poros não se apresentou imunocorada. Além dos poros, apresentaram-se imunocorados a matriz do osso novo presente nas margens dos defeitos, vasos sanguíneos e osteoblastos também presentes nesta região marginal. Aos 45 dias, uma maior frequência de poros preenchidos por tecido ósseo maduro, não imunorreativo, foi observada. **Conclusão:** Nossos resultados demonstraram que 30 e 45 dias após o implante de HAp e HAp-Nb em DTC na calvária de ratos, a maior expressão de BMP-2, no tecido de regeneração, ocorre no tecido ósseo imaturo.

Palavras-chave: biocerâmicas de fosfato de cálcio; regeneração óssea; imunohistoquímica.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AÇÃO DO GEL DE *Limonium brasiliense* NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS.

Gislaine Stella Alves Amaral¹; Cléverson de Oliveira e Silva²; Luzmarina Hernandes ³; João Carlos Palazzo de Mello⁴; Driele Fernanda Schneider⁵.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá

³Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

⁵Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A doença periodontal é uma patologia que leva à perda dentária e afeta mais da metade da população mundial. *Limonium brasiliense* é uma planta que possui ação bacteriostática, anti-inflamatória e antioxidante e, recentemente, foi comprovada a sua ação inibitória sobre a adesividade de *Porphyromonas gingivalis*, principal bactéria causadora da doença periodontal, com as células epiteliais humanas da linhagem KB. **Objetivo:** Avaliar ação do gel à base de extrato acetato de etila de *L. brasiliense* na inibição da doença periodontal induzida experimentalmente. **Materiais e métodos:** Todos os procedimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA Nº 8930141118) da Universidade Estadual de Maringá. A doença periodontal foi induzida nos segundos molares superiores, de 22 ratos Wistar machos com 65 dias, por meio da colocação da ligadura de algodão. Os animais foram divididos em sete grupos de acordo com o tratamento: controle negativo, sem indução da doença; doença periodontal sem tratamento; doença tratada com clorexidina 0,12%; doença tratada com gel veículo; doença tratada com gel de *L. brasiliense* 0,5%, 1% e 2%. As aplicações dos géis foram realizadas com *microbrush* durante 1 minuto, 2x/dia durante 11 dias. Depois os animais foram eutanasiados e as maxilas coletadas, fixadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina. A região periodontal foi analisada mediante escores quanto à presença de inflamação nas regiões mesial, distal e de furca pela análise de frequência. **Resultados:** Mostraram que o tratamento com gel de *L. brasiliense* 1% obteve redução da intensidade de inflamação. A concentração de 2% demonstrou resultados menos satisfatórios, que parecem ultrapassar a ação benéfica e apresentar um efeito negativo. O gel a 0,5% parece ter um efeito menor do que desejável. **Conclusão:** O gel de *L. brasiliense* 1% apresentou o melhor resultado na evolução da doença periodontal, atenuando os seus efeitos deletérios.

Palavras-chave: inflamação; fitofármacos; indução da doença periodontal.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

USO DE *Echinacea purpurea* CAUSA AUMENTO NA ÁREA DOS GÂNGLIOS MIOENTÉRICOS DO JEJUNO DE *Rattus norvegicus* COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii*

Henrique Cazanti Sona¹; Maria José Pastre²; Claudia Nara de Almeida Lino Bratti³; Lainy Leiny de Lima⁴; Aline Rosa Trevizan⁵; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁶.

¹Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Doutora em Biologia das Interações orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A infecção oral pelo *Toxoplasma gondii* provoca uma resposta inflamatória intestinal já demonstrada no intestino delgado de roedores. A inflamação pode comprometer a função orgânica e, a *Echinacea purpurea* é um importante imuno-estimulante e anti-inflamatório. **Objetivo:** Investigar os efeitos do uso de *Echinacea purpurea* sobre a área dos gânglios mioentérico jejunais em ratos infectados por *T. gondii*. **Material e métodos:** O projeto foi aprovado pelo CEUA-UEM (nº7633021018). Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus*, *Wistar*, machos (n=6), distribuídos aleatoriamente em GC (Grupo Controle), GI-NT (Grupo Infectado e Não Tratado), GC-EP100 (Grupo Controle não infectado e Tratado) e GI-EP100 (Grupo Infectado e Tratado). Os ratos dos grupos GC-EP100 e GI-EP100 foram tratados por via oral com 100 mg/kg diárias de *Echinacea purpurea* por 28 dias antes e depois da inoculação. Os ratos não infectados receberam água pela mesma via. Os grupos infectados receberam por via oral 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH). Todos foram submetidos a eutanásia e coletados os jejunos. Cortes transversais semi-seriados de 4 μm foram corados pela técnica Azan, capturadas 16 imagens de cada lâmina na objetiva da 20x com microscópio óptico acoplado ao Software Image Pro Plus. A área dos gânglios mioentéricos foi mensurada, apresentada em micrômetros quadrados (μm^2) e comparadas pelo teste ANOVA por meio do Software GraphPad Prism 5.01. **Resultados:** A área dos gânglios do plexo mioentérico aumentou ($p < 0,05$) no GC-EP100 ($1533 \pm 990.4 \mu\text{m}^2$) em relação aos grupos GC ($956.4 \pm 856.6 \mu\text{m}^2$), GI-NT ($1065 \pm 743.0 \mu\text{m}^2$) e GI-EP100 ($1052 \pm 876.9 \mu\text{m}^2$). **Conclusão:** O uso de *Echinacea purpurea* causa o aumento na área dos gânglios mioentéricos no jejuno de ratos infectados por *T. gondii*.

Palavras-chave: toxoplasmose; gânglios nervosos; intestino delgado.

Financiador (es): CAPES e CNPq

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

LOW PROTEIN DIET INFLUENCED THE PROLIFERATION/DIFFERENTIATION CELL DYNAMIC IN RAT VENTRAL PROSTATE

Jaqueline C Rinaldi¹; Wen-Yang Hu²; Lynn Birch²; Gail Susan Prins²

¹State University of Maringa – UEM, Maringa/Brazil

²University of Illinois at Chicago – UIC, Chicago/USA

Introduction: Low protein diet (LPD) during gestational/lactational periods can create an imbalance in sexual hormone levels. It directly influence the morphophysiology of androgen dependent structures, such as the prostate. **Objective:** In this study, we investigated the effects of LPD on the development of rat ventral prostate (VP) by examining hormonal modulation of epithelial cell proliferation and androgen receptor expression *in vitro*. **Methods:** (CEUA/UNESP no.476) Briefly, *Sprague Dawley* dams were distributed into NPD/ control group (fed a normal protein diet containing 17% protein) or LPD/low protein diet group (fed a diet containing 6% protein) during gestation. After birth, all males were euthanized and the VP dissected. The VP from NPD and LPD animals were submitted to morphological and molecular analysis. **Results:** LPD offspring showed reduction of plasma testosterone levels as well as lower body and glandular weights compared to NPD offspring at birth. LPD animals also presented smaller VP compared to NPD animals. There was no change of androgen receptor expression in VP between groups, however the relative levels of stemness genes (*Nanog*, *Abcg2*, *Trop2*) were higher in the LPD animals. These results suggest that the proliferation/differentiation cell dynamic was disrupted, which favors basal cell phenotype (ck5) and limited the differentiation into secretory luminal cells (ck18). **Conclusion:** In summary, low protein diet influenced the proliferation/differentiation cell dynamic and promoted a delay in ventral prostate development.

Palavras-chave: protein malnutrition; testosterone; prostate development.

Financiador (es): FAPESP

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS VASOS HEPÁTICOS DE RATOS *WISTAR* SUPLEMENTADOS COM L-GLUTATIONA 1% EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE WALKER-256

João Victor Kuller¹; Carla Cristina de Oliveira Bernardo²; Fabiana Galvão da Motta Lima³; Lídia Rodrigues Cicero⁴; Edicléia Martins Rampani⁵; Jacqueline Nelisis Zanoni⁶; Juliana Vanessa Colombo Martins Perles⁷

¹Acadêmico de Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Mestre em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁷Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A caquexia é a principal comorbidade associada ao câncer e possui como uma característica o estresse oxidativo sistêmico. O fígado é o principal órgão responsável pelos processos oxidativos e desintoxicantes do organismo. A glutatona tem um papel crucial como um eliminador de radicais livres. **Objetivo:** Avaliar os efeitos antioxidantes da L-Glutatona 1% sobre a morfologia dos vasos hepáticos de ratos *Wistar* portadores de tumor de Walker-256. **Materiais e Métodos:** Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UEM, protocolo 099/2012. Foram utilizados o fígado de ratos *Wistar* adultos, machos, distribuídos em quatro grupos (n=6): Controle (C), Controle suplementado com L-Glutatona 1% (CGT), Tumor de Walker-256 (TW) e Tumor de Walker-256 suplementado com L-Glutatona 1% (TWGT). A indução do tumor foi feita por inoculação de uma suspensão contendo $8,0 \times 10^7$ células tumorais viáveis Walker-256, injetadas no flanco direito traseiro. Os animais tratados (CGT e TWGT) receberam a L-Glutatona incorporada à ração padrão na proporção de 1%. Passados 14 dias, os animais foram eutanasiados, os fígados foram coletados, processados e as lâminas foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina para análise morfométrica do diâmetro das veias centrolobulares. **Resultados:** Os resultados foram submetidos ao delineamento em blocos seguido de teste de Fisher utilizando o programa estatística 8.0. O nível de significância foi de 5%. Os animais TW e TWGT apresentaram diâmetro médio da veia de 4393,198 μm e 4243,578 μm respectivamente, não sendo significativamente diferentes do grupo C (4024,240 μm). Entretanto, os animais do grupo CGT apresentaram diâmetro médio dos vasos de 4604,224 μm , um aumento de 14,4% em relação ao C. **Conclusão:** Conclui-se que a L-Glutatona promoveu um aumento do diâmetro das veias centrolobulares nos animais CGT. Mais estudos são necessários para melhor conhecer os mecanismos relacionados à patologia da doença.

Palavras-chave: veia centrolobular; fígado; antioxidante.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE DISTAL COLON WALL OF UNINFECTED AND INFECTED RATS WITH 5000 *Toxoplasma gondii* OOCYSTS IN DIFFERENT PERIODS OF INFECTION

Juliana Santos Barros¹; Luana Brunelly Araújo de Lima¹; Eduardo Jose de Almeida Araújo²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Marcelo Biondaro Gois⁴;

¹Medical Student's at Federal University of Recôncavo of Bahia;

²State University of Londrina, Paraná, Brazil;

³State University of Maringá, Paraná, Brazil;

⁴Federal University of Recôncavo of Bahia.

Introduction: Several studies report that chronic infection caused by *Toxoplasma gondii* causes changes in the distal colon of rats. However, there are no reports on the kinetics of changes during the first hours after inoculation. **Objective:** This study aimed to evaluate the effects of acute infection with *T. gondii* on the morphometry of the mucosa distal colon of rats. **Materials and methods:** The experimental protocol was approved (CEUA/UEM N°. 079/2013). Eighty Wistar rats were randomly separated into infected group (IG) with 5000 *T. gondii* sporulated oocysts (n=70) and control group (CG; n=10). Ten infected rats were killed during the course of the infection at 6 hours, 12h, 24h, 48h, 72h, 7 days, or 10d of infection. All rats were 60 day-old at the time of euthanasia, including the CG. The distal colon segments were collected, washed, fixed, and submitted to a histological routine for staining in HE. **Results:** Acute infection caused morphometric changes in the strata that compose the distal colon wall of infected rats with 5000 *T. gondii* oocysts. There was an increase in the total distal colon wall thickness of infected rats during 6 and 48h and reduction after 12, 24 and 72h, 7 and 10d of infection, compared to CG ($P < 0.05$). In the muscle layer, we demonstrated an increase in thickness after 6, 12, 24, 72h and at 7d of infection and reduction after 48h and 10d of infection, compared to CG ($P < 0.05$). There was an increase in the thickness of the submucosa 6h after infection and reduction after 12, 72h and at 7 and 10d of infection, compared to CG ($P < 0.05$). The thickness of the colonic mucosa decreased ($P < 0.05$) in all evaluated periods, compared to CG. **Conclusion:** *T. gondii* caused changes in the distal colon wall of rats from 6h after inoculation.

Keywords: morphometry; toxoplasmosis; mucosal immunity.

Financiador (es): FAPESB

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO 5-FLUOROURACIL: ALTERAÇÕES NA MASSA CARDÍACA E NA DISPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS DE RATOS *WISTAR*

Karile Cristina da Costa¹; Pedro Luiz Zonta de Freitas¹; Mariana Conceição da Silva²; Lilian Catarim Fabiano³; Carmem Patrícia Barbosa⁴; Nilza Cristina Buttow⁴.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmicos de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas (PBC), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: O 5-Fluorouracil (5-FU) é um quimioterápico utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos. Sua atividade antimetabólica interrompe a síntese do DNA e do RNA. Entretanto, sua atuação ocasiona diversos efeitos colaterais, como é o caso da cardiotoxicidade. Esta está associada a diversos sintomas como arritmia, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio. Embora existam diversos estudos das ações do 5-FU em tratamentos com altas doses, poucas pesquisas utilizam a dose clínica deste fármaco. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com dose clínica de 5-FU sobre a massa cardíaca total e sobre a disposição de fibras colágenas do tipo I e III no coração de ratos *Wistar*. **Material e métodos:** Estudo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, parecer nº4422140918. Foram utilizados ratos *Wistar* machos divididos em grupos controle (GC; n=6) e tratado (GT; n=6). O GC recebeu solução salina e o GT dose clínica recomendada de 5-FU: 15mg/kg por 4 dias consecutivos, seguidos de 6mg/kg por 4 dias alternados e 15mg/kg em última dose no 14º dia. No 15º os animais foram eutanasiados e seus corações foram retirados e pesados. Posteriormente os átrios cardíacos foram emblocados, cortados em micrótomo (cortes semi-seriados de 5 µm) e corados com Picrosirius red. Assim, foram capturadas 35 imagens por animal (objetiva da 40x) com microscópio de luz polarizada e analisado pelo Software Image Pro Plus. Quantificou-se as áreas de colágeno presentes em cada imagem e os resultados foram analisados pelo Software GraphPad Prisma por meio do teste *t* de *Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativo. **Resultados:** A massa total do coração foi significativamente menor ($p=0,0179$) no GT. O tratamento também aumentou significativamente a presença de colágeno do tipo III ($p=0,0349$) no coração. **Conclusão:** O tratamento com 5-FU promove perda de massa cardíaca e reduz a proporção colágeno I: III.

Palavras-chave: 5-FU; quimioterápico; colágeno tipo III.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NÃO PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS TÚNICAS MUSCULARES DO JEJUNO DE HAMSTERS

Lainy Leiny de Lima¹; Gabriella Letícia Bonone² Amanda Gubert Alves dos Santos³; Aline Rosa Trevizan⁴; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁵; Débora de Melo Gonçalves Sant'Ana⁶

¹Bióloga, Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Enfermeira, Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A leishmaniose, é uma protozoonose amplamente difundida pelo mundo, alcançando quase 100 países. Há relatos de que sua forma tegumentar chega até o intestino, todavia, não há estudos que demonstrem que a *L. (V) braziliensis* interfere morfológicamente na túnica muscular do jejuno de hamsters. **Objetivo:** Deste modo, o objetivo deste estudo foi compreender o efeito da infecção por *L. (V) braziliensis* sobre a musculatura do jejuno de hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Material e métodos:** O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UEM sob o protocolo 7587260416. Foram utilizadas 8 hamsters fêmeas distribuídas aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo controle (CG) e um grupo infectado com 2×10^7 promastigotas da cepa MHOM/BR/1975/M2903 no dorso do membro posterior esquerdo. Após 90 dias de infecção os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. O jejuno foi coletado, fixado, posteriormente, submetido a rotina histológica. Cortes semi seriados de 4 μm foram realizados para confecção das lâminas (4 cortes por lâmina) corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Logo após, 16 imagens foram capturadas (1 imagem/quadrante). Foi realizada 64 mensurações para cada parâmetro, túnica muscular longitudinal, circular e total na objetiva de 20x. A análise estatística foi realizada aplicando teste t ($p < 0,05$), e os dados foram apresentados por média \pm erro padrão (μm). **Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas na túnica muscular longitudinal, circular e total do GI (46.71 ± 2.27 ; 34.23 ± 2.80 ; 75.51 ± 5.64) se comparado ao GC (39.44 ± 3.04 ; 30.80 ± 2.20 ; 68.67 ± 5.24), respectivamente. **Conclusão:** A infecção subcutânea por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, durante 90 dias não foi capaz de promover alteração morfológicas na arquitetura muscular do jejuno de hamsters.

Palavras-chave: trato gastrointestinal; leishmaniose, *Leishmania tegumentar*.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundação Araucária.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

REDUÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DE MASTÓCITOS DO LOBO VENTRAL DA PRÓSTATA DE RATOS *Wistar* ADMINISTRADOS COM 5-FLUORURACIL

Letícia Ganem Rillo Paz Barateiro¹; Pedro Luiz Zonta de Freitas²; Lilian Catarim Fabiano³; Karile Cristina da Costa²; Mariana Conceição da Silva⁴; Nilza Cristina Buttow⁵; Eneri Vieira de Souza Leite Mello⁵; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁵

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A quimioterapia com 5-fluoruracil (5-FU) têm demonstrado promover toxicidade ao organismo, porém há poucos dados sobre seu impacto em órgãos do sistema reprodutor, por exemplo a próstata. Como o uso desse método para tratamento de neoplasias também afeta células saudáveis, a resposta imunológica pode ser comprometida. Desta, participam células como os mastócitos, os quais são responsáveis por estocar e liberar mediadores químicos da inflamação. **Objetivo:** Avaliar a população total de mastócitos do lobo ventral da próstata de ratos após administração de 5-FU. **Material e métodos:** O estudo experimental recebeu aprovação pelo CEUA – UEM (parecer número 4422140918). Foram utilizados 14 ratos *Wistar* machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, divididos em dois grupos (n=7): grupo QFU, cujos animais receberam intraperitonealmente o quimioterápico 5-FU na dose de 15 mg/kg por 4 dias seguidos, 6mg/kg por 4 dias alternados e dose final de 15mg/kg no dia anterior a eutanásia; grupo CTR, cujos animais receberam PBS pela mesma via e período descritos. Realizou-se a eutanásia de ambos os grupos no 15º dia experimental, a próstata foi dissecada, fixada em metacarn e incluída em parafina. Cortes com 5 µm de espessura obtidos do lobo prostático ventral foram corados com Azul de Toluidina para quantificação dos mastócitos totais por microscopia de luz (objetiva de 100x e totalizando 100 campos avaliados). Os registros foram analisados estatisticamente pelo teste t de student por meio do programa GraphPad Prism® 5 (Copyright GraphPad Software, Inc.) e os resultados expressos em média ± erro padrão. **Resultados:** Houve diferença significativa (p<0,05) entre os grupos (CTR=210,0 ± 19,7, QFU=129,5 ± 11,2 mastócitos/mm²). **Conclusão:** O 5-FU promoveu a redução da população total de mastócitos residentes na próstata ventral.

Palavras-chave: quimioterapia; histologia prostática; resposta imune.

Financiador (es): CAPES, UEM, CNPQ, Fundação Araucária.

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CD68-POSITIVE MACROPHAGES IN THE MUCOSA OF THE JEJUNUM OF ARTHRITIC RATS TREATED WITH QUERCETIN-LOADED MICROCAPSULES

Lídia Rodrigues Cicero¹; Bruna Thais da Silva³; Fabiana Galvão da Motta Lima⁴; Sabrina Silva Sestak²; Mariana Rodrigues Sanches¹; Maysa Pacheco Alvarez da Silva⁵; Carla Cristina de Oliveira Bernardo¹; Juliana Vanessa Colombo Martins Perles⁶; Jacqueline Nelisis Zanon⁶

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Mestre em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Acadêmica de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that causes immune dysregulations in the organism, thus possibly altering the macrophages population widely distributed in the intestine. The treatment for RA involves the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, which causes adverse gastrointestinal effects. Due to this, natural substances have been researched as an alternative treatment for the disease, such as quercetin, a flavonoid with potential anti-inflammatory and antioxidant activities. **Objective:** This study aimed to evaluate the density of macrophages in the jejunum mucosa of arthritic rats treated with quercetin-loaded microcapsules. **Material and methods:** Thirty adult male Holtzman rats (CEUA-UEM protocol 4462180216) were distributed into 5 experimental groups, with 6 animals each: C (control), control treated with quercetin (CQ), arthritic (AIA), arthritic treated with ibuprofen 17.5mg/kg (AI) and arthritic treated with quercetin-loaded microcapsules 10mg/kg (AQ). Arthritic animals were induced by an intradermal injection of complete Freund's Adjuvant. The experimental period lasted 60 days with daily treatments by gavage. After this period, the animals were euthanized and the jejunum was collected to perform immunohistochemical techniques for labeling CD68⁺ macrophages. For the quantification of macrophages, 30 villi were counted per animal using Image Pro Plus 4® program and the results were analyzed by the GraphPad Prism6 and Statistica8.0 programs. **Results:** A significant increase in cell density was observed in AIA (38%, vs. C). Also, was observed a significant increase of 10% in the number of macrophages in CQ in relation to the control. The treated groups presented a significant reduction in the CD68⁺ macrophages density, of 24% in AI and 21% in AQ, when compared to AIA. **Conclusion:** It concludes that quercetin treatment was effective in reducing the density of CD68⁺ macrophages. Action similar to ibuprofen, standard medicine used as a reference in this study. Also, treatment with quercetin in healthy animals showed a moderate increase in this cell population.

Keywords: macrophages; arthritis; histology.

Thematic area: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ACUTE INFECTION INDUCED BY *Toxoplasma gondii* CAUSES HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN THE DISTAL COLON OF RATS

Luana Brunelly Araujo de Lima¹; Juliana Santos Barros¹; Eduardo Jose de Almeida Araújo²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Marcelo Biondaro Gois⁴.

¹Medical Student's, at Federal University of Recôncavo of Bahia;

²Professor at State University of Londrina, Paraná, Brazil;

³Professor at State University of Maringá, Paraná, Brazil;

⁴Professor at Federal University of Recôncavo of Bahia.

Introduction: *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasitic protozoan, etiological agent of toxoplasmosis. Once ingested, *T. gondii* parasites penetrate the intestine and rapidly disseminate through all organs of the body, where it induce significant immunopathology. **Objective:** This study aimed to perform histopathological analysis on the colon wall of uninfected rats and infected with 5,000 *T. gondii* oocysts at different periods of acute infection. **Material and methods:** Eighty Wistar rats were randomly separated into an uninfected control group (CG; n = 10) and an infected group (GI), orally, 5000 sporulated oocysts of *T. gondii* (n=70). Ten infected rats were killed during the course of the infection at 6 hours, 12h, 24h, 48h, 72h, 7 days or 10d of infection. All rats were 60 days old at the time of euthanasia, including the CG. Colon segments were collected, washed, fixed and submitted to a histological routine for staining in hematoxylin/eosin (H&E). The procedures were approved (CEUA/UEM N°. 079/2013). Histopathological analysis was performed according to degree (score 0-3) loss of histoarchitecture and inflammation, evaluated in a blinded fashion. The results were expressed as median with interquartile deviation and compared using the Kruskal-Wallis test and Dunn post-test. **Results:** The distal colon of rats infected suffered extensive damage when compared to the control. The semi-quantitative analysis revealed an increase in scores that resulted in histoarchitecture loss after 48 and 72h and at 7d of infection compared to the control ($P < 0.05$). We observed increased scores for the presence and distribution of inflammatory infiltrate in the colonic wall and inflammation in the intestinal crypts (cryptitis) at 7 and 10 days after infection, compared to the control ($P < 0.05$). **Conclusion:** Results suggest that such changes are due to the infectious process, which starts early.

Keywords: histopathology; histoarchitecture; acute infection.

Financier (s): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Thematic area: Morphology.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DOSE DE 5-FLUOROURACIL UTILIZADA NA PRÁTICA ONCOLÓGICA PROMOVE ALTERAÇÕES NA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL E NOS NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO PLEXO MIOENTÉRICO DO CÓLON DE RATOS *WISTAR*.

Pedro Luiz Zonta de Freitas¹; Lilian Catarim Fabiano²; Karile Cristina da Costa²; Mariana Conceição da Silva³; Camila Quaglio Néves⁴; Stephanie Carvalho Borges⁴; Nilza Cristina Buttow⁵

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmicas de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmicas de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente do Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O 5-Fluorouracil (5-FU) é o quimioterápico mais prescrito para o tratamento contra câncer colorretal. Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da síntese celular. Porém, é um medicamento em que a ação não é seletiva as células cancerígenas, desencadeando diversos efeitos colaterais, como disfunções na motilidade gastrointestinal. Estas podem ser desencadeadas por alterações no Sistema Nervoso Entérico. Especialmente aos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico, que auxiliam no controle da motilidade intestinal. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da dose de 5-FU utilizada na prática oncológica sobre a motilidade gastrointestinal e sobre a subpopulação nitrérgica do plexo mioentérico do cólon proximal e distal de ratos *Wistar*. **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo CEUA/UEM (n° 4422140918). Foram utilizados 12 animais divididos em 2 grupos (n= 6): controle (C), que recebeu via intraperitoneal solução salina, e, grupo 5-FU, que receberam via intraperitoneal 15 mg/kg por 4 dias consecutivos, seguido de 6 mg/kg em 4 dias alternados, e no 14° dia novamente a dose de 15 mg/kg. No 14° dia foi avaliado o tempo de trânsito gastrintestinal através da administração de corante não absorvível via gavagem. Os cólons proximal e distal foram coletados e fixados. Foram dissecados e submetidos a técnica imunohistoquímica para os neurônios nitrérgicos (nNOS⁺). Foram realizadas as análises da densidade e do perfil neuronal. As análises estatísticas foram feitas a partir do teste *t* de *Student*. **Resultados:** Houve aumento no tempo de trânsito gastrointestinal no grupo 5-FU. No cólon distal houve redução na densidade e aumento do perfil neuronal nitrérgico no grupo tratado. Já no cólon proximal não houve alteração na densidade neuronal mas houve redução no perfil neuronal. **Conclusão:** O tratamento com a dose de 5-FU utilizada na prática oncológica, promove alterações na motilidade gastrointestinal e na densidade e perfil neuronal nitrérgico no plexo mioentérico do cólon.

Palavras-chave: quimioterapia; neurotoxicidade; sistema nervoso entérico.

Financiador: CAPES

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO CRÔNICA DO *Toxoplasma gondii* NA MORFOMETRIA DOS FOLÍCULOS OVARIANOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS

Vanessa de Brito Pereira¹; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Jaqueline de Carvalho Rinaldi³

¹Acadêmica de Graduação em Ciências biológicas, Universidade Estadual de Maringá/Maringá-PR

²Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá/Maringá-PR

³Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá/Maringá-PR

Introdução: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário coccídeo intracelular causador da toxoplasmose, uma parasitose de ampla distribuição geográfica. O estudo dos impactos desta zoonose é importante por ter distribuição mundial e causar diversos transtornos reprodutivos em vários hospedeiros intermediários, porém ainda sabe-se pouco sobre seus efeitos nos órgãos da reprodução.

Objetivo: Investigar o impacto da infecção crônica por *T. gondii* sobre a morfologia de ovário de camundongos C57BL/6 adultos. **Material e métodos:** 16 fêmeas foram divididos em grupo controle (GC) e grupo infectado (GI), sendo que os animais infectados receberam 1000 oocistos por gavagem. Após 60 dias de infecção os animais foram eutanasiados com Isoflurano por nebulização e tiveram o ovário dissecado, pesado e fixado em parafina. O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA/UEM sob nº 4092040517. Cortes de 5µm foram corados em Hematoxilina-eosina para análise em microscopia de luz na objetiva de 20x da morfologia geral da gônada e quantificação dos folículos ovarianos. **Resultados:** Diante da análise do ciclo estral dos animais, foram selecionadas amostras de animais que se encontravam em estro. O peso corpóreo e do ovário não foram afetados pela infecção crônica por *T. gondii* comparando a média de peso entre o controle e o infectado. A região cortical ovariana do grupo infectado apresentou maior quantidade de folículos ovarianos totais quando comparado ao grupo controle. As análises foram realizadas pelo STATISTICA® 6.0. **Conclusão:** Diante dos resultados já obtidos conclui-se que a infecção crônica por *T. gondii* causa impacto sobre a morfologia dos ovários de camundongos C57BL/6 adultos. As perspectivas futuras são de realizar a quantificação diferencial dos folículos ovarianos e investigar o mecanismo envolvido no atraso de maturação folicular.

Palavras-chave: ovário; toxoplasmose; ciclo estral.

Financiador (es): CNPq e CAPES – código de financiamento 001

Área temática: Morfologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

LEISHMANIOSE VISCERAL NÃO PROVOCA ALTERAÇÃO NA ÁREA DOS GÂNGLIOS MIOENTÉRICOS E SUBMUCOSOS DO JEJUNO DE CÃES

Vivian Fuguhara de Lima^{1,2}; Amanda Gubert Alves dos Santos^{3,4}; Herintha Coeto Neitzke Abreu⁵; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁶; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁷.

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

²Bolsista PIBIC/CNPq-FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-UEM.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

⁵Docente – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS.

⁶Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

⁷Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: Leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica e sistêmica grave que pode ser fatal quando não tratada atingindo vários órgãos, como o intestino. Um de seus causadores é o protozoário *Leishmania infantum chagasi* que pode ser encontrado em cães na área urbana. O Sistema Nervoso Entérico, responsável pelo controle motor e secretório do trato gastrointestinal, é constituído pelos plexos ganglionares mioentérico e submucoso. **Objetivo:** Avaliar a área dos gânglios mioentéricos (GM) e submucosos (GS) do jejuno de cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum chagasi*. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (27/2016). Dez animais foram distribuídos em dois grupos: controle (n=4; sorologia negativa para LV) e infectado (n=6; sorologia positiva para LV). Os cães provieram do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, onde os órgãos foram coletados. Na Universidade Estadual de Maringá, o material foi processado histologicamente e corado pela técnica de Hematoxilina-Eosina. A análise morfométrica dos gânglios foi realizada a partir de imagens capturadas na objetiva de 10X no Image-Pro Plus[®]. O programa BioEstat[®] foi utilizado para verificar o tipo de distribuição dos dados na análise estatística e em seguida foi aplicado o teste T (GraphPad Prism[®]) nos dados de distribuição normal e o Kruskal-Wallis (BioEstat[®]) nos de distribuição livre. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. **Resultados:** A área dos gânglios mioentéricos e submucosos não sofreu alteração significativa quando comparado o grupo infectado [GM: 18130 \pm 5514 μm^2 ; GS: 12450 \pm 2089 μm^2] com o controle [GM: 16670 \pm 4190 μm^2 ; GS: 10660 \pm 1938 μm^2], apesar de haver um aumento de 8,76% e 16,79%, respectivamente. **Conclusão:** A infecção por *Leishmania infantum chagasi* não alterou a área dos gânglios mioentéricos e submucosos no jejuno de cães naturalmente infectados.

Palavras-chave: intestino delgado; *Leishmania infantum chagasi*; sistema nervoso entérico.

Financiador: Fundação Araucária.

Área temática: Morfologia



Neurociências



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PERSPECTIVAS E DESAFIOS APRESENTADAS POR PROFESSORES QUE TRABALHAM COM CRIANÇAS DIAGNOSTICADAS COM ALTAS HABILIDADES E SUPERDOTAÇÃO

Clara Milena Repula Souza¹; Carla Betania Hulf Ferraz Campos²

¹Pedagoga. Acadêmica de Pós-Graduação em Neuropsicopedagogia Clínica, Faculdade Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo. Docente no Colégio Adventista de Pinhais.

²Fisioterapeuta. Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Universidade Estadual de Maringá. Docente da Faculdade Adventista Paranaense.

Introdução: No Brasil, estima-se que 3,5% a 5% da população possui Altas Habilidades/Superdotação (AH/SD), apesar de nem todos serem avaliados. Os que são avaliados, estão amparados por lei com direito a receber auxílio adequado, pois desenvolvem cedo suas capacidades cognitivas acarretando isolamento ou até mesmo retardo proposital em seu aprendizado. **Objetivo:** Este trabalho tem como objetivo, saber por meio de profissionais da educação, como é trabalhar com crianças AH/SD nas escolas, quais as suas dificuldades e percepções em relação à esses alunos. **Material e métodos:** Foi utilizado o método de pesquisa exploratório descritivo com entrevista semiestruturada com gravação de áudio. Foram entrevistados três (3) profissionais, dois (2) professores da sala de recursos de AH/SD e a coordenadora do centro de AH/SD, ambos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorização para fotos e filmagem e preencheram um breve questionário de apresentação. As entrevistas foram realizadas na cidade de Maringá, na sala de recursos onde crianças com AH/SD são atendidas, no mês de Novembro/2019. **Resultados:** Os resultados apontam que existe grande preocupação entre os profissionais com o pouco conhecimento de seus colegas de profissão sobre o assunto, um dos entrevistados colocou: "no início não sabia utilizar o recurso para trabalhar a habilidade na falta de habilidade de criança." Na grande maioria das situações, professores do ensino regular tem muitas dificuldades em conseguir recursos para ajudar alunos de AH/SD, muitos deles, por falta de conhecimento e capacitações. **Conclusão:** Hoje, mesmo existindo Lei dizendo que as necessidades dessas crianças devem ser atendidas para seu enriquecimento e desenvolvimento, as escolas não estão preparadas para recebê-los pela falta de capacitação de professores e funcionários. A partir disso, concluímos que os profissionais e escolas ainda tem muito a capacitar-se e desenvolver-se.

Palavras-chave: altas habilidades; superdotação; inclusão.

Área temática: Neurociência.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CRF1 NO NÚCLEO INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL (BNST) NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS TIPO ANSIOSOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Fernanda Silva Borges¹; Gustavo Juliate Damaceno Fernandes²; Tarciso Tadeu Miguel³

¹Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG

²Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG

³Docente – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Uberlândia

Introdução: Ansiedade patológica prejudica a qualidade de vida e os tratamentos disponíveis têm eficácia limitada. Estudos mostram envolvimento do BNST (núcleo intersticial da estria terminal), e neurotransmissor CRF (fator liberador de corticotrofina) na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. **Objetivo:** (i) avaliar efeito da microinjeção do antagonista do receptor CRF1, CP375396 intra-BNST sobre respostas comportamentais de camundongos-C57BL/6 expostos a dois modelos de ansiedade: labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de exposição ao rato (TER); (ii) avaliar efeito do TER na atividade do BNST e expressão CRF1. **Material e métodos:** experimentos aprovados CEUA-UFU, protocolo 111/15. Exp.1: Camundongos que sofreram cirurgia estereotáxica de implante de cânula foram tratados intra-BNST com veículo ou CP375396 e expostos a um dos aparatos citados. Exp.2: Grupo teste foi exposto ao TER com rato, grupo controle1 a um rato de pelúcia ou grupo controle2 mantido na caixa-viveiro e após foram realizadas imunohistoquímica para Fos (IHF) e RT-PCR para receptor CRF1. Resultados submetidos a ANOVA mono ou bifatorial (pós-teste Duncan) dependendo do desenho experimental (significância= $p < 0,05$). **Resultados:** Exp.1. (i) LCE: tratamento com CP 376395 intra BNST (1,5nmol, mas não 3,0nmol) aumentou o tempo nos braços abertos e a frequência de mergulhos desprotegidos (indicativos de efeitos tipo-ansiolíticos), sem alterações nos outros comportamentos analisados. (ii) TER: tratamento com 1,5nmol (mas não 3,0 nmol) de CP 376395 levou um aumento do tempo na superfície e redução no comportamento de andar agachado (indicativos de efeitos tipo-ansiolíticos). Não houve diferença nos demais comportamentos (esticada, escalada, enterrada e congelamento). (iii) IHF: houve aumento da expressão de proteína Fos no grupo exposto ao rato uma única vez. (iiii) RT-PCR: Não houve aumento da expressão de CRF1 em nenhum dos grupos. **Conclusão:** resultados indicam que o neurotransmissor CRF parece estar envolvido na expressão de comportamentos relacionados a ansiedade, por sua ligação com o CRF1, no BNST.

Palavras-chave: ansiedade; comportamento; CRF.

Área temática: Neurociências



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

5HT_{1A} INDUCE LONG-TERM SYNAPTIC DEPRESSION IN THE PREFRONTAL CORTEX VIA TREK-1 ACTIVATION

José Francis de Oliveira¹; Guilherme Suigueto Vilar Higa²; Roberto De Pasquale³.

¹Docente – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Brazil

²Pós-Doutorando – Centro de Matemática, Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, Brazil

³Docente – Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, Brazil

Introduction: The prefrontal cortex (PFC) is an important brain area for behaviors such as decision-making, mood and stress responses. PFC dysfunction occur in depression, and serotonin, a neurotransmitter known to be implicated in depression, is able to modulate PFC function. In this area, one of the most expressed serotonergic receptor is 5HT_{1A}, which is coupled G_{ai}. Serotonin may act on potassium channels in neurons, regulating excitability. Knockout animals for a particular potassium channel, called TREK-1, are resilient to depression. Hence, a possible cross-talk between TREK-1 and 5HT_{1A} may be involved in depression physiopathology. **Objectives:** Investigate if 5HT_{1A} induce changes in synaptic plasticity in the PFC via activation of TREK-1. **Materials and Methods:** We used maternal separation as a rat depression model (Approved by Animal Ethics Committee CEUA 54/2016, USP) and forced swim test (n=25) to assess behavioral outcomes, in both sexes. Using brain slice electrophysiology, we patched PFC layer V pyramidal neurons to investigate the impact of 5HT_{1A} on synaptic plasticity, in control and depressive-like rats (n>20 cells in each group). **Results:** Our model was able to induce depressive-like behavior in both sexes at adulthood, but only females were affected at juvenile age. Activation of 5HT_{1A} is enough to induce a long-term synaptic depression (LTD) in both control and depressive-like animals. Next, we evaluate if these 5HT_{1A}-induced LTD could require TREK-1 function. Applying the TREK-1 specific blocker spadin previous to 8-OH-DPAT, a known 5HT_{1A} agonist, resulted in no LTD. **Conclusions:** 5HT_{1A} receptors do not play a role on modulation of PFC synaptic plasticity in depression, and females may be more vulnerable to early maternal separation. However, 5HT_{1A} it is able to induce LTD in the PFC via increased activation of TREK-1 channels. Thus, both TREK-1 and 5HT_{1A} may have important roles in modulation of synaptic plasticity at the PFC.

Keywords: prefrontal cortex; 5HT_{1A}; TREK-1.

Grants: FAPESP 2016/09116-0, CAPES 001

Area: Neurosciences



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AÇÃO NEUROPROTETORA E MODULADORA DA MICROBIOTA INTESTINAL DA *Ginkgo biloba* E *Centella asiatica* EM RATAS WISTAR OVARIETOMIZADAS

Juliana Aparecida Fernandes¹; Kamila Ferreira Barbosa²; Mariana Felgueira Pavanelli³; Lilian Brites Campos Shimada⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Bacharel em Farmácia pelo Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR

³Docente de Graduação em Farmácia e Biomedicina, Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR

⁴Docente de Graduação em Medicina, Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR

Introdução: A deficiência estrogênica pode influenciar o funcionamento gastrointestinal e microbiota do indivíduo. **Objetivo:** Este estudo avaliou os efeitos do tratamento com *Ginkgo biloba* (EGb) ou *Centella asiatica* (ECa) sob a população neuronal entérica e de *Lactobacillus* sp. na microbiota de ratas ovariectomizadas (OVX). **Material e métodos:** Após aprovação pela Comissão de Ética (CEUA nº 5034/2019), utilizou-se 21 ratas Wistar (150-160 g) aleatoriamente divididas nos seguintes grupos (n = 5-6): controle (*sham*; CT), OVX, OVX+ECa (500 mg/kg) e OVX+EGb (500 mg/kg). Os animais OVX foram tratados por gavagem durante 6 semanas e, ao término, realizou-se a eutanásia e a coleta do intestino delgado e fezes. A análise microbiológica foi realizada em ágar Rogosa (37°C por 72 horas), seguida por coloração de gram e prova da catalase para confirmação do gênero *Lactobacillus*. Porções do duodeno, jejuno e íleo foram fixadas, dissecadas para exposição do plexo mioentérico e submucoso e processadas para coloração de Giemsa. A quantificação dos neurônios foi realizada em 50 campos (aumento 400x) em microscópio óptico. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA one-way), seguido do pós-teste de Newman-Keuls (Graphpad Prism 5.0), nível de significância de 5%. **Resultados:** O número de neurônios nos dois plexos reduziu significativamente no grupo OVX em comparação ao grupo CT. Enquanto que, os grupos OVX+EGb e OVX+ECa apresentaram reversão total na perda neuronal induzida pela ovariectomia em todos os fragmentos avaliados. A população de *Lactobacillus* sp. foi reduzida nos animais OVX, porém os resultados não foram significativos. Por outro lado, exclusivamente no grupo OVX+ECa observou-se reversão significativa da perda da microbiota induzida pela deficiência estrogênica. **Conclusão:** Portanto, foi possível observar que o tratamento com ECa promoveu crescimento de *Lactobacillus* sp. e ambos os fitoterápicos apresentaram ação neuroprotetora sobre a população total de neurônios entéricos nos dois plexos em ratas OVX.

Palavras-chave: intestino delgado; sistema nervoso entérico; deficiência estrogênica.

Área temática: Neurociências



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

LABELING DENSITY OF PERINEURONAL NET IN EXTRINSIC INNERVATION OF MICE DISTAL COLON

Matheus Deroco Veloso da Silva¹; Paulo da Silva Watanabe²; Camila Regina Basso²; Joyce Hellen Ribeiro Dionísio²; Fábio Goulart de Andrade³; Debora de Mello Gonçalves Sant' Ana⁴; Rubina Aktar⁵; L. Ashley Blackshaw⁶; Eduardo José de Almeida Araújo⁷

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Docente – Departamento de Histologia, Laboratório de Análise Histopatológica, Universidade Estadual de Londrina

⁴Pós-doutoranda em Neurociências, Laboratório de Neurociência Entérica, Queen Mary University of London, Londres/Reino Unido

⁵Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Departamento de Neurogastroenterologia, Laboratório de Neurociência Entérica, Queen Mary University of London, Londres/Reino Unido

⁷Docente – Departamento de Histologia, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina

Introduction: In the central nervous system the extracellular matrix (ECM) around specific populations of neurons can become highly specialized. In this situation, ECM assumes an appearance similar to that of a network, being called the perineuronal network (PNN). PNN gives neurons protection against molecules in inflammatory situations, in addition to controlling plasticity and participating in physiological processes. We previously described the presence of RPN in the dorsal root ganglia (DRG) and in the extrinsic innervation of the distal colon of mice, but there are no reports of the density of this network in this region. **Objective:** To identify the density of RPN in the extrinsic innervation of the distal colon of mice and to identify possible differences between these two regions. **Material and methods:** DRG's (L6/S1) and the respective splanic nerve fragments were collected from five C57/BL6 mice (CEUA/UEL 032/2015). The tissues were frozen and sectioned in cryostat (10 μ m), then were subjected to immunofluorescence using anti-PGP9.5 and *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA) in order to visualize neurons and PNN. Ten images per animal were captured and analysed using the ImageJ software. **Results:** 80% of the DRG neurons were positive for WFA labeling, which had 2.31x10⁴ pixels/cm² (If hypothetically 100% of the neurons were positive: 2.8888x10⁴ pixels/cm²). Besides, the splenic nerve extensions showed 100% positive labeling for WFA corresponding to 3.0447x10⁴ pixel intensity/cm². **Conclusion:** The difference between the intensity of the WFA labelling indicates that splanic nerve extensions show more condensed network in relation to the DRG. It suggests that PNN is extremely important for the process of conducting afferent information from the distal colon to DRGs.

Palavras-chave: extracellular matrix; innervation; perineuronal net.

Financiador (es): CNPq

Área temática: Neurociências



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO EM INDIVÍDUOS COM A DOENÇA DE PARKINSON EM LONDRINA – PARANÁ

Thiago Hissnauer Leal Baltus¹; Nayara Rampazzo Morelli¹; Carine Coneglian de Farias¹; Kleber Paiva Trugilo²; Nádia Calvo Martins Okuyama²; Karen Brajão de Oliveira³; Lucio Baena de Melo⁴; Suhaila Mahmoud Smaili⁵; Décio Sabbatini Barbosa⁶

¹Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina

²Acadêmico do Departamento de Patologia Geral/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

³Docente do Departamento de Patologia Geral/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina

⁴Docente do departamento de Clínica Médica/Setor de Neurologia, Universidade Estadual de Londrina

⁵Docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação/Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual de Londrina

⁶Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina

Introdução: A Doença de Parkinson (DP) é causada pela destruição progressiva de neurônios dopaminérgicos, resultando em sintomas motores debilitantes. Até o momento, estudos identificaram mutações genéticas responsáveis pelos casos hereditários da doença, porém, pouco se sabe sobre alterações genéticas de elementos que possam exercer influência indireta. O estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN) desempenha papel singular no desenvolvimento da DP, de forma que a avaliação de biomarcadores genéticos que modulem o EO/EN possam representar nova abordagem sobre a doença. **Objetivo:** Avaliar os polimorfismos genéticos *NFkB1* (rs28362491) e *NFkBIA* (rs696) e biomarcadores de EO/EN em indivíduos com a DP e controles livres de doença. **Material e métodos:** O estudo caso-controle foi aprovado pelo CEP da UEL (nº1.819.877). O grupo caso foi composto por 55 pacientes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário e do Ambulatório de Fisioterapia Especializado em DP da UEL, e o grupo controle composto por 55 indivíduos saudáveis de diversas regiões de Londrina. Amostras foram obtidas por punção venosa. Foram doseados níveis séricos de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), produtos de oxidação proteica (AOPP), metabólitos do óxido nítrico (NOx), grupamentos sulfidríla (SH), atividade da paraoxonase-1 (PON-1) e a capacidade antioxidante total (TRAP) por técnicas espectrofotométricas. Os polimorfismos genéticos foram avaliados por reação em cadeia da polimerase com digestão enzimática para identificação dos genótipos e foram testados modelos codominante, dominante e recessivo. Os testes de Kolmogorov/Levene, Teste t, Análise de Variância/Tukey, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis/Dunn e regressão logística binária foram usados quando apropriados. **Resultados:** Não houve diferença na distribuição dos polimorfismos entre grupos. Nos pacientes, o genótipo deleção/deleção do polimorfismo *NFkB1* foi associado a níveis elevados de SH e LOOH, e o genótipo combinado AA + AG do polimorfismo *NFkBIA* foi associado a níveis elevados de NOx. **Conclusão:** Apesar de não estarem diretamente associados à doença, polimorfismos genéticos podem influenciar o EO/EN na DP.

Palavras-chave: doença de parkinson; polimorfismo genético; estresse oxidativo.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação Araucária

Área temática: Neurociências

The background of the page is a light blue color with a series of darker, flowing, curved lines that create a sense of movement and depth. The lines are most prominent in the upper left and right corners, curving towards the center.

Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

REDUÇÃO DE FIBRAS ELÁSTICAS NA TELA SUBMUCOSA DO DUODENO DE RATOS SUBMETIDOS A INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Aline Rosa Trevizan¹; Mariana Buranelo²; Lainy Leiny de Lima³; Maria José Pastre⁴; Eduardo José de Almeida Araújo⁵; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁶

¹Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁶Docente – Pró-Reitora de Extensão e Cultura, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A ingestão de alimentos contendo oocistos de *Toxoplasma gondii* causa a toxoplasmose. A transposição desse parasito pelo intestino pode causar alterações teciduais. As fibras elásticas são componentes da matriz extracelular do intestino e conferem maior deformabilidade e resistência ao órgão. **Objetivo:** Analisar as fibras elásticas da tela submucosa do duodeno de ratos submetidos a infecção aguda por *T. gondii*. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (parecer n° 079/2013). Utilizamos 40 ratos *Wistar* com 60 dias de idade (n=5), distribuídos em grupo controle (GC) que recebeu solução salina e grupos infectados por 6 (G6), 12 (G12), 24 (G24), 48 (G48) e 72 horas (G72); 7 (G7d) e 10 dias (G10d) que receberam 5000 oocistos esporulados (cepa ME-49) por via oral. Foi realizada a eutanásia desses animais e os duodenos foram coletados, fixados em paraformaldeído tamponado a 4%, incluídos em parafina e cortados em micrótomo para obtenção de cortes transversais semi seriados de 4 µm. Foi realizada a coloração de Fucsina-Resorcina de Weigert Modificada e por meio de imagens (16 imagens, objetiva de 40x) foi mensurada a área ocupada por fibras elásticas na tela submucosa, utilizando o software Image-Pro Plus. A análise estatística foi feita no programa Bioestat 5.3 e os resultados expressos como média ± desvio padrão. O nível de significância foi 5%. **Resultados:** Observou-se redução da área ocupada por fibras elásticas em todos os grupos infectados (G6: 5,89 ± 2,79; G12: 3,73 ± 1,76; G24: 4,28 ± 2,35; G48: 4,11 ± 1,51; G72: 3,41 ± 1,57; G7d: 3,51 ± 1,68; G10d: 4,47 ± 1,51 µm²), quando comparados ao GC (7,27 ± 2,63 µm²). **Conclusão:** A infecção aguda por *T. gondii* provoca redução de fibras elásticas submucosas do duodeno de ratos, sugerindo alteração na composição da matriz extracelular.

Palavras-chave: intestino delgado; matriz extracelular; toxoplasmose.

Financiador (es): CAPES, Fundação Araucária

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO CRÔNICA POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* CAUSA ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA DOS NEURÔNIOS MIENTÉRICOS DO ÍLEO DE HAMSTERS

Amanda Gubert Alves dos Santos¹; Stéfani Bueno Panza²; Lainy Leiny de Lima³; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes⁴; Thaís Gomes Verzignassi Silveira⁴; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁵; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁴

¹Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR; Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Doutora em Biologia da Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Em infecções pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB), já foram descritas alterações intestinais, apesar desta ser uma das principais causadoras de leishmaniose tegumentar. Foi observado o aumento de vilos, criptas e camadas musculares, além da presença de ganglionite em gânglios do sistema nervoso entérico, que é responsável pelas principais funções intestinais. **Objetivo:** Avaliar os neurônios do plexo mientérico de hamsters infectadas por diferentes cepas de LVB. **Material e métodos:** Aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (7587260416). Foram utilizadas 12 hamsters fêmeas, separadas em 3 grupos (n=4): grupo controle (GC); grupo infectado com MHOM/BR/1975/M2903 (2903), considerada padrão; grupo infectado com MHOM/BR/2009/3476 (3476), isolada de um paciente atendido pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da UEM, que desenvolveu lesões atípicas e teve uma difícil resposta terapêutica. Os grupos infectados receberam uma suspensão de 2×10^7 promastigotas de cada cepa no dorso da pata traseira esquerda e no GC, 100 μ l de tampão fosfato salino estéril. Após 90 dias, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e o íleo coletado. Após dissecação, o plexo mientérico foi corado pela técnica de Giemsa e imagens foram capturadas (objetiva de 100X) para a mensuração das áreas do pericário, núcleo e citoplasma de 100 neurônios/animal. A quantificação neuronal foi realizada em 50 campos microscópicos (objetiva de 40X). A normalidade dos dados foi constatada pelo teste D'Agostino-Pearson, seguido de análise de variância ANOVA, teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** Não houve alterações quantitativas, contudo, na análise morfométrica observamos que a área do pericário, núcleo e do citoplasma dos neurônios do grupo 3476 ($236,30 \pm 66,32 \mu\text{m}^2$; $83,08 \pm 24,99 \mu\text{m}^2$; $153,20 \pm 53,26 \mu\text{m}^2$; respectivamente) sofreram uma redução significativa quando comparados ao controle ($285,50 \pm 85,18 \mu\text{m}^2$; $114,60 \pm 34,79 \mu\text{m}^2$; $170,90 \pm 61,10 \mu\text{m}^2$). **Conclusão:** A infecção crônica por uma cepa de LVB considerada atípica reduziu a morfometria dos neurônios do plexo mientérico de hamsters.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana; intestino delgado; sistema nervoso entérico.

Financiador (es): CNPq e CAPES – código de financiamento 001.

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE DA CONTAGEM DE CÉLULAS TGF- β IMUNORREATIVAS NO DUODENO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Bárbara Cipulo Legabão¹; Maria José Pastre²; Aline RosaTrevizan³; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente do Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose. A principal via de infecção é a ingestão de alimentos contaminados por oocistos do parasito que ao transpor a barreira intestinal causa inflamação no epitélio. O TGF- β é uma citocina inflamatória produzida por células epiteliais e células imunes do intestino. **Objetivo:** Quantificar as células produtoras de TGF- β no duodeno de ratos submetidos a infecção aguda por *Toxoplasma gondii*. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob protocolo 013/2013. Utilizamos 40 ratos Wistar com 60 dias de idade (n=5), distribuídos em grupo controle (GC) e grupos inoculados por *T. gondii* mantidos por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10d), que receberam 5000 oocistos esporulados do parasito por via oral. Os animais foram mortos, os duodenos coletados e fixados em paraformaldeído a 4%, embebidos em parafina e cortados em micrótomo na espessura de 4 μ m. Esses cortes foram desparafinizados e submetidos à técnica imunohistoquímica de marcação do TGF- β . Para cada animal, foram capturadas 16 imagens do duodeno utilizando câmera digital acoplada a um microscópio óptico. Nas imagens foram contadas todas as células TGF- β imunorreativas da tela submucosa e da túnica mucosa do duodeno pelo programa Image Pro Plus. A análise estatística foi feita no programa Bioestat 5.0 e os resultados foram apresentados pela média \pm desvio padrão com nível de significância de 5%. **Resultados:** Observamos aumento significativo de células TGF- β imunorreativas no grupo com 12 horas de infecção (57,89 células/mm² \pm 22,16) em relação ao GC (27,19 células/mm² \pm 13,43). **Conclusão:** A infecção aguda por *T. gondii* causa aumento nas células TGF- β imunorreativas no duodeno de ratos após 12 horas de infecção.

Palavras-chave: Toxoplasmose; sistema digestório; inflamação.

Financiador (es): Fundação Araucária

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COOPERATIVE ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES AND ANTIPARASITIC DRUGS AGAINST *Giardia intestinalis* IN VITRO

Bruna Sabatke¹, Lucimara Cordeiro², Marcel Ivan Ramirez^{2,3}

¹Postgraduate Student (Master) in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR

²Professor – Department of Biochemistry, Universidade Federal do Paraná

³Professor – Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz

Introduction: *Giardia intestinalis* is an eukaryotic flagellate protozoan causative agent of giardiasis, a disease known as traveler diarrhea, distributed throughout the world. The parasite colonizes the human intestinal tract, adhering to intestinal cells causing damage to the epithelium and, along with other mechanisms still unknown, cause diarrhea. Conventional treatment of the disease is carried out with metronidazole or albendazole. However, these agents are associated with adverse side effects and resistance of parasites. For these reasons, the search for new drugs and combinations that limit toxicity and increase efficiency is constant. Recently, several studies have shown that polysaccharides have gastroprotective effects. Polysaccharides are polymers of high molecular weight, and differ in structure and function, being widely extracted from vegetables and fruits. **Objective:** To evaluate the synergism of the combination of polysaccharides and antiparasitic drugs, in the efficiency and toxicity on the treatment of *Giardia intestinalis*. **Material and methods:** Polysaccharides extracted from chamomile (SMRW), AX-TUCUM (FTS-SF) and passion fruit (FMS-HG) were tested. Caco-2 cells were pretreated with 250µg/mL of polysaccharides for 1h at 37°C. Subsequently, 1x10⁶ trophozoites of *Giardia intestinalis* were added and incubated for 1h at 37°C. Adherence was quantified by counting non-adhered parasites in Neubauer chamber. **Results:** There was a decrease in adhesion in cells that were treated with polysaccharides extracted from chamomile tea (SMRW). Preliminary synergism studies involving treatment with polysaccharides and albendazole show a higher efficiency in the giardicide effect. Assays will be repeated to determine change in IC₅₀ when using the polysaccharide combination and antiparasitic compounds. **Conclusion:** The “combination polysaccharide” and drugs could have an effect on the decrease in the adhesion of parasites to cells, having higher efficiency and lower toxicity than antiparasitic drugs alone, and can be used as a new strategy for the treatment of giardiasis.

Keywords: *Giardia intestinalis*; host cell parasite interaction; polysaccharides.

Thematic area: Parasitology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

A INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* E O TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea* NÃO CAUSAM ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE MASTÓCITOS 5-HT-IR NO ÍLEO DE RATOS WISTAR

Claudia Nara de Almeida Lino Bratti¹; Maria José Pastre²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

³Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: O protozoário *Toxoplasma gondii* invade a barreira intestinal para se disseminar pelo organismo do hospedeiro, ocasionando intensa resposta inflamatória. As opções de tratamento para a toxoplasmose são escassas e podem ser deletérias ao paciente. A planta *Echinacea purpurea* (EP) tem sido estudada como uma nova opção terapêutica. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com EP sobre os mastócitos imunorreativos para serotonina (5-HT-IR) do íleo de ratos infectados por *T. gondii*.

Material e métodos: Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEM (nº 7633021018). Foram utilizados 20 ratos Wistar (n=5) distribuídos em: Grupo Controle (GC), Grupo Infectado (GI), Grupo Controle Tratado (GC-EP) e Grupo Infectado Tratado (GI-EP). Os ratos dos grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com 100 mg/kg de EP, por gavagem, 28 dias antes e 28 dias depois da infecção dos animais. Os ratos dos grupos GC e GI receberam somente água fervida. Os grupos infectados receberam 500 oocistos esporulados da cepa RH de *T. gondii*. Ao fim do período experimental, os animais foram eutanasiados, segmentos do íleo coletados e submetidos à rotina histológica. Cortes transversais semi-seriados de 4 µm foram utilizados na imunohistoquímica para marcação dos mastócitos 5-HT-IR e quantificação em 50 campos microscópicos (objetiva de 40X). Os dados foram considerados normais pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação foi realizada pelo teste de ANOVA seguido de Tukey, sendo representados por média ± desvio padrão por mm² da mucosa do íleo. Foi considerado significativo p<0,05. **Resultados:** Não foram observadas alterações na contagem de mastócitos 5-HT-IR em nenhum dos grupos. **Conclusão:** A resposta ileal à infecção pela cepa RH de *T. gondii* não depende do aumento dos mastócitos 5-HT-IR e o tratamento com EP (100 mg/kg) não altera esta resposta no modelo experimental utilizado.

Palavras-chave: intestino delgado; toxoplasmose; terapêutica.

Financiador (es): CAPES e CNPq

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

TERAPIA ALTERNATIVA PARA TRATAMENTO DE CAMUNDOGOS SWISS NATURALMENTE INFECTADOS COM *Giardia muris*

Cristiane Maria Colli¹ Caroline Rodrigues de Almeida²; Renata Coltro Bezagio³; Liara Izabela Lopes Romera²; Mônica Lúcia Gomes⁴

¹Bioquímica – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/Pr

³Doutora em Ciências da Saúde, UEM, Maringá/PR

⁴Docente, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UEM, Maringá/Pr

Introdução: *Giardia muris* é um dos patógenos mais frequentes do trato gastrointestinal de roedores, podendo desencadear resposta inflamatória e alterações em modelo experimental murino. **Objetivo:** Propor uma terapia alternativa às quimioterapias convencionais para o tratamento de camundongos swiss machos naturalmente infectados pelo protozoário *G. muris*. **Material e métodos:** Aprovado pelo CEUA/UEM, parecer nº 8792240818. Foram comparadas as atividades giardicida do Metronidazol (MT), Fembendazol (FB), Metronidazol associado ao Sulfadimetoxina (MtS) e Chá preto (CPR) (*Camellia sinensis*). Os animais foram divididos em seis grupos (CPR, MtS, CPR/MtS, FB/MT, MT e Controle não tratado-GC) com cinco animais cada. O tratamento foi realizado por via intragástrica, por 7 dias 1x/dia e os animais do grupo GC receberam apenas água. Os experimentos foram conduzidos de forma cega, controlada, randomizada e repetido uma vez com o mesmo número de animais. A detecção de *G. muris* e o controle de cura foram realizados por exame parasitológico (método de Faust) e molecular (PCR) das fezes e pela pesquisa de trofozoítos na mucosa intestinal. Parâmetros clínicos (peso, consumo de água, ração e eliminação de excretas) também foram avaliados. Os dados foram analisados utilizando *Two-way* ANOVA. **Resultados:** Nos animais dos grupos MtS e CPR/MtS resultados negativos foram observados após 4º dia de tratamento, e nos animais do grupo CPR após o 7º dia. Os grupos FB/MT, MT e GC eliminaram cistos até o 7º dia de avaliação. Os animais do grupo GC apresentaram diminuição no consumo de ração e redução de peso ($P < 0,0001$) quando comparados com os dos demais grupos. O consumo de água em GC foi menor ($P < 0,0001$) em relação a CPR, CPR/MtS e MT. **Conclusão:** Apesar do tratamento com *Camellia sinensis* eliminar a infecção mais tardiamente do que MtS e CPR/MtS, pode ser uma estratégia promissora e mais segura, por ser um composto natural sem efeito colateral aparente.

Palavras-chave: giardíase; tratamento farmacológico; *Camellia sinensis*.

Financiador (es): CAPES

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

***Blastocystis hominis*: RELAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA E SINTOMAS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS**

Fernanda Pereira Rigon¹; Veridiana Lenartovicz Boeira²

¹Farmacêutica Residente em Análises Clínicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel/PR.

²Docente, Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Introdução: As parasitoses intestinais são consideradas um problema de saúde pública no Brasil, tendo o *Blastocystis hominis* como um dos parasitos mais encontrados em amostras fecais humanas.

Objetivo: Dentre os exames parasitológicos realizados em pacientes hospitalizados, buscou-se determinar a frequência de infecções por *B. hominis* em pacientes com exame parasitológico positivo, analisando concomitantemente a associação aos sintomas característicos da blastocistose.

Material e Métodos: Mediante a um estudo transversal, retrospectivo e descritivo entre o período de janeiro de 2014 a dezembro de 2018, foi realizada uma coleta de dados utilizando prontuários eletrônicos de pacientes internados em um hospital universitário localizado no oeste do Paraná, utilizando o sistema eletrônico Tasy® como ferramenta de apoio, revisando os pacientes em sua totalidade com parasitismo exclusivo ou não para *B. hominis*. Dentre os que apresentaram positividade dos exames, foram considerados os que obtiveram parasitismo confirmado do parasita em questão, sendo analisada a descrição da sintomatologia apresentada pelos pacientes, bem como os resultados característicos da amostra, os quais foram tabulados no programa Excel®. O projeto teve autorização do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos parecer 2.748.340, sendo dispensado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. **Resultados:** Totalizaram-se 74 (31,09%) amostras positivas para *B. hominis* e 164 (68,91%) amostras positivas para outros parasitos. Considerando as 74 amostras dos pacientes que apresentaram positividade para *B. hominis*, 26 (35%) estavam relacionados a sintomas característicos da blastocistose incluindo diarreia, dores abdominais, febre, náuseas e vômito, sendo pouco significativo. **Conclusão:** A frequência de infecções por *B. hominis* foi considerada relevante e mesmo a presença do parasito sendo pouco associada aos sintomas característicos desta parasitose, denota-se a importância da realização de diagnósticos laboratoriais com a inclusão de técnicas na rotina que possibilitem a detecção do parasita.

Palavras-chave: *Blastocystis hominis*; diarreia; trato gastrointestinal.

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

IDENTIFICAÇÃO ENTEROPARASITÁRIA DE DUAS LINHAS DO TRANSPORTE COLETIVO DA CIDADE DE MARINGÁ, PARANÁ

Giovanna Souza de Cristo¹; Débora Toribio Carvalho Costa¹; Marielle Priscila de Paula Silva-Lalucci²

¹Acadêmicas de Graduação em Biomedicina, Universidade Cesumar (UNICESUMAR), Maringá/PR.

²Docente – Departamento de Biomedicina, Universidade Cesumar (UNICESUMAR), Maringá/PR.

Introdução: As enteroparasitoses são consideradas um grave problema de saúde pública e possuem alta prevalência no Brasil. O transporte público conta como uma importante fonte de contaminação por esses agentes infecciosos, dada à alta taxa de movimentação diária de passageiros. Na cidade de Maringá, 98% da população é beneficiada com saneamento básico. Apesar disso, a literatura identifica a presença de enteroparasitas mais comuns na cidade como *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e *Endolimax nana*. **Objetivo:** Avaliar a contaminação enteroparasitária nos veículos do sistema de transporte coletivo da cidade de Maringá/PR, identificando cistos de protozoários e ovos de helmintos. **Material e métodos:** A coleta foi realizada em Julho/2019 utilizando dois métodos, o método de Graham, que consiste em aderir sobre o local de coleta fita adesiva transparente e fixar sobre uma lâmina de vidro e o método a fresco, que consiste na leitura do sedimento da coleta com swabs umedecidos em NaCl 0.9% nos locais de coleta e fixados sobre uma lâmina com uma gota de lugol, as leituras foram analisadas em microscópio óptico Nikon®, em objetivas de 10x e 40x. Os dados foram tabelados em programa Microsoft Excel® 2016 para obtenção da média dos achados. **Resultados:** De um total de 44 amostras obtidas, os resultados indicam a contaminação de 9,09% dos veículos analisados. Foram observados cistos sugestivos de *Giardia lamblia* (4,55%), *Entamoeba coli* (2,27%) e *Endolimax nana* (2,27%). **Conclusão:** Os resultados dependem das condições socioeconômico-sanitárias da população. Apesar do percentual identificado não ter valor estatístico, o estudo indicou a contaminação do transporte coletivo. Portanto, torna-se imprescindível a higienização das mãos para prevenção e controle da disseminação parasitária, além da limpeza dos transportes públicos e educação sanitária para reduzir a incidência de microrganismos causadores de doenças na população.

Palavras-chave: educação em saúde; enteropatias parasitárias; saúde pública.

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CHARACTERIZATION OF ANTI-*Trichomonas vaginalis* ACTIVITY OF 1,10 PHENANTHROLINE -5,6-DIONE (PHENDIONE) AND METAL DERIVATIVES

Graziela Vargas Rigo¹; Brenda Petro-Silveira²; André Luis Souza dos Santos³; Tiana Tasca⁴

¹Graduate Student (Doctorate) in Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

²Undergraduate Student in Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

³Professor in Universidade Federal do Rio de Janeiro

⁴Professor in Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introduction: Trichomoniasis is a non-viral sexually transmitted infection caused by protozoan *Trichomonas vaginalis*, associated with the acquisition and transmission of HIV. Management of infection occurs through 5-nitroimidazole drugs, metronidazole and tinidazole; however, treatment failures are associated with increase in metronidazole resistance (2.5 to 10%) and allergic reaction. Phendione bound or not to metals such as copper (Cu²⁺) and silver (Ag⁺) have been investigated due to potential antimicrobial activity. Considering the high impact of trichomoniasis, it is important to search new therapeutic agents for the treatment of this infection. **Objective:** The aim of this study was to characterize anti-*T. vaginalis* activity of phendione and metal derivatives. **Materials and Methods:** Minimum inhibitory concentration (MIC) and the concentration required to kill 50% (IC₅₀) of parasites (ATCC 30236 and three fresh clinical isolates) or cells (tumoral HMVII and no tumoral lineage of 3T3-C1 and erythrocytes) were performed using an eightfold serial dilution (50 to 0.39 μM) of phendione, Ag-phendione and Cu-phendione. Kinetic assay was performed at MIC and IC₅₀ values, with counts performed at 2 until 72 h. Compounds cytotoxicity was evaluated by MTT assay and hemolysis (CAAE 69979817.5.0000.5347) was spectrophotometrically analyzed by the measure of hemoglobin released. **Results:** The results revealed a potent anti-*T. vaginalis* activity of the compounds against ATCC 30236, TV-LACM15, TV-LACM22, and TV-LACH4. Geometric mean (μM) of Cu-phendione (MIC=8.84, IC₅₀=0.87) demonstrated trichomonocidal activity with lower concentrations than that presented by metronidazole, drug of choice for the treatment (MIC=9.71, IC₅₀=1.64). *In vitro* assays with erythrocytes and cell lineage showed low cytotoxicity, and Cu-phendione had a high selectivity index (SI=11), demonstrating superior specificity to the parasite than the human cells. Moreover, 4 h were sufficient to observe significant differences in trophozoite proliferation. **Conclusions:** These results highlight the importance of these phendione and metal derivatives as molecules of pharmaceutical interest.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; metallodrugs; metronidazole.

Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Marine Biotechnology Program, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) PRONEM, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Thematic area: Parasitology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITOS DA INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* SOBRE OS MASTÓCITOS DO ÍLEO DE HAMSTERS DOURADOS

Isabela Alessandra Mariano¹, Beatriz Fonseca Ferreira², Daniele Stefanie Sara Lopes Lera³, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴, Maria Valdrinez Campana Lonardoni⁵, Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁵

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: O intestino é um órgão essencial para a regulação imunológica do organismo. Estudos têm demonstrado alterações intestinais decorrentes de infecções por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB). Esta espécie causa a forma muco-cutânea da leishmaniose e se encontra amplamente distribuída pelo Brasil. Deste modo o objetivo deste estudo foi analisar os mastócitos do íleo de hamsters infectados por LVB no tempo de 8 semanas. **Material e métodos:** Aprovação do comitê de ética CEUA/UEM nº 3062060916. Os animais do grupo infectado (GI) receberam 10⁵ promastigotas de da cepa MHOM/BR 2314 de LVB na pata anterior direita, e o grupo controle (GC) recebeu 100µl de tampão fosfato. Foi coletado 1 cm do íleo de todos os animais e fixado em paraformaldeído 4% tamponado. Depois de fixados, diafanizados e embebidos em parafina, os segmentos foram cortados transversalmente de forma semi-seriada em 4 µm para realização da coloração de Azul de Toluidina. Foram contados em microscopia óptica os mastócitos totais presentes na túnica submucosa da porção ileal totalizando 100 campos microscópicos (100x) em 4 cortes histológicos de cada animal. Cada campo microscópico corresponde à área de 9,96mm², cujo valor foi convertido para expressão dos resultados por mm². Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel®) e analisados estatisticamente e considerados de distribuição normal utilizando o teste de D'Agostino-Pearson. Os dados foram apresentados pela média ± desvio padrão e comparados entre os grupos pelo teste *t* de Student. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% com 95% de confiança. Para tal, utilizou-se o software GraphPad Prism 5.01. **Resultados:** Não foram observadas alterações significativas no número de mastócitos do GI (783,5±172,5) se comparados ao GC (877,5±107,4). **Conclusão:** A infecção por LVB não alterou significativamente o número de mastócitos no íleo de hamsters em oito semanas de infecção.

Palavras-chave: imunidade nas mucosas; leishmaniose; histologia.

Financiador (es): CNPq, Fundação Araucária.

Área temática: Parasitologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

***Trypanosoma cruzi* SECRETES EXTRACELLULAR VESICLES DURING INFECTION THAT ACT AS MODULATORS OF THE HOST'S IMMUNE SYSTEM**

Izadora Volpato Rossi¹; Maria Alice Ferreira Nunes²; Carolina Verónica Poncini³; Marcel Ivan Ramirez^{4,5}

¹PhD student of Cell and Molecular Biology, State University of Paraná. Curitiba/PR - Brasil

²Master student of Cell and Molecular Biology, State University of Paraná. Curitiba/PR - Brasil

³Principal investigator of Microbiology and Medical Parasitology Institute (IMPam-CONICET), Buenos Aires University. Buenos Aires, Argentina

⁴Principal investigator of Biochemistry and Molecular Biology, State University of Paraná. Curitiba/PR - Brasil

⁵Principal investigator of Oswaldo Cruz Institute. Rio de Janeiro/RJ – Brasil

Introduction: Chagas' disease is caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi*, which has a complex biological cycle. To succeed the infection, *T. cruzi* releases extracellular vesicles, that are small vesicles composed of a lipid bilayer. Our group have shown the release of EVs during the interaction between the parasite and host cells promotes complement system inhibition and increases the invasion of metacyclic forms to cells in early stages of the infection. **Objective:** Here, our aim was to understand the secretion of EVs by different stages of the parasite in during the interaction with mammalian cells and how these EVs could manipulate host immune system. **Material and methods:** CL Brener and Dm28 strains of *T. cruzi* epimastigotes were differentiate to metacyclic forms (METAs) by a nutrient starvation process and tissue-culture derived trypomastigotes (TCT) were obtained from supernatant of infected VERO cells monolayers. To induce EVs secretion, the different stages from the parasites were exposed to THP1 or VERO cells. Subpopulations of EVs were isolated by differential centrifugation method (large and small EVs). **Results:** We have seen a greater induction of the release of EVs by TCTs compared to METAs during the interaction with THP1 cells. The two subpopulations of EVs were differentially secreted from the parasites and had different features. Moreover, it was seen that EVs from different strains were capable of inducing a cytokine response in dendritic cells, acting as communicators during the infection and modulating the immune system. **Conclusion:** The infectious stages of *T. cruzi* have different capacities to induce the release of EVs and can act in the modulation of the host's immune system. The next steps of this work are to understand if EVs from METAs or TCTs plays different roles, since different infectious forms face different scenarios during the infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; extracellular vesicles; host-parasite interaction.

Funding Institution: Capes/CNPQ

Thematic area: Parasitology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

O USO DE *Echinacea purpurea* EM RATOS COM INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* AUMENTA O NÚMERO DE MASTÓCITOS NA PRÓSTATA DORSOLATERAL

Julia Calvi Mori¹; Maria José Pastre²; Jaqueline de Carvalho Rinaldi³; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁵.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O uso de extratos de plantas com atividade imunomoduladora tem-se destacado no tratamento de doenças infecciosas. Objetivo: Assim, este trabalho avaliou o impacto do tratamento com *Echinacea purpurea* (*E. purpurea*) e Pirimetamina sobre a população de mastócitos totais da próstata dorsolateral (PDL) de ratos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*. **Material e métodos:** Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - 7633021018. 36 *Rattus norvegicus* machos, com 33 dias pós-natal, foram distribuídos nos grupos (n=6): Grupo Controle (GC); Grupo Infectado (GI); Grupos Controle e Infectado tratados com Pirimetamina (GC-P e GI-P); Grupos Controle e Infectado tratados com *E. purpurea* (GC-EP e GI-EP). Os animais infectados receberam 500 oocistos esporulados de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, genótipo I) por gavagem. O GC-EP e GI-EP foram tratados com 100mg/kg de extrato de *E. purpurea*, 28 dias antes e após a infecção, por via oral. Já o GC-P e GI-P receberam 12,5 mg/kg de Pirimetamina 28 dias após a infecção, por via oral. Após a eutanásia, as amostras foram dissecadas, processadas e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados com azul de toluidina para a contagem dos mastócitos totais em microscópio óptico na objetiva de 100x (área 0,996 mm²). Foram contados todos os mastócitos corados presentes em 100 campos microscópicos, sendo os dados expressos em número de mastócitos por mm² (média ± erro padrão). A análise estatística foi realizada no GraphPad Prisma® 5 usando o teste Anova (p<0,05). **Resultados:** Os diferentes tratamentos não influenciaram no peso corpóreo ou da PDL. O GI-EP (257±28) e GI (216±53) apresentaram aumento significativo da população de mastócitos totais comparados ao GC (63±7). Já os demais grupos não apresentaram diferença estatística. **Conclusão:** O tratamento com *E. purpurea* aumentou o número de mastócitos totais na PDL de ratos com infecção crônica por *T. gondii*.

Palavras-chave: toxoplasmose; sistema reprodutor; imunomodulação.

Financiador (es): CAPES, CNPq

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATIVIDADE *IN VITRO* DO ELETROFIO CONTENDO ANFOTERICINA B E GLUCANTIME® SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania sp.*

Lais Maria Barazzetti Pereira da Silva¹; Alliny Ayumi Yoshida Yamada²; Meliana Borilli³; Daiany Helscher da Silva⁴; Douglas Cardoso Dragunski⁵; Izabel Galhardo Demarchi⁶; Jorge Juarez Vieira Teixeira⁷; Mariana de Souza Terron Monich⁸

¹Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo/PR

⁵Docente - Departamento de Química, UNIOESTE, Toledo/PR

⁶Docente - Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

⁷Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁸Docente - Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Pode apresentar-se nas formas clínicas tegumentar ou visceral e é considerada pela OMS como uma das mais importantes doenças infecciosas de distribuição mundial. Sua terapia convencional apresenta alta toxicidade e diversos efeitos colaterais, justificando a busca de alternativas terapêuticas, como a utilização de tecnologias para a liberação gradativa de fármacos. A eletrofação é um ótimo método de liberação de fármacos para a terapia de doenças de difícil e longo tratamento, pela facilidade de utilização e o ótimo custo-benefício. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do eletrofio de acetato de polivinila (PVA) impregnado com Glucantime® sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis (LLa)*. **Material e métodos:** A fase logarítmica de crescimento dos parasitos foi determinada pela avaliação da curva de crescimento, em que a quantidade de parasitos em cultura foi contada em câmara de Neubauer por 7 a 9 dias, partindo de 1×10^6 parasitos/mL. Em seguida foi avaliada a ação leishmanicida do Glucantime eletrofiado (1000, 500 e 250 µg/mL) ou livre (10 mg/mL a 15 µg/mL) contra promastigotas de *LLa*, utilizando o teste de redução do XTT. **Resultados:** De acordo com as curvas de crescimento, a fase exponencial dos parasitos é atingida em média após 3 ou 4 dias de cultivo. Os ensaios com Glucantime® eletrofiado ou livre, mostraram não haver efeitos leishmanicidas *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, o eletrofio de PVA sem incorporação de fármacos não se mostrou prejudicial para as formas promastigotas. **Conclusão:** o Glucantime eletrofiado não tem efeito em formas promastigotas do parasito, entretanto o PVA se mostrou um veículo promissor para terapia contra leishmaniose. A ação do glucantime eletrofiado deve ser avaliada sobre as formas amastigotas do parasito, uma vez que é a forma presente durante a infecção.

Palavras-chave: *Leishmania*; polivinil; Glucantime®.

Financiador (es): O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PERFIL DE IL-10 E IFN γ EM GESTANTES EM DIFERENTES FASES CLÍNICAS DA TOXOPLASMOSE

Letícia Nishi¹; Cristiane Maria Colli²; Fernanda Ferreira Evangelista³; Ana Gabriela Gomes Ferrari Strang³; Priscilla de Laet Santana⁴; Ana Lúcia Falavigna-Guilherme⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Bioquímica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: Na toxoplasmose gestacional, a imunomodulação pode ser modificada, podendo favorecer mecanismos de escape aos patógenos, possibilitando a transmissão fetal. A interleucina-10 (IL-10) está relacionada ao controle do processo inflamatório, enquanto que a citocina pró-inflamatória interferon-gama (IFN γ) está relacionada à defesa contra *Toxoplasma gondii*. Todavia, esta em dosagens elevadas pode proporcionar níveis de citotoxicidade de células NK decíduais, podendo gerar resultados anormais e complicações na gravidez devido à infecção. **Objetivo:** Comparar as citocinas IL-10 e IFN γ no líquido amniótico (LA) e soro de gestantes em diferentes fases clínicas da infecção da toxoplasmose. **Material e métodos:** Aprovado no Comitê de ética CAAE: 09286918.5.0000.0104. Foram coletadas amostras de soro de gestantes atendidas no Hospital Universitário de Maringá, sendo 20 amostras de gestantes em fase aguda da infecção por *T. gondii* (IgM e IgG reagentes, baixa avides), 20 gestantes em fase crônica (IgG reagente, alta avides) e 20 gestantes sem toxoplasmose (IgM e IgG não reagentes). Das gestantes em fase aguda foram coletadas amostras de LA. As citocinas foram quantificadas por ELISA. Os resultados foram analisados por Teste T de Student e Mann-Whitney. **Resultados:** Os níveis de IL-10 no soro de gestantes soronegativas ($58,52 \pm 9,252$) foram maiores do que em gestantes na fase crônica ($52,55 \pm 6,589$) ou na fase aguda ($56,27 \pm 6,624$), a diferença foi significativa entre os dois primeiros grupos. Os níveis de IFN γ em gestantes em fase aguda ($29,00 \pm 15,25$), crônica ($33,61 \pm 28,79$) ou sem a doença ($29,79 \pm 19,16$) não foram diferentes entre eles. Não houve diferença entre os níveis de IL-10 e IFN γ observados no soro e LA de gestantes em fase aguda. **Conclusão:** O IFN γ não apresentou diferenças entre os grupos de gestantes. Os níveis sorológicos de IL-10 foram menores nas gestantes infectadas, indicando que neste grupo a resposta imune tenha menor influência da citocina anti-inflamatória (IL-10), o que pode favorecer o controle do parasito.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; citocinas; gravidez.

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea* ALTERA O NÚMERO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES EM RATOS INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii*

Luana Vitoria de Araujo Duarte¹; Claudia Nara de Almeida Lino Bratti²; Maria José Pastre³; Amanda Gubert Alves dos Santos³; Débora de Mello Gonçales Sant'Ana⁴; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁵

¹Acadêmica de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

⁵Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns em todo o mundo. No entanto, suas opções de tratamento são limitadas e podem causar danos ao hospedeiro. A planta *Echinacea purpurea* (EP) vem sendo estudada como novo método terapêutico. **Objetivo:** Realizar contagem global e diferencial de leucócitos de ratos tratados com EP e/ou infectados por *Toxoplasma gondii*. **Material e métodos:** Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEM (nº 7633021018). Foram utilizados 16 ratos Wistar, oito deles receberam durante 28 dias, por gavagem, um pré-tratamento de 30 mg/kg de EP e os demais, água fervida. Após o pré-tratamento, 4 animais tratados e 4 não tratados foram infectados com 500 oocistos da cepa RH de *T. gondii*, formando: Grupo Controle (GC), Grupo Infectado (GI), Grupo Controle Tratado (GC-EP) e Grupo Infectado Tratado (GI-EP). Cinco dias após a infecção, o tratamento foi realizado novamente por 28 dias. Ao fim do período experimental, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado via retro-orbital. Foi realizada contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer e de leucócitos diferenciais em extensão sanguínea corada com May-Grünwald-Giemsa. Os dados foram considerados normais pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação foi realizada pelo teste ANOVA seguido de Tukey, sendo representados por média \pm desvio padrão por mm³ de sangue. $p < 0,05$ foi considerado significativo. **Resultados:** Redução dos leucócitos totais e células mononucleadas no GC-EP ($5850 \pm 935,4$ mm³; $4246 \pm 782,3$ mm³, respectivamente) em relação ao GC (9000 ± 2718 mm³; 6219 ± 1096 mm³, respectivamente) e nos animais infectados, observou-se um aumento nas células mononucleadas do GI-EP (6316 ± 1217 mm³) quando comparados ao GC-EP. **Conclusão:** O tratamento com EP pode ter causado a diminuição dos leucócitos, contudo, a infecção por *T. gondii* juntamente com o tratamento podem ter acarretado o aumento de mononucleados.

Palavras-chave: glóbulos brancos; toxoplasmose; terapia.

Financiador (es): CAPES e CNPq

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO CRÔNICA POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* ALTERA AS FIBRAS COLÁGENAS DO ÍLEO DE HAMSTERS

Maria Gabriela Lima da Silva¹; Amanda Gubert Alves dos Santos²; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes³, Thaís Gomes Verzignassi Silveira³, Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴, Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

³Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) causa leishmaniose tegumentar, entretanto existem relatos de alterações em órgãos, como o intestino. A camada submucosa da parede intestinal é formada principalmente por fibras colágenas, que são modificadas em resposta a inflamação local. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da infecção por LVB sobre o colágeno no íleo de hamsters. **Material e métodos:** O Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da UEM aprovou este trabalho (7587260416). Utilizamos 24 hamsters que foram agrupados em quatro grupos (n=6): dois grupos controles e os demais foram infectados pela cepa MHOM/BR/2003/2311 de LVB. A eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico após 90 e 120 dias de infecção sendo coletado 1 cm do íleo para histologia. Foram obtidos cortes transversais semi-seriados de 5 μm que foram corados pela técnica de Picosirius. Foram capturadas 16 imagens com uso de microscópio com filtro polarizador para a mensuração de colágeno tipos I e III e 16 imagens sem o polarizador para o colágeno total, estas foram analisadas no software Image-Pro® Plus. Os dados foram considerados livres pelo teste de D'Agostino-Pearson (BioEstat 5.3) e a comparação foi realizada pelo teste T (GraphPad Prism 8.0.1). Estes são apresentados por média \pm erro padrão ($p < 0,05$). **Resultados:** 90 dias após a infecção houve aumento das fibras colágenas totais e diminuição das tipo I e III no grupo infectado (5597 ± 334 ; $568,2 \pm 52,44$; $425,2 \pm 49,29 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo controle ($4253 \pm 347,9$; $1117 \pm 101,3$; $696,1 \pm 96,13 \mu\text{m}^2$). Contudo, ao compararmos o grupo infectado ($2789 \pm 242,2$; $756,8 \pm 66,8 \mu\text{m}^2$) ao controle ($4678 \pm 379,2$; $1168 \pm 128,7 \mu\text{m}^2$) após 120 dias de infecção, observamos uma diminuição das fibras colágenas totais e tipo I. **Conclusão:** A infecção crônica por LVB causa alterações nas fibras colágenas no íleo de hamsters.

Palavras-chave: leishmaniose; colágeno; intestino delgado.

Financiador (es): CNPq e CAPES

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea* PROVOCAM AUMENTO DE MASTÓCITOS SEROTONINÉRGICOS NO JEJUNO DE *Rattus norvegicus*

Maria José Pastre¹; Henrique Cazanti Sona²; Claudia Nara de Almeida Lino Bratti³; Lainy Leiny de Lima⁴; Aline Rosa Trevizan⁵; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁶; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁷.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Pós-doutoranda em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁷Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório. Quando ingerido, o oocisto desse protozoário eclode no trato digestório e origina formas infectantes que transpõem a barreira intestinal e disseminam-se pelo organismo do hospedeiro, provocando uma resposta inflamatória. A *Echinacea purpurea* é considerada imuno-estimulante e anti-inflamatória. **Objetivo:** Investigar os efeitos da infecção crônica por *T. gondii* e do tratamento com *Echinacea purpurea* sobre os mastócitos 5HT imunorreativos (IR) do jejuno de ratos. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA-UEM (nº7633021018). Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus*, *Wistar*, machos (n=6), distribuídos em GC (Grupo controle), GI-NT (Grupo infectado e não tratado), GC-EP100 (Grupo controle tratado) e GI-EP100 (Grupo infectado e tratado). Os ratos dos grupos GC-EP100 e GI-EP100 foram tratados com 100 mg/kg *Echinacea purpurea* antes e depois da data da inoculação dos grupos infectados diariamente por via oral por 28 dias. Os ratos dos grupos GC e GC-INT receberam água fervida pela mesma via. Os grupos infectados foram inoculados com 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH) por via oral. Os ratos foram submetidos a eutanásia e os jejunos foram retirados e fixados. Cortes transversais semi-seriados de 4 µm foram submetidos a imunohistoquímica para evidenciar as células que expressam serotonina. Quantificou-se os mastócitos 5HT-IR presentes em 50 campos microscópicos aleatórios com o auxílio de um microscópio óptico com lente objetiva de 40x. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo ANOVA ($p < 0,05$) com o Software GraphPad Prism 5.01. **Resultados:** Os grupos GI-NT ($26,20 \pm 4,836$ mastócitos/mm²), GC-E100 ($23,43 \pm 1,935$ mastócitos/mm²) e GI-EP100 ($25,18 \pm 7,459$ mastócitos/mm²) apresentaram aumento significativo na quantidade de mastócitos 5HT-IR em relação ao GC ($11,97 \pm 0,9130$ mastócitos/mm²). **Conclusão:** A infecção crônica por *T. gondii* e o tratamento com *Echinacea purpurea* provocam aumento de mastócitos 5HT-IR no jejuno de ratos.

Palavras-chave: intestino delgado; serotonina; toxoplasmose.

Financiador (es): CAPES e CNPq.

Área temática: Parasitologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE DE CÉLULAS CALICIFORMES NO DUODENO DE *Rattus norvegicus* SUBMETIDOS A INFEÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATADOS POR *Echinacea purpurea*

Mariana Buranelo¹; Maria José Pastre²; Claudia Nara de Almeida Lino¹; Lainy Leiny de Lima³; Aline Rosa Trevisan⁴; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A transmissão do *Toxoplasma gondii* ocorre principalmente pela ingestão de alimentos com oocistos que no intestino precisam transpor a barreira intestinal e podem provocar alterações teciduais e inflamação. Já a *Echinacea purpurea* tem potencial imunestimulante e anti-inflamatório.

Objetivo: Quantificar as células caliciformes no duodeno de *Rattus norvegicus* infectados cronicamente por *T. gondii* e tratados com *Echinacea purpurea*. **Material e métodos:** O experimento foi aprovado pelo CEUA-UEM (nº7633021018). Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* machos (n=6), distribuídos em GC (Grupo controle), GI-NT (Grupo infectado e não tratado), GC-EP100 (Grupo controle tratado) e GI-EP100 (Grupo infectado e tratado). Os ratos dos grupos GC-EP100 e GI-EP100 foram tratados com 100 mg/kg *Echinacea purpurea* via oral antes e depois da data da inoculação dos grupos infectados por 28 dias. Os grupos infectados foram inoculados com 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH) via oral. Os ratos foram submetidos a eutanásia e os duodenos retirados. Foi realizado o processamento histológico e a coloração de Periodic acid shiff (PAS) para evidenciar as células caliciformes que secretam mucinas neutras e sialomucinas lábeis. A contagem foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 40x. Os cortes foram divididos em quatro quadrantes e quantificadas 160 células epiteliais e dentre estas as células caliciformes. A análise estatística foi realizada no Software GraphPad Prism 5.01. **Resultados:** O grupo GI-NT apresentou menor número de células caliciformes ($9,52 \pm 0,81$ células caliciformes/100 células epiteliais) em relação ao GC ($12,49 \pm 0,56$ células caliciformes/100 células epiteliais) ($p < 0,05$). A comparação entre os grupos GC-EP100 ($10,99 \pm 1,01$ células caliciformes/100 células epiteliais) e GI-E100 ($10,99 \pm 0,39$ células caliciformes/100 células epiteliais) não apresentou alterações significativas ($p > 0,05$). **Conclusão:** A infecção crônica por *T. gondii* provoca redução de células caliciformes no duodeno de ratos e o tratamento por *Echinacea purpurea* não causa alterações.

Palavras-chave: intestino delgado; células caliciformes; toxoplasmose.

Financiador (es): CAPES e CNPq.

Área temática: Parasitologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

IN VITRO EFFECTS OF GLUCANTIME® INCORPORATED IN PVA BY ELECTROSPINNING ON AMASTIGOTE FORMS OF *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Meliana Borilli Pereira¹; Laís Maria Barazzetti Pereira da Silva²; Mariana de Souza Terron Monich^{3,4}; Daiany Helscher da Silva⁵; Thaís Gomes Verzignassi Silveira⁶; Maria Valdrinez Lonardoní⁶; Douglas Cardoso Dragunski⁷; Izabel Galharo Demarchi^{6,8}

¹Master's student in Health Science (PCS), Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR

²Undergraduate student in Biomedicine, UEM, Maringá/PR

³Professor – Department of Basic Health Science, UEM.

⁴PhD Student in Health Science (PCS), UEM, Maringá/PR

⁵Master's student in Chemistry, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo/PR

⁶Professor – Post Graduate Program in Health Science (PCS), UEM, Maringá/PR

⁷Professor – Department of Chemistry, UNIOESTE, Toledo/PR.

⁸Professor – Department of Clinical Analysis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (LC) is a non-contagious infectious disease caused by the *Leishmania* parasite, with an estimated incidence of 1.5 million new cases annually worldwide. The drugs of choice for treatment are pentavalent antimonials, such as Glucantime®. However, such drugs are administered systemically and have significant adverse effects, which can be reduced from a slow-release drug carrier system. **Objective:** to evaluate the *in vitro* effects of Glucantime® incorporated in vinyl poly acetate (PVA) by electrospinning on amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Material and methods:** Macrophages J774A.1 (MØ) were infected with promastigote forms of *L. amazonensis* (LTB0016) (1MØ: 10) and treated with different concentrations of Glucantime® incorporated or not (250 µg/ mL - 1 mg/ mL). After 24h of incubation, the cells were stained with Fast Panoptic and observed under a microscope (100x), and the infection *index* (% of infected MØ multiplied by the mean of amastigote/ cell) was calculated and compared to controls (infected/ untreated MØ and Uninfected/ treated MØ). **Results:** The Glucantime® incorporated by electrospinning showed a greater reduction in the infection *index* (262) of MØ – non-incorporated drug at the same concentration (377) and the non-treated (389). Although the results are promising, the repetition of experiments and statistical analysis are necessary. **Conclusion:** Glucantime® electrospinning incorporation in PVA showed promising *in vitro* results as a new drug delivery system for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*; nanocarrier; Meglumine Antimoniate.

Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Thematic area: Parasitology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS DE ROTINA QUANTO À RECUPERAÇÃO DE CISTOS DE *Giardia duodenalis*

Renata Coltro Bezagio¹; Cristiane Maria Colli²; Liara Izabela Lopes Romera³; Caroline Rodrigues de Almeida³; Érika Cristina Ferreira¹; Mônica Lúcia Gomes⁴

¹Doutora em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

²Farmacêutica Bioquímica - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: *Giardia duodenalis*, agente etiológico da giardíase, é um parasito cosmopolita que acomete o trato gastrointestinal de mamíferos, inclusive do homem. A baixa eliminação de cistos nas fezes por alguns indivíduos infectados dificulta a detecção desse parasito, tornando importante a escolha de um método parasitológico capaz de diagnosticar também esses casos. **Objetivo:** Comparar a recuperação de cistos de *G. duodenalis* obtidos pelos métodos de concentração mais utilizados na rotina laboratorial. **Material e Métodos:** Amostras de fezes com alta, média e baixa concentração de cistos de *G. duodenalis*, determinadas pela contagem em câmara de Neubauer, foram processadas pelos métodos de Lutz (sedimentação em água), Faust (centrífugo-flutuação em sulfato de zinco) e Ritchie modificado com substituição do formol pela água destilada (centrífugo-sedimentação). Os experimentos foram realizados em triplicata. Amostras clínicas (15) foram também processadas para a validação dos resultados experimentais, após consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro Universitário Integrado - Campo Mourão/Paraná (parecer nº 1.594.078). Os resultados foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** O método de Ritchie modificado recuperou 40,5% e 96,4% mais cistos/grama de fezes em relação aos métodos de Faust e Lutz em alta; 53% e 96,2% em média e 63% e 100% em baixa concentração de cistos, respectivamente. Os métodos de Faust e Ritchie modificado recuperaram significativamente mais cistos em amostras com baixa ($p = 0,0241$), média ($p = 0,0265$) e alta ($p = 0,0265$) concentração em relação ao de Lutz. O resultado das amostras clínicas foi semelhante, validando os resultados experimentais. **Conclusão:** O método de Ritchie modificado mostrou-se mais adequado, por recuperar maior quantidade de cistos independentemente da concentração, seguido pelo de Faust, sendo o método de Lutz inapropriado para o diagnóstico dessa parasitose.

Palavras-chave: giardíase; diagnóstico; carga parasitária.

Financiador: Programa de Apoio à Pós Graduação - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROAP - CAPES)

Área temática: Parasitologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ENTEROPARASITOSE EM ESCOLARES INDÍGENAS NO SUL DO BRASIL ANTES E APÓS TRATAMENTO EM MASSA

Veridiana Lenartovicz Boeira¹; Cristiane Maria Colli²; Fernanda Pereira Rigon³; Eloiza Cristina Martelli⁴; Max Jean de Ornelas Toledo⁵.

¹Pós graduanda (Doutorado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR. Docente – Curso de Farmácia Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel/PR

²Bioquímica Departamento de Análises clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Pós Graduanda (Residência Farmacêutica) em Análises clínicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel/PR

⁴Pós Graduanda (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel/PR

⁵Doutor em Parasitologia. Docente – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A administração em massa de medicamentos de amplo espectro busca reduzir a prevalência e a intensidade de infecção por parasitas intestinais, sendo uma medida de controle adotada em populações de risco. **Objetivo:** Avaliar a prevalência de parasitoses intestinais em escolares de aldeia indígena Guarani no Sul do Brasil, antes e após tratamento em massa com anti-helmíntico. **Material e métodos:** Pesquisa aprovada através do Parecer 1.756.060/2016-CONEP condicionada a participação por Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelos pais ou responsáveis. O universo amostral do estudo foi constituído por 396 escolares entre 5 e 19 anos, matriculados em escola indígena. Realizou-se dois inquéritos coparassitológicos, sendo um inicial e um de monitoramento, para avaliar o efeito da medida de controle aplicada. As amostras fecais coletadas foram processadas e analisadas utilizando os métodos de análise parasitológica direto, flutuação em solução de sulfato de zinco e sedimentação espontânea em água. A leitura das lâminas foi realizada por microscopia em aumento de 10X e 40X. O antiparasitário Albendazol (ABZ) foi administrado pela equipe de saúde local em dose única de 400 mg e após 90 dias nova dose foi administrada, segundo protocolo adotado como alternativa para controle dessas doenças. Trinta dias após a segunda dose de ABZ realizou-se o 2º Inquérito coletando-se novas amostras de fezes dos escolares. Foi utilizado o Teste Z, software Statdisk Versão 8.4, comparando os dados das análises das amostras fecais, considerando os resultados antes e após o uso de antiparasitários na população, com níveis de significância de 5%. **Resultados:** No primeiro inquérito 81,4% das amostras apresentaram-se positivas para enteroparasitos e no segundo, após duas doses de antiparasitário, 87,5% apresentaram-se positivas. **Conclusão:** A frequência de enteroparasitoses em escolares indígenas Guaranis do sul do Brasil foi elevada e não diminuiu após o tratamento em massa da população com anti-helmíntico.

Palavras-chave: população indígena; parasitoses intestinais; tratamento antiparasitário.

Financiadores: PROEXT – Ministério da Educação – Governo Federal do Brasil

Área temática: Parasitologia

The background of the page is a light blue color with a series of darker, flowing, curved lines that create a sense of movement and depth. The lines are most prominent on the left side and curve towards the right.

Patologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÓLON DE RATOS WISTAR INDUZIDOS COM 1,2 DIMETILHIDRAZINA (DMH) E TRATADOS COM *Bifidobacterium animalis*

César Agostinho Ferreira¹; Carla Cristina de Oliveira Bernardo²; Sabrina Silva Sestak²; Lucas Casagrande³; Juliana Vanessa Colombo Martins Perles⁴; Jacqueline Nelisis Zaroni⁴; Tania Cristina Alexandrino Becker⁵

¹Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá.

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Durante a carcinogênese do câncer de colorretal (CCR) ocorre disbiose da microbiota intestinal e formam-se espécies reativas de oxigênio (ERO). Criptas aberrantes (CA) e focos de criptas aberrantes (FCA) no cólon são considerados lesões pré-neoplásicas. O probiótico *Bifidobacterium animalis* atua na modulação da composição da microbiota e na resposta inflamatória durante a carcinogênese do CCR. **Objetivo:** Este estudo objetivou caracterizar o desenvolvimento de CA e FCA na mucosa colônica, por meio de métodos histopatológicos a fim de analisar a ação quimioprotetora do *Bifidobacterium animalis*. **Material e Métodos:** Ratos Wistar foram mantidos no biotério de experimentação animal MUDI (CEUA 1126010419), e distribuídos em 3 grupos experimentais: GI – grupo controle (n=8); GII – grupo induzido com 1,2 – dimetilhidrazina (DMH) (40mg/Kg via ip) (n=8); GIII – grupo induzido com DMH e tratado com *Bifidobacterium animalis* (10mg/Kg por gavagem) (n=8). Analisou-se o cólon dos animais por meio das colorações de azul de metileno (AZ) e Hematoxilina e Eosina (HE). **Resultados:** Com a coloração de AZ observamos que, no grupo GI, não houve desenvolvimento de CA e FCA em nenhuma amostra tecidual. Observou-se no GII e GIII, valores elevados na região proximal e distal, tanto de CA quanto de FCA, em todos os animais. Na avaliação com HE, observamos criptas hiperplásicas em ambas as regiões (proximal e distal) nos três grupos experimentais. Observaram-se lesões displásicas em todas as amostras de tecido dos GII e III. As análises estatísticas realizadas não mostraram efeito significativo do *Bifidobacterium animalis* no controle da proliferação de CA e nos FCA. **Conclusão:** No presente estudo não se observou mudanças significativas indicando efeito antioxidante e quimioprotetor em relação ao CCR do *Bifidobacterium animalis*, nas doses utilizadas. Porém, a análise dos FCA, por serem regiões com elevada atividade proliferativa, constituem-se como ótimos biomarcadores em bioensaios, para avaliação quimiopreventiva de compostos com provável atividade antineoplásica.

Palavras-chave: Focos de Criptas Aberrantes (FCA); 1,2-Dimetilhidrazina (DMH); *Bifidobacterium animalis*.

Financiador (es): CNPq

Área temática: Patologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

IMPLICAÇÕES DAS MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS* E *EGFR* NO CÂNCER COLORRETAL HUMANO

Mayara Bocchi¹, Glauco Akelinghton Freire Vitiello², Nathália de Sousa Pereira³, Caroline Yukari Motoori Fernandes⁴, Sarah Lott Moretto⁴, Mariana de Oliveira Pinsetta⁵, Luiz Henrique Spolador⁵, Matheus Dominato Munuera⁵, Daniela Rudgeri Derossi⁶, Marla Karine Amarante⁶, Bruna Karina Banin Hirata⁷, Maria Angelica Ehara Watanabe⁷.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Doutor em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁵Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁶Docente – Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁷Docente – Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

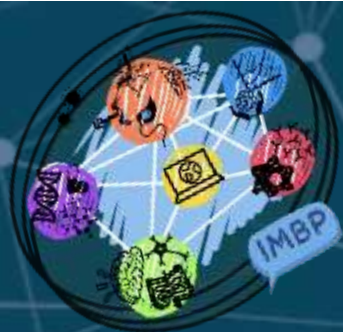
Introdução: Os genes *KRAS* e *EGFR* atuam em vias de crescimento e sobrevivência celular, e mutações somáticas nestes genes são consideradas preditoras de resposta ao tratamento com inibidores no carcinoma colorretal (CCR). Anticorpos monoclonais estão sendo utilizados na imunoterapia do CCR sendo que, um dos principais alvos, o EGFR, está envolvido na tumorigênese. A resposta a essa terapia varia, pois a presença de mutações no gene *KRAS*, torna o tumor resistente à ação de tais anticorpos. **Objetivo:** avaliar mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* e qual sua influência na terapia de pacientes com CCR. **Material e métodos:** Tratou-se de estudo transversal, onde foram avaliados 66 pacientes atendidos no Hospital do Câncer de Londrina, de ambos os sexos (CAAE 73557317.0.0000.5231). A análise das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* foi realizada em amostras de tecidos tumorais em parafina, através da reação em cadeia da polimerase, seguida de digestão enzimática (PCR-RFLP). Os demais parâmetros foram obtidos dos prontuários. **Resultados:** A idade média dos pacientes era de 63 anos ($\pm 12,1$) e 51,5% eram do sexo feminino. A frequência de mutações no gene *KRAS* códon 12 e 13 foram de 40,9% e 31,8%, respectivamente. Para a mutação em *EGFR* códon 21, a frequência foi de 1,5% e não foi verificada mutação para o *EGFR* códon 19. Este estudo indicou uma correlação positiva entre a mutação em *KRAS* códon 13 e estadiamento ($P = 0,031$), e *KRAS* códon 13 e o MSH6 ($P = 0,040$). Em relação às mutações em *KRAS* códon 12, foi verificada uma correlação positiva com a idade ao diagnóstico ($P = 0,006$). **Conclusão:** Embora a ocorrência da mutação no *EGFR* tenha sido baixa, os pacientes com mutação em *KRAS* apresentaram tumores resistentes à ação de anticorpos anti-EGFR, sendo importante o rastreio destas mutações para o tratamento adequado destes pacientes.

Palavras-chave: neoplasia colorretal; mutação; anticorpos monoclonais.

Área temática: Patologia



Pesquisa clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ESCOLHAS ALIMENTARES DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA ATENDIDAS EM UM SERVIÇO DE ONCOLOGIA NA REGIÃO MEIO OESTE DE SANTA CATARINA

Camila Luchesi¹; Antuani Rafael Baptistella²; Carina Rossoni³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

²Docente - Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

³Docente - Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

Introdução: O câncer de mama é o tipo da doença mais comum entre as mulheres no mundo correspondendo a cerca de 25% dos casos novos por ano. Muitos avanços vêm ocorrendo no tratamento do câncer porém, sintomas decorrentes das terapias antineoplásicas contribuem para mudanças nas escolhas alimentares e impactam o estado nutricional. **Objetivo:** Analisar as escolhas alimentares de mulheres com câncer de mama atendidas no serviço de oncologia de um hospital universitário na região meio oeste de Santa Catarina. **Material e Métodos:** Trata-se de um estudo transversal, descritivo, exploratório e quantitativo, realizado com 70 mulheres com câncer de mama com diagnóstico em 2018 atendidas no serviço de oncologia. Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC, sob parecer nº 3.048.131/201. Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos por meio de prontuários e o questionário intitulado Motivos das Escolhas Alimentares, constituído dos fatores relacionados a conveniência, apelo sensorial, conteúdo natural, preço, controle de peso e familiaridade atribuindo-se para cada fator: nada importante; um pouco importante; moderadamente importante e muito importante. **Resultados:** 54% eram casadas, 38,57% tinham ensino fundamental incompleto, 52,85% possuíam renda mensal entre 1 a 3 salários mínimos e IMC médio 28,19 Kg/m². Sobre os motivos das escolhas alimentares 55% acreditam ser muito importante os fatores conveniência, apelo sensorial, conteúdo natural, preço e controle de peso, o fator familiaridade foi considerado moderadamente importante, 32% das mulheres referiram este, como motivos da sua escolha alimentar. **Conclusão:** Houve uma predominância entre as pacientes que realizam as suas escolhas alimentares pelos motivos de conveniência, apelo sensorial, conteúdo natural, preço e controle de peso, as quais impactam no tratamento e evolução da doença.

Palavras-chave: câncer de mama; crenças alimentares; escolhas alimentares.

Financiador (es): UNIEDU/FUMDES

Área temática: Pesquisa Clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INTERVENÇÃO COM ÁCIDO FÓLICO DIMINUI NÍVEL DE BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO E HOMOCISTEÍNA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

Guilherme Martins Porto¹, Andressa Keiko Matsumoto², Ana Paula Michelin², Laura de Oliveira Semeão³, João Victor de Lima Pedrão¹, Walter Sepúlveda-Loyola⁴, Beatriz Suellen Arceni⁵, Estefânia Gastaldello Moreira⁶, Vinicius Daher Alvares Delfino⁷, Décio Sabbatini Barbosa⁸.

¹Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Reabilitação, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁵Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina/PR

⁶Docente do Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁷Docente do Departamento de Medicina Interna, Seção de Nefrologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁸Docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

Introdução: A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública e seu diagnóstico é constatado por uma perda progressiva da função renal por mais de 3 meses, acompanhada por dano estrutural. Os níveis de homocisteína em pacientes com DRC é de 3 a 5 vezes acima da referência, podendo causar danos renais. O estresse oxidativo (EO) consiste no desequilíbrio entre substâncias pró oxidantes e antioxidantes, existindo um aumento de pró-oxidantes, que contribuem com a progressão da DRC. **Objetivo:** Avaliar o impacto da suplementação de ácido fólico nos níveis de homocisteína e biomarcadores de EO em pacientes com DRC em estágios não-dialíticos. **Material e métodos:** Ensaio Clínico aleatorizado, aprovado por comitê de ética CAAE 63097216.1.0000.5231 e composta por 113 pacientes com DRC estágios não dialíticos (3 e 4), alocados em um grupo intervenção (ácido fólico 5mg/d por 3 meses consecutivos) ou em um grupo sem intervenção ativa (grupo controle). Amostras de sangue foram coletadas para as análises de homocisteína e biomarcadores de EO, sendo, hidroperóxidos lipídicos (LOOH), expressos em unidades relativas de luz (URL) e a capacidade antioxidante total plasmática (TRAP). O teste t de Student foi empregado utilizando o programa SPSS versão 24, e os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$, expressos em média e erro padrão. **Resultados:** No grupo intervenção, houve aumento nos níveis de ácido fólico pós tratamento ($37,228 \pm 3,11$ ng/mL) comparado com basal ($8,799 \pm 0,41$ ng/mL). Houve diminuição nos níveis séricos de homocisteína e LOOH após intervenção ($15,672 \pm 0,62$ ($\mu\text{mol/L}$) / $1,286 \pm 0,63$ (URL), respectivamente) em relação aos níveis pré-tratamento ($17,873 \pm 0,77$ ($\mu\text{mol/L}$) / $1,521 \pm 0,90$ (URL), respectivamente). Não houve feitos significativos nos níveis de TRAP. **Conclusão:** A suplementação com 5 mg de ácido fólico em pacientes com DRC não dialíticos reduziu os níveis de LOOH e homocisteína. O benefício apresentado na concentração da medicação utilizada sugere ser um tratamento complementar e seguro.

Palavras-chave: doença renal crônica; ácido fólico; estresse oxidativo.

Área temática: Pesquisa Clínica



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *Rhodiola rosea* L. EM PRATICANTES DE ATIVIDADE FÍSICA

Lara Elis Freitas Leitão¹; Larissa Jorge Coelho²; Dafne Nayara Quinta Barbosa¹; Maria Laura Martins³; Andreia Cristina Travassos da Costa⁴; Klismam Marques dos Santos³; Guilherme Nobre Lima do Nascimento⁵

¹Acadêmica de Graduação em Nutrição, Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS).

²Mestra em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS).

³Acadêmico(a) de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS).

⁴Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS).

⁵Docente, Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LaCiBS).

Introdução: A *Rhodiola rosea* L. é uma planta amplamente distribuída em toda a Europa e Ásia, predominante em regiões árticas e montanhosas, sua ação terapêutica se dá à presença de 28 compostos bioativos, que possuem ação antidepressiva, anti-fadiga, cognitivo-potenciadora, hepatoprotetora, anti-alérgica, anti-inflamatória, antioxidante e anti-envelhecimento. **Objetivo:** Avaliar a eficácia da utilização via oral do extrato seco padronizado da *R. rosea*, por praticantes de atividade física. **Material e métodos:** O projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram submetidos e aprovados sob número 2.891.986, pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos Universidade Federal do Tocantins. A pesquisa tratou-se de um ensaio clínico randomizado duplo cego controlado, contou com 25 voluntários, 12 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, entre 20 e 40 anos, divididos aleatoriamente em 2 grupos. A amostra A, correspondia ao tratamento com o amido, a amostra B continha extrato seco de *R. rosea*. Todos os voluntários foram submetidos à aferição da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após o exercício. A avaliação da glicemia capilar e lactato foram realizados após a atividade física. Para avaliação dos dados, utilizou-se o software Graph Pad Prism 6.0, e para análise descritiva, ANOVA e teste de Tukey. **Resultados:** Não foi possível observar variação no peso dos participantes, e variações expressivas de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca entre os dias iniciais e finais de cada fase do tratamento. A exposição a *R.rosea* não causou modificações relevantes nos níveis glicêmicos, no entanto, gerou significativa variação nos valores de lactato. Não foram encontradas variações significativas, na avaliação do esforço percebido pela escala de Borg. **Conclusão:** A suplementação com a *R. rosea* pode ser útil em práticas de atividades esportivas, principalmente em esportes de resistência, a fim de neutralizar alterações fisiológicas.

Palavras-chave: *Rhodiola rosea* L.; ensaio clínico; exercício físico.

Financiador (es): PROPESQ/UFT e CNPq.

Área temática: Pesquisa Clínica.



Saúde coletiva



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PERFIL E FATORES ASSOCIADOS ÀS DISLIPIDEMIAS EM HIPERTENSOS E DIABÉTICOS ACOMPANHADOS PELA ATENÇÃO PRIMÁRIA EM VIÇOSA/MG

Eunice Ferreira da Silva¹, Rosângela Minardi Mitre Cotta², Tiago Ricardo Moreira³

¹Acadêmica de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.

²Docente, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa.

³Docente, Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa.

Introdução: As dislipidemias relacionam-se a eventos cardiovasculares. Estimar os padrões das dislipidemias é essencial para o planejamento de ações de saúde, melhorando a qualidade de vida da população. **Objetivo:** Investigar o perfil e fatores associados às dislipidemias em hipertensos e/ou diabéticos acompanhados pela Atenção Primária em Viçosa/MG. **Materiais e métodos:** Estudo transversal (parecer 1203173/2015) realizado com 841 participantes cujos dados foram coletados entre agosto/2017 e abril/2018 em 16 unidades de saúde de Viçosa/MG. Analisaram-se variáveis sociodemográficas, antropométricas, clínicas e bioquímicas. Considerando-se os triglicerídeos e as frações LDL e HDL-colesterol, as dislipidemias foram classificadas segundo a Diretriz Brasileira de Dislipidemias (2017). As variáveis foram analisadas descritivamente e a normalidade dos dados testada com Kolmogorov-Smirnov. As associações entre as variáveis categóricas foram verificadas pelo teste Qui-quadrado e para as numéricas utilizou-se ANOVA ou Kruskal-Wallis. Fixou-se nível de significância de 95%. **Resultados:** Observou-se um predomínio de mulheres (62,7%), aposentados (48,2%), vivendo com companheiro(a) (62,4%), idade média de 62 anos e 4 anos de estudo. A minoria (33,7%) se declarou branca, fumante (11,8%), usuária de bebida alcoólica (27,0%), com história de infarto do miocárdio (5,4%), acidente vascular cerebral (6,4%) e doença renal crônica (15,4%). A maioria foi classificada com sobrepeso/obesidade (65,6%), nas faixas de risco das relações cintura-estatura (90%) e cintura-quadril (68,7%) e com perímetros da cintura aumentados (93,74±11,31cm). As medianas da glicemia e HbA1c foram 98,0mg/dL e 6,0%, respectivamente. Cerca de 54,5% dos pacientes possuíam dislipidemias; 7,6% diabetes; 56,8% hipertensão e 35,6% hipertensão e diabetes, fazendo uso de hipolipemiantes (28,2%), anti-hipertensivos (73,1%) ou hipoglicemiantes (32,2%). As dislipidemias associaram-se com alterações bioquímicas e antropométricas: relações cintura-estatura/quadril de risco, índice de massa corporal >27Kg/m², perímetros da cintura >91cm, HbA1c >6,0% e glicemia >100,0mg/dL. **Conclusão:** As dislipidemias associaram-se significativamente às relações cintura-estatura e cintura-quadril de risco, sobrepeso/obesidade, perímetros da cintura aumentados, hemoglobina glicada e glicemia alteradas.

Palavras-chave: dislipidemias; hipertensão; diabetes mellitus.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Área temática: Saúde Coletiva.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONSUMO E CONVÍVIO COM OUTRAS PESSOAS NO ABANDONO DO TABACO

Gabrielly Torres da Silva¹; Miyoco Massago²; Patrícia Sayuri Nagamatsu³; Idalina Dair Regla Carolino⁴; Celso Ivan Conegero⁵.

¹Graduanda do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá.

²Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá.

³Graduanda do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente do curso de Medicina, Universidade Estadual de Maringá.

⁵Docente do departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: Desde o ano de 2002 o Ministério da Saúde oferece o tratamento gratuito aos fumantes visando conter a expansão do tabagismo. Entretanto, existem diversos fatores que influenciam na cessação do vício. **Objetivo:** Avaliar a influência do tempo de consumo e convívio com outras pessoas em casa no abandono do tabaco pelos pacientes atendidos por um “Projeto Tabagismo: Tratamento e Acompanhamento de Usuários de Tabaco de Maringá e Região”. **Material e Métodos:** Este centro de tratamento segue o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (triagem seguida de quatro sessões estruturadas e três de manutenção). Desta forma, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo os Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (parecer nº 856.316/14), no presente estudo inicialmente foram analisados todos os prontuários dos pacientes atendidos pelo referido projeto nos anos de 2015 a 2019 para a coleta dos dados. Em seguida, as informações obtidas foram subdivididas em aquelas obtidas dos prontuários de pacientes que pararam (grupo 1) e dos que não pararam de fumar (grupo 2), para a análise dos parâmetros descritos anteriormente. **Resultados:** Dos 247 pacientes, 109 pertenciam ao grupo 1 e o restante (138) ao 2. O tempo médio de tabagismo foi de $29,8 \pm 13,9$ anos para o primeiro grupo e $29,5 \pm 13,6$ anos para o segundo. Além disso, exceto por um dos fumantes (1%), todos os indivíduos do grupo 1 residiam com mais pessoas. Enquanto que no segundo grupo, apenas 93% (10/138) tinham este convívio. **Conclusão:** O tempo de consumo médio apresentou pouca variação entre os grupos, porém o convívio com outras pessoas foi maior naqueles que pararam de fumar, indicando que o apoio de pessoas próximas exerce um papel importante no abandono do tabaco.

Palavras-chave: tratamento; tabagismo; convívio.

Área temática: Saúde coletiva



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

COVID-19 – O USO DAS TECNOLOGIAS DIGITAIS E DA TELEMEDICINA: UMA DISCUSSÃO SOBRE SEGURANÇA DE DADOS E ASPECTOS BIOÉTICOS

Karen Derussi de Souza¹; Elcio Luiz Bonamigo²

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC.

²Docente - Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC.

Introdução: A Doença de Coronavírus 2019 (COVID-19) em junho de 2020 já infectou mais de 7 milhões de pessoas e desencadeou mais de 400.000 mortes no mundo. As Tecnologias Digitais e a Telemedicina, são ferramentas velozes utilizadas na pandemia, porém, há impasses quanto à segurança e bioética dos dados armazenados. **Objetivo:** O objetivo da pesquisa foi discutir se o armazenamento e compartilhamento de dados digitais de sujeitos positivos para a COVID-19, podem garantir segurança e aspectos bioéticos. **Material e métodos:** Foi realizada revisão sistemática nas bases de dados BVS e OMS, em 8 de junho de 2020, com busca pelos descritores “infecções por coronavirus” and “confidencialidade”. Foram encontrados 9 artigos completos, e selecionados seis com resumos pertinentes à pesquisa. **Resultados:** As Tecnologias Digitais e a Telemedicina têm ampla abrangência na pandemia, da tele-triagem ao telemonitoramento, que enfrentam incertezas na proteção de dados. Na Nigéria, o rastreamento e vigilância de pacientes exige consentimento destes pelo Regulamento Nacional de Proteção de Dados, o que os favorece a autonomia. Ainda, na Alemanha, Áustria e Itália, a autonomia é garantida pelo Regulamento Geral da Proteção de Dados, permitindo que pacientes limitem informações. A coleta e o processamento de dados exige o princípio da proporcionalidade, limitando-se a dados necessários e de justificativa científica. No entanto, aos sujeitos positivos, sigilo e confidencialidade de dados são relativos. Os médicos têm o dever ético de proteger o paciente, assim como aos demais membros da sociedade, devendo notificá-los aos órgãos responsáveis. O compartilhamento de dados dos sujeitos positivos, é necessário para rastrear, controlar e aprimorar ações no mundo todo. Os Registros Eletrônicos de Saúde armazenam informações garantindo segurança e princípios bioéticos. **Conclusão:** Conclui-se que as Tecnologias Digitais e a Telemedicina podem oferecer segurança e princípios bioéticos no armazenamento e compartilhamento de dados digitais, sendo ferramentas necessárias às ações globais.

Palavras-chave: infecções por coronavírus; telemedicina; bioética.

Área temática: Saúde Coletiva



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

O CUIDADO DE ENFERMAGEM AO PACIENTE OBESO NORTEADO PELOS DIAGNÓSTICOS E INTERVENÇÕES DE ENFERMAGEM

Larissa Millnitz¹; Jhemily Barreto de Oliveira¹; Wanderson Rocha Oliveira²; Márcio Fraiberg Machado³

¹Graduanda em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

²Enfermeiro, Pós-Graduando em Enfermagem e as Patologias, Faculdade Metropolitana de São Paulo

³Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

Introdução: A obesidade tornou-se um problema de saúde pública em âmbito mundial. Sua prevalência concentra-se em adultos na idade de 25 a 44 anos, e embora tenha sua determinação pelo fator genético-hereditário, há forte influência do estilo de vida individual. Neste sentido, destaca-se as ações do enfermeiro como agente promotor em Saúde na conscientização e fortalecimento das decisões pessoais para diminuição de casos. **Objetivo:** identificar os diagnósticos e intervenções de enfermagem que podem ser utilizados durante a assistência ao paciente obeso. **Material e métodos:** Estudo exploratório-descritivo, de abordagem qualitativa, revisão sistemática de literatura. Realizadas buscas nas bases de dados CAPES, LILACS e SciELO. Foram excluídos trabalhos publicados em período inferior a 2014, que fossem fotocópias e não disponível em português. **Resultados:** A literatura evidencia que o paciente obeso apresenta solidão, baixa autoestima, desconfortos respiratórios, dificuldades no sono, além de riscos aumentados para doenças cardiometabólicas. O enfrentamento da obesidade depende do comprometimento nutricional, reorganização dos hábitos de vida e apoio social. Estas características, observadas pelo NANDA (North American Nursing Diagnosis Association) identificam os diagnósticos: mobilidade física prejudicada, manutenção ineficaz da saúde, baixa autoestima situacional, fadiga, estilo de vida sedentário e comportamento de saúde propenso a risco. As principais intervenções apontadas pelo NIC (Nursing Interventions Classification) são: promoção de exercício físico, motivação para controle alimentar, envolvimento familiar, redução da ansiedade, melhora da autopercepção, apoio a tomada de decisão, controle de peso e encorajamento da auto responsabilidade. A literatura apresenta ações profissionais voltadas à promoção de saúde, corroborando com as intervenções de enfermagem. **Conclusão:** Considerando os impactos da obesidade na qualidade de vida do paciente, inferimos a necessidade de o enfermeiro realizar suas intervenções de forma sistemática, proporcionando dessa forma maior segurança ao paciente e contribuindo para a autonomia profissional. Dessa forma poderá exercer seu papel no cuidado integral ao paciente com obesidade.

Palavras-chave: obesidade; qualidade de vida; educação em saúde.

Área temática: Saúde Coletiva



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

A INSERÇÃO DA BIOÉTICA NO SERVIÇO SOCIAL

Lindsai Angela Sozin¹; Bruno Rodolfo Schlemper Junior²; Sirlei Favero Cetolin²; Elcio Luiz Bonamigo²

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

²Docente da Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

Introdução: O Serviço Social é permeado por conflitos morais relacionados à Bioética, mas, a priori, esta disciplina não está presente na formação e nas discussões da categoria. Por se tratar de profissão que requer olhar multidisciplinar, a Bioética pode contribuir para que o Assistente Social aprimore sua capacidade de leitura e compreensão da realidade. **Objetivo:** Analisar se a Bioética está presente nas discussões da categoria e se, como disciplina, está disponível na formação do Assistente Social durante a graduação e pós-graduação. **Material e métodos:** Tratou-se de pesquisa quali-quantitativa, realizada nas bases de dados Medline, Scielo, Lilacs, Periódicos Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), website “Google”. Pesquisou-se os currículos dos 32 cursos de Graduação em Serviço Social cadastrados na ABEPSS (Associação Brasileira de Ensino e Pesquisa em Serviço Social) e 32 programas de Pós-Graduação cadastrados na Plataforma Sucupira/CAPES, para verificar se durante a formação é disponibilizado ao acadêmico a disciplina de Bioética. **Resultados:** A pesquisa revelou que a relação entre Bioética e Serviço Social conta com raros precursores, tanto nacional (três autores), como internacionalmente (também com três autores). A Bioética muito esporadicamente consta como disciplina acadêmica nos cursos de graduação nacionais em Serviço Social, encontrando-se apenas uma (01) instituição que a ofertava. Da mesma forma, durante a pós-graduação, apenas uma (01) instituição nacional ofertava a disciplina de Bioética. **Conclusão:** A Bioética não está presente nas discussões da categoria e o sistema educacional brasileiro é extremamente deficiente em sua oferta como disciplina durante a graduação e pós-graduação em Serviço Social. Infere-se que, por se tratar de profissão que lida frequentemente com conflitos morais, as instituições de ensino necessitam promover a inserção da Bioética na formação do Assistente Social e incentivar sua discussão.

Palavras-chave: bioética; serviço social; interdisciplinaridade.

Área temática: Saúde Coletiva



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

MORTALIDADE INFANTIL E FETAL: COMPARATIVO ENTRE O PARANÁ E A 7ªRS/PR

Lucimary da Luz Costa¹; Grasieli de Oliveira Ramos²; Sirlei Favero Cetolin²

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

²Docente de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

Introdução: No Brasil, os índices de mortalidade infantil e fetal ainda é um desafio a ser enfrentando pelos gestores estaduais e municipais e principalmente pelos profissionais de saúde. Contudo, o estado do Paraná vem apresentado redução, frente ao índice nacional. **Objetivo:** Comparar o cenário da mortalidade infantil e fetal da 7ª Regional de Saúde/PR, localizada no Sudoeste do estado, com o Paraná, no ano de 2019. **Material e Métodos:** Realizou-se análise do número de óbitos fetais e infantis, no ano de 2019, da 7ª RS/PR e o índice do estado do Paraná, a partir dos dados disponíveis no Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) e Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC). **Resultados:** Constatou-se que o coeficiente de mortalidade fetal/1.000 nascidos vivos da 7ª RS, em 2019, ficou em 8,10% e o Paraná resultou em 7,32%. Já o coeficiente de mortalidade infantil/1.000 nascidos vivos da 7ª RS/PR, nesse mesmo período, foi de 12,39% e do Paraná totalizou 10,32%. **Conclusão:** O Paraná apresentou redução do coeficiente de mortalidade fetal, quando comparado aos anos anteriores, bem como a 7ª RS/PR, ambos apresentando variações pouco significativas. No tocante a mortalidade infantil, o Paraná apresentou lenta redução no ano de 2019. Já a 7ª RS/PR apresentou uma pequena elevação, mas manteve o coeficiente muito próximo dos anos anteriores, ou seja, não apresentou elevação significativa.

Palavras-chave: mortalidade fetal; mortalidade infantil; coeficiente.

Área temática: Saúde Coletiva



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS E PERFIL DE CONSUMO DO TABACO EM PACIENTES ATENDIDOS POR UM CENTRO DE TRATAMENTO EM MARINGÁ

Patrícia Sayuri Nagamatsu¹, Miyoko Massago², Idalina Diair Regla Carolino³, Celso Ivam Conegero⁴

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

²Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá

³Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O Tabagismo ocasiona diversas doenças do trato respiratório, contribui com o agravo de outras patologias e leva a dependência. Assim, muitas vezes há a necessidade da intervenção profissional para o abandono do tabaco pelos fumantes. **Objetivo:** Avaliar os aspectos sociodemográficos e perfil de tabagismo em pacientes atendidos pelo “Projeto Tabagismo: Tratamento e acompanhamento de usuários de Tabaco de Maringá e região” desenvolvido na Universidade Estadual de Maringá. **Materiais e Métodos:** O tratamento segue as diretrizes do Ministério da Saúde (coleta de dados sociodemográficos e do consumo do tabaco, seguido de terapia cognitivo-comportamental). Para avaliar os dados citados acima foram analisados os prontuários de 615 pacientes atendidos pelo projeto entre os anos de 2010 e 2018, os quais foram divididos em: aqueles que pararam de fumar durante o tratamento (grupo 1), e aqueles que não pararam de fumar no mesmo período (grupo 2). **Resultados:** No grupo 1, houve maior número de indivíduos do gênero feminino (53%), com idades entre 40 e 59 anos (57,8%), ensino superior completo (32,3%) e do lar (10,5%). A maioria começou a fumar entre 11 e 20 anos (85,5%), estimulados por amigos e colegas (54,2%) e 19% fumavam mais por causa do nervosismo. Verificou-se resultados parecidos no grupo 2, apresentando diferenças quanto a profissão, onde observou maior frequência de aposentados, estudantes e auxiliares, todos com 6,7%, e quanto ao fator de iniciação, onde a maior influência foi de familiares e parentes (51%). **Conclusão:** As pessoas próximas exercem um papel fundamental na experimentação e consolidação do vício. Associado a isso, o nervosismo é o principal motivo para fumar, e o estresse sofrido no ambiente não domiciliar influencia no abandono do vício. Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de medidas que diminuam os problemas psicológicos e aumentem difusão dos malefícios do tabaco e a adesão paciente no tratamento.

Palavras-chave: tabagismo; vício; tratamento.

Área temática: Saúde Coletiva

The background of the page is a light blue color with a series of overlapping, curved, and flowing lines in various shades of blue, creating a sense of movement and depth. The lines are most prominent in the upper half of the page and fade out towards the bottom.

Toxicologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO PRELIMINAR DE TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE COPAIBA (*C. langsdorffi*)

Ana Paula Ames Sabin¹; Any Carolina Chagas²; Juliana Cristina Castro³; Lillian Barros⁴; Jurandir Fernando Comar⁵.

¹Pós-graduanda (doutorado) em Biologia Celular e Molecular, departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

²Pós-graduanda (mestrado) em Bioquímica, departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

³Professora adjunta do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá/ área de Toxicologia

⁴Pesquisadora do grupo de pesquisa de processos e produtos sustentáveis do Mountain Research Centre (CIMO) Polytechnic Institute of Bragança Campus de Santa Apolónia.

⁵Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O óleo de copaíba (OC) é composto majoritariamente por β -cariofileno. Este composto é apontado como responsável pelos efeitos benéficos do OC. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, o OC apresentou efeito hepatotóxico quando administrado oralmente, mas isso não ocorreu ao administrar β -cariofileno. **Objetivo:** Isolar o óleo essencial de copaíba (OEC) (fração volátil, rica em β -cariofileno), analisar a composição do OC e do OEC por cromatografia e fazer uma triagem preliminar de toxicidade do OC e sua fração. **Material e métodos:** A extração do óleo essencial (OEC) foi feita por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Os óleos foram diluídos em n-hexano grau HPLC e analisados em sistema de cromatografia gasosa (Thermo Electron Corp. modelo Focus GC). Os constituintes foram determinados comparando com índices descritos na literatura. As condições cromatográficas foram: Coluna capilar, DB-5, temperatura inicial da coluna, 60 °C; rampa de aquecimento 3°C/minuto até 230°C; Hélio como gás de arraste, em fluxo: 1,0 ml/min. O volume injetado: 1 μ L no modo *splitless*. Para triagem preliminar de toxicidade fez-se cultura de células primárias isoladas de fígado de porco (PLP1). **Resultados:** A extração rendeu 30% de óleo essencial. O OEC resultante é um líquido incolor ligeiramente amarelado, com o odor característico do bálsamo de copaíba. Compostos majoritários do óleo essencial de copaíba (*C. langsdorffi*) quantificados pela cromatografia foram: β -cariofileno (50,33%), α -copaeno (9,30%) e α -humuleno (9,05%). Células PLP1 tiveram 50% crescimento inibido por: 86,44 μ g/ml de OC e 99,17 μ g/ml OEC. **Conclusão:** A técnica de hidrodestilação ofereceu bom rendimento de óleo essencial, composto por mais que 50% de β -cariofileno. Em células PLP1, a fração demonstrou um efeito hepatotóxico menor que o óleo resina, corroborando com nossas teorias de que o efeito tóxico evidenciado no estudo com óleo de copaíba não era causado pelo β -cariofileno.

Palavras-chave: óleo essencial de copaíba; cromatografia; hepatotoxicidade.

Financiador (es): CNPq; O óleo de copaíba foi gentilmente cedido pela empresa Apis Flora Industrial e Comercial LTDA.

Área temática: Toxicologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

3D RECONSTRUCTED EPIDERMIS MODEL TO EXPLORE THE SIMULTANEOUS EXPOSURE OF SKIN TO AIR PARTICULATE MATTER AND SOLAR RADIATION

Claudia Larissa Viana da Silva¹; Larissa Anastácio da Costa Carvalho²; Denisse Esther Mallaupoma Camarena³; Silvia Romano de Assis⁴; Silvy Stuchi Maria-Engler⁵; Silvia Berlanga de Moraes Barros⁶.

¹Graduate student (Master's) in pathophysiology and toxicology, department of clinical and toxicological analysis, school of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

²Postdoctoral student, department of clinical and toxicological analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

³Graduate student (PhD) in fundamental chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo.

⁴Technician of the skin biology laboratory, department of clinical and toxicological analyzes, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

⁵Professor, department of clinical and toxicological analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

⁶Senior professor, department of clinical and toxicological analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

Introduction: The skin, in the daily life, is exposed to both air particulate matter (PM) and solar radiation. PM exposure has been associated to worsening of skin diseases as atopic dermatitis. Solar radiation can promote DNA damage in the skin. In addition, chemical substances present in PM when exposed to solar radiation, can undergo reactions and become even more toxic than parental compounds. We learned from a 3D epidermis model that the exposure to 8.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM₁₀ (Hieda et al, 2020) induces alteration of epidermis permeability and expression of proteins of epidermis differentiation and hydration.

Objective: Develop a model of concomitant exposure to PM and solar radiation in a Reconstructed Human Epidermis (RHE). **Material and methods:** The first step was to find a solar radiation dose that does not induces severe epidermis alterations. Doses 5 and 10 J/cm² of total radiation were tested (with and without an AM1.5G filter). A second experiment was performed to find the better volume of the PM suspension. A dose of 8.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM₁₀ (Hieda et al, 2020) was suspended in 100 and 200 μL in PBS. Histological and immunohistochemical analysis of proteins of epidermis differentiation (loricrin and involucrin) and aquaporin were performed. Approved by the ethic committees (HU CEP 943/09; CEP FCF/USP 534). **Results:** The exposure to 10J/cm² induced significant morphological lesions, in special when no filter was used, with a marked reduction of loricrin expression. Regarding the suspension volume of PM₁₀ (100 or 200 μL) slight differences were observed suggesting that 200 μL suspension induces a more homogenous distribution of PM on the epidermis. **Conclusion:** With these results the dose of 5J/cm² with AM1.5G filter and 8.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM₁₀ suspended in 200 μL of PBS will be employed as an exposure RHE model to further study the simultaneous exposure to both PM₁₀ and solar radiation.

Keywords: air particulate matter; solar radiation; reconstructed human epidermis.

Financier (s): CNPq and FAPESP.

Thematic area: Toxicology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITO DA *Cimicifuga racemosa* L. E DOXORRUBICINA SOB A MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE CAMUNDONGAS CULTIVADOS *IN VITRO*

Danisvânia Ripardo Nascimento¹; Ernando Igo Teixeira de Assis¹; Victor Carneiro de Souza²; Francisco das Chagas Costa¹; Alana Nogueira Godinho³; Jordânia Marques de Oliveira Freire³; Ana Liza Paz Sousa Batista³; José Roberto Viana Silva³; Anderson Weiny Barbalho Silva³

¹Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará – PPGB UFC, Sobral/CE

²Acadêmico do Curso de Medicina - Universidade Federal do Ceará, Sobral/CE.

³Docente-Pesquisador – Núcleo de Pesquisa em Experimentação Animal – NUPEX / Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia da Reprodução -LABIREP, Universidade Federal do Ceará, Sobral/CE.

Introdução: A utilização de fármacos contra o câncer, como a Doxorubicina (DOXO), em mulheres, pode danificar os ovários acarretando efeitos adversos na foliculogênese. Assim, a busca por substâncias que possam inibir ou amenizar os malefícios causados por quimioterápicos como a DOXO, apresentam potencial farmacoterápico. Nesse sentido, a *Cimicifuga racemosa* L.(CR) é um fitoterápico alternativo no tratamento da menopausa. **Objetivo:** Investigar a ação da CR e DOXO sobre a manutenção da morfologia de folículos ovarianos cultivados *in vitro*. **Material e métodos:** Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Ceará-Sobral, sob o protocolo número 05/18. Foram coletados ovários (n=46) de camundongas *Swiss*, com ciclo estral regular, e cultivados individualmente em placa de 24 poços a 37,5° C, em 5% CO₂, por 6 dias contendo meio base (grupo controle: DMEM+); ou DMEM+ suplementado com diferentes concentrações do extrato de CR (5, 50 e 500 ng/ml), ou DOXO (0,3 µg/mL). Ao final do cultivo, os ovários foram submetidos à análise histológica para avaliação morfológica sendo classificados em normais ou degenerados, atendendo a critérios de classificação microscópicos. Para análise estatística foi utilizado o Teste de Fisher, e as diferenças foram consideradas significativas quando p <0,05. **Resultados:** Os folículos cultivados em meio suplementado com CR (5, 50 e 500 ng/mL) mostraram um aumento no percentual de folículos morfológicamente normais apresentando organização celular normal com núcleo visível quando comparados ao tratamento com DOXO (0.3 µg/mL). Ademais, os folículos cultivados em meio contendo CR (5, 50 e 50 ng/ml) mantiveram um percentual de folículos morfológicamente normais comparados ao grupo controle (DMEM+). **Conclusão:** A presença de DOXO em meio de cultivo reduz o percentual de folículos morfológicamente normais, enquanto a presença de CR mantém o percentual de folículos morfológicamente normais comparados ao grupo controle.

Palavras-chave: fertilidade; fitoterápico; cultivo *in vitro*.

Financiador (es): Chamada MCTIC/CNPq Nº 28/2018 - Universal/Faixa A; Processo: 435524/2018-6

Área temática: Toxicologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AValiação de Método Analítico para Determinação de Cocaína, Morfina e Heroína em Fluido Oral

Deborah Thais Palma Scanferla¹; Luís Otavio de Oliveira²; Fernando de Carvalho Figueiredo²; Jéssica Cristina Zoratto Romoli³; Camila Marchioni⁴; Miguel Machinski Junior⁵, Simone Aparecida Galerani Mossini⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC.

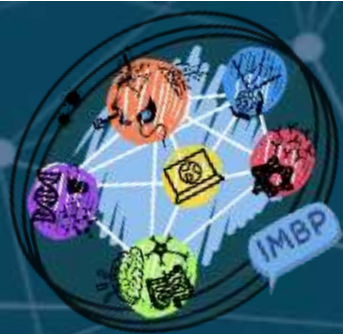
⁵Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: O uso recente de cocaína (COC), morfina (MOR) e heroína (HER) pode ser detectado em fluido oral (FO). A técnica Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) pode ser empregada como preparo da amostra, antecedente à análise em Cromatógrafo Gasoso-Espectrômetro de Massas (CG-EM). **Objetivo:** Avaliar diferentes solventes dispersores e extratores para aplicação em DLLME para extração de COC, MOR e HER em FO. **Material e métodos:** Amostras negativas de FO foram coletadas por expectoração em frasco coletor. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição nº56482016.1.0000.0104, parecer nº 2.155.847. Foram adicionados os padrões COC, MOR e HER (200 ng mL⁻¹), 500µL de FO e 500µL de água destilada à um tubo Falcon. O solvente extrator (diclorometano), 600µL, foi mantido constante para teste com demais solventes dispersores (800µL) isopropanol, metanol, acetona e acetonitrila. Em seguida, o melhor solvente dispersor foi testado com os demais solventes extratores (acetato de etila e tolueno). A escolha dos solventes foi baseada na maior área absoluta dos analitos. Após centrifugação da amostra, a fase extratora foi transferida para um *vial* e evaporada. Adicionou-se 50µL do derivatizador BSTFA (bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% TCMS (triclorometilssilano) antes da injeção em CG-EM. **Resultados:** O teste para escolha do melhor solvente dispersor inviabilizou o uso do isopropanol, pois não promoveu separação das fases. Acetonitrila forneceu a maior área, seguida de metanol e acetona. Na segunda etapa, acetonitrila foi mantida como solvente dispersor para avaliação dos demais solventes extratores, sendo o diclorometano escolhido. **Conclusão:** O estudo evidenciou acetonitrila como melhor solvente dispersor e diclorometano como melhor extrator na DLLME, para extração de COC, MOR e HER em FO. Pretende-se a continuidade do estudo com avaliação das variáveis volume (solvente e amostra), força iônica, pH da amostra, e posteriormente a validação completa da técnica, para fins de monitoramento recente do uso destas substâncias.

Palavras-chave: drogas de abuso; microextração líquido-líquido dispersiva; fluido oral.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (001).

Área temática: Toxicologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES PRÉ-TREINO

Eduardo Kennedy Carrão Dantas¹; Caroline Lopes Simões Ferreira²; Letícia Ferrão Zanenga³; Elisa Raquel Anastácio Ferraz⁴; Cláudia Alessandra Fortes Aiub⁵; Carlos Fernando Araujo-Lima⁶; e Israel Felzenswalb⁷

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

²Bacharel em Ciências Biológicas Modalidade Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

³Mestre em Biociências, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴Docente, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro, Brasil.

⁵Docente, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO, Rio de Janeiro, Brasil.

⁶Doutor em Biociências, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

⁷Docente, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Introdução: As atividades físicas são cada vez mais praticadas em uma sociedade que busca um estilo de vida mais saudável. Os suplementos dietéticos aumentam os resultados do treino e são facilmente encontrados no mercado. Entretanto, alguns casos clínicos foram relatados como coincidindo com o uso desses suplementos, como em um estudo do Havaí com indivíduos com insuficiência hepática.

Objetivo: Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade dos suplementos alimentares pré-treino OxyElite Pro, Jack3d e C4. **Material e métodos:** O ensaio *Salmonella* / Microssoma foi usado para determinar a mutagenicidade. As cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 nas concentrações de 0,005, 0,05, 0,5, 5, 50 mg/mL, todas diluídas em DMSO e analisadas com e sem ativação metabólica (S9 mix 4%). O ensaio foi feito em triplicata e o efeito mutagênico foi observado nas concentrações que tiveram o índice de mutagenicidade (IM = revertentes induzidos / espontâneos) igual ou superior a 2. Para a avaliação citotóxica, foi utilizado, através da linhagem HepG2, o ensaio de viabilidade celular (WST-1) para avaliação da funcionalidade da mitocôndria, e o ensaio de LDH para a integridade da membrana celular. Foi também realizado um ensaio de fosfatase alcalina para verificar possíveis distúrbios hepáticos. A porcentagem de sobrevivência celular pelo WST e LDH, e o nível de secreção da fosfatase alcalina, em contato com suplementos nas concentrações de 0 a 5 mg/mL foram observadas por períodos de 24h, 48h e 72h.

Resultados: No modelo bacteriano utilizado, foi detectado um resultado positivo para mutagenicidade para os três suplementos estudados, em diferentes cepas, tanto na presença como na ausência ativação metabólica. Nos ensaios com modelo eucarionte, observou-se um alto índice de morte celular.

Conclusão: Nossos resultados sugerem um potencial mutagênico e citotóxico, induzido pela exposição aos suplementos dietéticos estudados, causando possivelmente lesões em células hepáticas.

Palavras-chave: suplementos; citotoxicidade; mutagenicidade.

Financiador (es): CNPq, CAPES, FAPERJ, UERJ, UNIRIO, UFRJ.

Área temática: Toxicologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANÁLISE DE ETILENOTIUREIA POR CG-EM E EXTRAÇÃO POR DPX

Jéssica Cristina Zoratto Romoli¹; Deborah Thais Palma Scanferla²; Renata Sano Lini²; Raul Gomes Aguera³; Júlia Garbin Navarro⁴; Carlos Roberto Bueno Junior⁵; Camila Marchioni⁶; Juliana Cristina Castro⁷; Simone Aparecida Galerani Mossini⁷; Miguel Machinski Junior⁷

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC

⁷Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Etilenotiureia (ETU), produto de biotransformação específico de fungicidas, tem sido sugerida como um biomarcador de exposição ocupacional, fazendo-se necessário o desenvolvimento de métodos para sua quantificação. A derivatização da molécula de ETU deve ser realizado para análise por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), para aumentar a volatilidade e deixar o composto termicamente estável. A técnica de extração em ponteira descartável (DPX) permite a rápida extração dos analitos, devido ao equilíbrio de sorção. **Objetivo:** Avaliar o perfil cromatográfico e a sorção do padrão de ETU em celite. **Material e métodos:** A derivatização foi realizada usando acetato de etila-BSTFA-*t*-BuMe₂Si-Cl (5:4:1, v/v/v). Foi avaliado o tempo de permanência na estufa (60°C - 10 e 30min) e o volume do derivatizante (50 e 100µL). Para a avaliação da sorção de ETU no celite por DPX foi utilizado o padrão (50 ng/mL). O celite (20mg) foi condicionado com água mili-Q (100µL). Na limpeza, foi avaliado acetona, éter, clorofórmio e acetonitrila (100µL). Por fim, metanol, acetona, etanol, n-hexano e isopropanol foram avaliados para eluição (200 µL). **Resultados:** O melhor perfil cromatográfico para a derivatização ocorreu em estufa por 30min com 50µL do derivatizante. Nesta condição, foi observado a maior área de pico para os íons 159 (*t*-Me₂Si-ETU) e 231 (Me-ETU-*t*-BuMe₂Si). O celite foi capaz de adsorver a ETU; a acetonitrila, como solvente de lavagem e acetona, como solvente de eluição, resultaram no melhor perfil cromatográfico. **Conclusão:** A ETU foi derivatizada de maneira eficaz com baixos volume de derivatizador e tempo em estufa. A escolha do solvente de lavagem e eluição ocorre a partir da natureza química do sorvente e do analito. Portanto, acetonitrila foi capaz de permitir que a ETU permanecesse adsorvida no celite, sendo eluída apenas na presença da acetona. Assim, esses testes serão avaliados na presença do material biológico urina.

Palavras-chave: DPX; etilenotiureia; CG-EM.

Financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Área temática: Toxicologia.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Athenaea velutina* ON ENZYMATIC ACTIVITY OF THE EPIDIDYMIS OF WISTAR RATS

Luiz Pedro de Souza-Costa¹; Diene France de Souza²; Jordana Luizi dos Prazeres²; John Lennon Paiva Coimbra¹; Matheus Augusto Pinto Teixeira³; João Paulo Viana Leite⁵; Mariana Machado-Neves⁶

¹Master's student in Cell and Structural Biology – Federal University of Viçosa, MG/Brazil

²PhD student in Food Science and Technology – Federal University of Viçosa

³PhD student Biochemistry – Federal University of Viçosa

⁴Student of Veterinary Medicine – Federal University of Viçosa

⁵Professor - Department of Biochemistry and Molecular Biology – Federal University of Viçosa

⁶Professor - Department of General Biology – Federal University of Viçosa

Introduction: *Athenaea velutina* is part of the Solanaceae family found in the Brazilian Atlantic Forest. This species is rich in withanolides, which can act on the male reproductive organs by altering the enzymatic activity, generating reactive oxygen species and impairing sperm viability. Up to date, there are no studies focused on the medicinal and toxicological potential of *A. velutina* in the epididymis, the organ responsible for the sperm maturation process. **Objective:** Evaluate the effects of *Athenaea velutina* ethanolic extract on the enzymes and oxidative stress markers in the epididymis. **Material and methods:** Wistar rats were divided into four experimental groups (n=5/group): control, with animals treated with PBS and 1% DMSO; G250, G500 and G1000: rats treated with extract of *A. velutina* 250 mg/kg, 500 mg/kg and 1000 mg/kg, respectively. After 28 days of treatment, rats were euthanized and the epididymis were removed. The procedures with the animals were approved according to CEUA/ UFV number 82/2018. Epididymis removed were frozen in nitrogen and kept at -80° for stress analysis. The activity of SOD, CAT, GPx, GST, MDA and carbonylated protein were evaluated from the caudal region of the epididymis. The results were submitted to ANOVA and Tukey tests. The differences were significant when $P < 0.05$. **Results:** Our results showed that the activity of SOD, CAT, GPx and GST, did not change in the animals of the groups G250, G500 and G1000, in comparison to the control ($P > 0.05$). Thus, the concentrations of MDA and carbonylated protein were also not changed in the same treated animals compared to the control animals, maintaining the concentrations at normal levels ($P > 0.05$). **Conclusion:** In conclusion, the extract of *A. velutina* was shown not to alter the activity of enzymes and oxidative stress markers, suggesting that this extract is not harmful to male reproduction.

Keyword: oxidative stress; epididymis; reproductive toxicology.

Funders: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Thematic area: Toxicology



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES DA CULTURA DA UVA

Nadya Garcia de Oliveira¹; Renata Sano Lini²; Raul Gomes Aguera³; Simone Aparecida Galerani Mossini⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Residência) em Análises Clínicas, Hospital Universitário Regional de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o Paraná o terceiro maior do país. A toxicologia ocupacional estuda o problema da utilização destes produtos, o tipo de interação com o organismo humano e o risco de intoxicações na população exposta. **Objetivo:** Investigar o perfil sociodemográfico e as condições de trabalho de viticultores de Marialva-PR, para caracterizar a exposição ocupacional aos agrotóxicos. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo quantitativo, de natureza descritiva, onde foram realizadas entrevistas aos viticultores. A análise dos dados foi realizada por meio do software Microsoft Excel® (2010). Estudo aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (CAAE nº 65018017.7.0000.0104), sob o parecer nº 2.068.991. **Resultados:** A população estudada foi constituída predominantemente por homens (55,26%), com idade variando entre 19 e 86 anos. Observou-se que, o número de moradores por domicílio se situava entre 2 a 5, com renda familiar média de 1 a 4 salários mínimos. Dos 190 entrevistados, 60 afirmaram ter concluído o ensino fundamental e apenas uma pessoa relatou ter concluído o ensino superior. Entre os participantes do estudo, 172 apresentavam contato ocupacional com agrotóxicos, 22 afirmaram já ter apresentado intoxicação aguda por esses compostos. A forma mais frequente de contato com agrotóxicos é o contato direto através do trabalho. Dos participantes do projeto, 85 relataram possuir mais de 20 anos de exposição aos agrotóxicos. Em relação à proteção individual, apenas 6,8% dos viticultores utilizam todos os equipamentos recomendados e 38,5% não utilizam qualquer tipo. **Conclusão:** Concluímos que esta população se encontra exposta aos agrotóxicos e que a maioria destes não faz a utilização de equipamento de proteção individual, podendo estar associado a baixa escolaridade, que provavelmente, dificulta o entendimento das recomendações e práticas de segurança.

Palavras-chave: agrotóxicos; viticultor; saúde do trabalhador.

Financiador: Latox/UEM; EMATER-Marialva-PR e SETI-PR, CAPES

Área temática: Toxicologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

EFEITOS DO METILGLIOXAL SOBRE O METABOLISMO E ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

Naiara Cristina Lucredi¹; Mariane Aparecida Franco de Godoy²; Veronica Elisa Pimenta Vicentini³; Jurandir Fernando Comar⁴

¹Acadêmica de Pós-graduação (Doutorado) em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biotecnologia Ambiental, Universidade Estadual de Maringá

³Docente - Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O diabetes mellitus (DM) é caracterizado pela hiperglicemia crônica, que é o gatilho para a ativação de vias glicotóxicas, tais como a via do metilglioxal (MG), que é um aldeído altamente reativo, capaz de modificar a estrutura e função de macromoléculas. A ativação de vias glicotóxicas, leva ao estresse oxidativo, que acomete vários tecidos, como o tecido nervoso e o Hepático. Sabe-se que o MG aumenta o estresse oxidativo e prejudica a sinalização da insulina no fígado, entretanto, ainda não se sabe sobre o seu efeito em vias metabólicas hepáticas, tais como a glicólise, glicogenólise e gliconeogênese. **Objetivo:** É provável que o MG possa modificar vias metabólicas do fígado de modo a favorecer a hiperglicemia presente no DM além de causar estresse oxidativo no órgão, para confirmar tal hipótese, o objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos saudáveis. **Material e métodos:** Ratos wistar machos com 60 dias (CEUA9185221019) foram utilizados para a perfusão do fígado (n= 3 – 5 animais/grupo) com MG (0, 0,5 e 5 mM), onde foram avaliados o consumo de oxigênio pelo fígado, liberação de glicose, lactato e piruvato no perfusado, bem como a glicogenólise, gliconeogênese e glicólise. Os fígados perfundidos foram armazenados para análises de estresse oxidativo (n = 3 – 5 animais/grupo): ROS, carbonilação, atividade da superóxido dismutase e catalase. A significância estatística dos dados foi avaliada por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. **Resultados:** O MG (5 mM) aumentou a liberação de glicose do fígado, bem como a gliconeogênese, reduziu a liberação de piruvato, aumentou o estresse oxidativo do fígado e reduziu a atividade das enzimas antioxidantes. **Conclusão:** o MG pode contribuir para a hiperglicemia no DM através do aumento da gliconeogênese bem como causar dano oxidativo no fígado, podendo levar à disfunção hepática.

Palavras-chave: metilglioxal; estresse oxidativo; metabolismo hepático.

Financiador (es): CAPES e CNPq.

Área temática: Toxicologia



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

DETERMINAÇÃO DE ANFETAMÍNICOS EM CABELO: VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Paula Pessoa Moreira e Souza¹; Mariana Aparecida Oliveira Madia¹; Luís Otávio de Oliveira²; Simone Aparecida Galerani Mossini³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá/UEM.

²Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá/UEM.

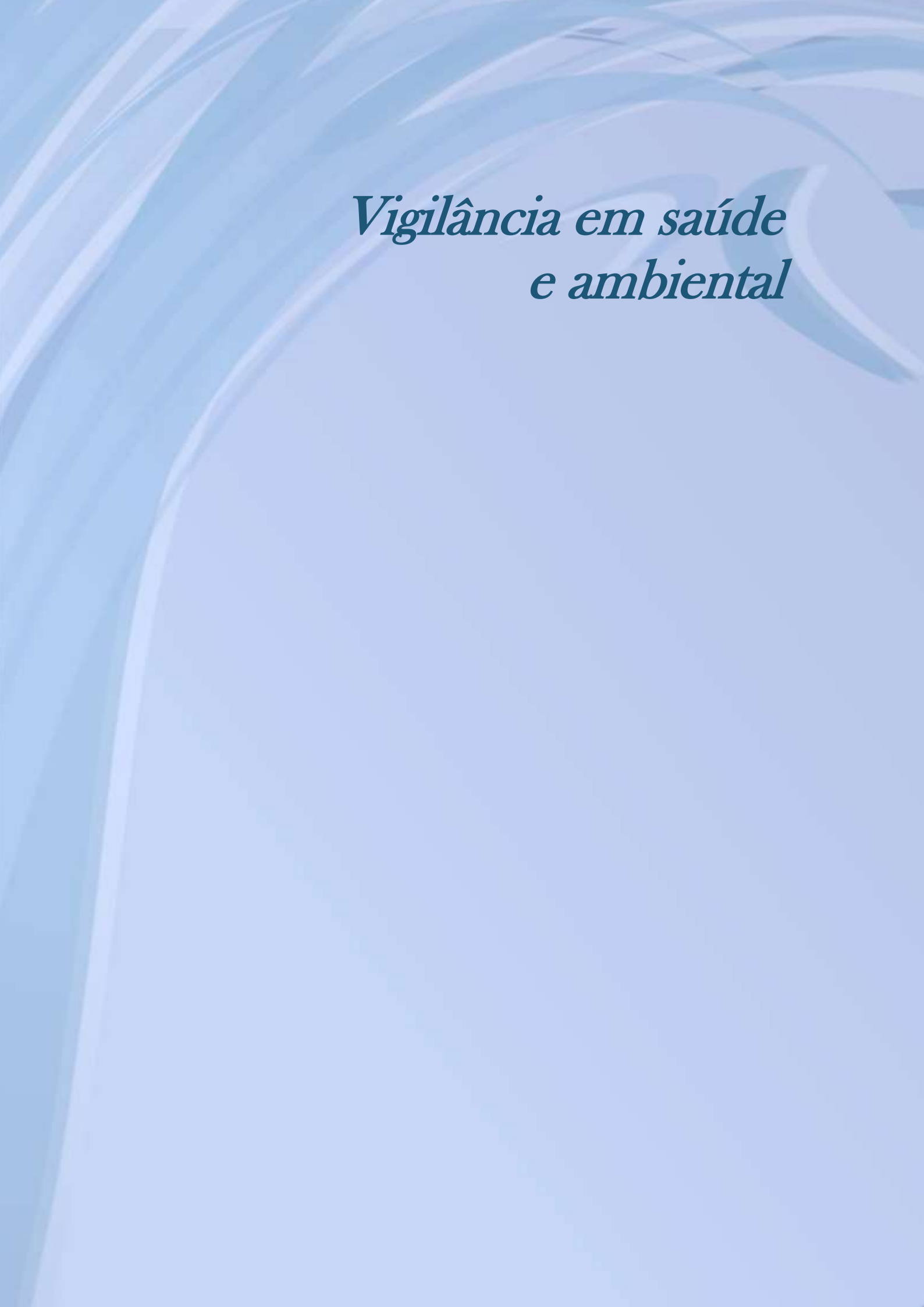
³Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá/UEM.

Introdução: O uso e abuso de anfetamínicos atinge vários seguimentos da sociedade, mas o que chama atenção é o aumento de hospitalização e morte por intoxicação por metilendioximetanfetamina, denominada popularmente de ecstasy, de jovens, que são os que mais frequentam festas eletrônicas e boates. Segundo o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC), em seu último relatório mundial, publicado em 2019, sobre drogas estimulantes, o número aproximado de usuários de anfetamínicos é de 27 milhões de pessoas. **Objetivo:** Validação de método analítico para determinação de anfetamina (ANF), metanfetamina (MET) e 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) em cabelo por Microextração em Fase Líquida suportada por Fibra Oca (HF-LPME), utilizando Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG-EM). **Material e métodos:** Validação analítica realizada de acordo com as normas do Grupo de Trabalho Científico para a Toxicologia Forense (SWGTOX), *Society of Hair Testing* e UNODC, contemplando os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, efeito matriz e efeito residual, seguida de aplicação do método em 10 amostras autênticas de usuários, do sexo masculino, internados em uma clínica de reabilitação em Maringá/PR. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, parecer nº 2.155.847. **Resultados:** A técnica resultou precisa e exata, apresentando seletividade, ausência de efeito matriz e efeito residual. Para os 3 analitos, os limites de detecção e quantificação resultaram 0,01 ng/mg e 0,2 ng/mg, respectivamente. Para o parâmetro linearidade, utilizou-se a faixa de concentração de 0,2 a 20 ng/mg, obtendo-se coeficiente de correlação linear ($R \geq 0,99$). Nas amostras autênticas foram encontrados anfetamina, metanfetamina e metilendioximetanfetamina em diferentes concentrações, sendo a metilendioximetanfetamina detectada em sete amostras. **Conclusão:** A técnica de HF-LPME por CG-EM demonstrou ser aplicável e uma importante ferramenta auxiliar na prevenção e monitoramento do uso de drogas.

Palavras-chave: anfetamínicos; toxicologia analítica; amostras de cabelo.

Financiador (es): Fundação Araucária [processo nº35197.406.32936.20112012].

Área temática: Toxicologia



*Vigilância em saúde
e ambiental*



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

PRESENÇA DE BACTÉRIAS EM ÁGUAS MINERAIS COMERCIALIZADAS NO BRASIL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Luiz Felipe Carvalho Marinho¹, Rosana Hogaha Leite², Elaine Schultz Dworak³, Miyoko Massago⁴

¹Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá.

²Graduada em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá.

³Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: Apesar do acesso à água limpa ser um direito humano básico, anualmente milhões de pessoas morrem por doenças relacionadas à água no mundo, fato que tem gerado uma preocupação acerca da qualidade das águas distribuída pelas redes públicas e faz com que o mercado de água envasada cresça rapidamente no Brasil. No entanto, a água mineral comercializada no país nem sempre traz a potabilidade necessária para o consumo humano. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática de literatura as bactérias patogênicas identificadas nas águas minerais comercializadas no Brasil. **Material e métodos:** Inicialmente buscaram-se os artigos originais completos publicados nos idiomas português e/ou inglês entre os anos de 2010 a 2019, utilizando os seguintes bancos de dados: Scientific Electronic Library Online, Pubmed e Literatura Latino-Americana e Caribe em Ciências da Saúde e descritores nas ciências da saúde informados a seguir: “água mineral”, “contaminação”, “Brasil” e “bactérias” e lógica booleana “E” ou “OU”. Em seguida aqueles que não se enquadrassem no escopo do resumo e/ou não apresentassem bactérias nas amostras foram excluídas, totalizando treze artigos analisados. **Resultados:** Em todos estes artigos há relatos de contaminação por coliformes totais e 12 deles descrevem a presença de coliformes fecais em pelo menos uma das amostras analisadas. Considerando que apenas 51,5% das águas avaliadas estavam contaminadas e que uma mesma amostra poderia ter mais de uma bactéria é possível afirmar que 29,7% (113/381) tinham coliformes totais, 22,8% (46/202) *Pseudomonas aeruginosa*, 11,5% (44/381) coliformes fecais, 8,0% (4/50) *Clostridium perfringens* e 3,7% (03/82) enterococos, demonstrando que ocorria a sobreposição das bactérias. **Conclusão:** Apesar de a legislação brasileira determinar limites máximos de microrganismos e exigir análises regulares em águas minerais comercializadas, a literatura relata que há um alto nível de contaminação bacteriana, principalmente por coliformes totais e *Pseudomonas aeruginosa* neste produto, tornando-o impróprio para o consumo humano.

Palavras-chave: microrganismos; coliformes; água mineral.

Área temática: Vigilância em Saúde e Ambiental.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

POSSÍVEIS INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS EM FUMANTES

Miyoko Massago¹, Marco Antônio Costa², Celso Ivam Conegero³

¹Mestre - Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá,

²Docente - Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá,

³Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A inadequabilidade do tratamento farmacológico representa um sério problema de saúde principalmente em fumantes, pois, a retirada abrupta da nicotina interfere no sistema nicotínico colinérgico e cardiovascular. **Objetivo:** Avaliar as possíveis interações medicamentosas em fumantes atendidos pelo “Projeto Tabagismo: Tratamento e Acompanhamento de Usuários de Tabaco de Maringá e Região” nos anos de 2018 e 2019. **Material e Métodos:** O referido centro está localizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM), campus sede e segue o protocolo determinado pelo Ministério da Saúde, portanto, após a triagem inicial é realizado o tratamento cognitivo-comportamental dos pacientes. Assim, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo os Seres Humanos da UEM (parecer nº 856.316/14), no presente trabalho realizou-se um estudo transversal na qual foram analisados os todos os prontuários dos fumantes atendidos pelo referido projeto, nos anos de 2018 e 2019, para a coleta dos dados referentes ao uso de fármacos, idade e gênero dos participantes. Em seguida, as possíveis interações medicamentosas e seus principais efeitos foram avaliados utilizando o site “https://www.drugs.com/drug_interactions.html”. **Resultados:** Dos 56 pacientes analisados, 36 utilizaram algum fármaco. Analisando apenas este grupo observou-se que a idade média foi de 53,2 ±12,7 anos, 69,5% eram do gênero feminino, 80,5% tomaram psicotrópicos e metade utilizava mais de um medicamento. Entre os indivíduos que utilizavam mais de um medicamento, 62,5% estavam sujeitos à interação moderada e 9% a interação grave, destes 54,5% foram entre psicotrópicos e repositores nicotínicos, e a principal consequência desta associação é a hipertensão. **Conclusão:** Há alta possibilidade de ocorrer uma interação medicamentosa de nível moderado entre os pacientes analisados. Desta forma, é importante a participação ativa do médico e do farmacêutico na equipe multidisciplinar e a avaliação dos medicamentos utilizados para evitar ou ao menos minimizar a ocorrência destes erros nos fumantes.

Palavras-chave: erros de medicação; tabagismo; psicotrópicos.

Área temática: Vigilância em Saúde e Ambiental.



VII *International Meeting of Biosciences and Physiopathology*

XI *Simposio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ATUAÇÃO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA EM TEMPOS DE COVID-19

Susana Benin Amadori¹; Flávio da Silva Posetti²; Lindsay Angela Sozin¹; Vilma Beltrame³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

²Secretário Municipal de Saúde do município de Palmas/PR

³Docente da Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba/SC

Introdução: Dentre as pandemias vivenciadas nas últimas décadas, a Covid-19 é a doença mais letal e que apresenta os maiores desafios para profissionais de saúde e a disseminação da educação em saúde é fundamental nesse cenário. **Objetivo:** Descrever o perfil dos estabelecimentos inspecionados pela Divisão de Vigilância em Saúde do município de Palmas/Paraná, para mitigar a disseminação do vírus SARS-CoV-2 no município, através de ações prevenção e educação em saúde. **Material e Métodos:** As informações coletadas são referentes às ações realizadas entre março à julho de 2020. São derivadas de dados secundários abertos, sem identificação dos estabelecimentos e estão disponíveis junto a Divisão de Vigilância em Saúde do município de Palmas/PR. Os dados foram analisados através de frequência absoluta e porcentagem das variáveis categóricas. **Resultados:** No período compreendido do estudo, foram realizadas 1.441 inspeções em estabelecimentos comerciais e industriais do município, por quatro equipes compostas por dois Fiscais Sanitários. Dos 3.724 estabelecimentos cadastrados na Vigilância Sanitária, 38,7% foram inspecionados. Como estratégia, priorizou-se os estabelecimentos que apresentavam maior fluxo de pessoas, sendo realizadas orientações de prevenção e educação em saúde para proprietários e população em geral. Dos estabelecimentos inspecionados, 16,7% são serviços de saúde, 21% do ramo de embelezamento, 6,4% oferecem atividades de condicionamento físico; 40,5% do ramo alimentício, 4,4% indústrias com mais de 50 trabalhadores; e 11% eram estabelecimentos comerciais diversos. Destas inspeções 68,6% foram relacionadas à Saúde do Trabalhador e 33,5% ao combate de produtos fumígenos. Neste período foram testadas 1.322 pessoas, tendo 76 testes positivos para a Covid-19 e nenhum óbito pela doença. **Conclusão:** Intervenções fundamentadas na educação em saúde, comprometimento e conscientização da população (comerciantes, colaboradores e clientes) são importantes ferramentas no controle da pandemia, visto que ao concluir este estudo havia somente um caso ativo no município.

Palavras-chave: coronavírus; pandemia; educação.

Área temática: Vigilância em Saúde e Ambiental

VII

*International Meeting of
Biosciences and Physiopathology*

XI

*Simpósio de Biociências
Aplicadas à Farmácia*

Atenciosamente,

Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Fisiopatologia**

Comissão organizadora do evento

**Programa de Pós Graduação em
Biociências e Fisiopatologia**

(44) 3011-4805

simposiopbf@gmail.com

www.pbf.uem.br

**Anais
2020**