SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

PBF-UEM

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

Anais Seminários Interdisciplinares em Biociências e Fisiopatologia

Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia

2024

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

APRESENTAÇÃO

No Anais dos Seminários Interdisciplinares em Biociências e Fisiopatologia estão publicados os resumos expandidos e simples de trabalhos científicos apresentados durante o evento, o qual foi organizado pelo Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF) da Universidade Estadual de Maringá e realizado nos dias 23 a 25 de outubro de 2024 no Câmpus Sede da Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá - PR.

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

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

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

ORGANIZAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

REITORIA

Prof. Dr. Leandro Vanalli - Reitor

Profa. Dra. Gisele Mendes de Carvalho - Vice-Reitora

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Priscila Garcia Marques - Diretora

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini - Diretor Adjunto

DEPARTAMENTO ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA

Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso - Chefe

Profa. Dra. Juliana Curi Martinichen Herrero - Chefe Adjunta

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

PBF-UEM

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

Profª Drª Marcia Edilaine Lopes Consolaro - Coordenadora

Profª Drª Simone Aparecida Galerani Mossini - Coord. Adjunta

Vânia Azevedo Cardoso - Secretária

COORDENAÇÃO GERAL

Profª Drª Marcia Edilaine Lopes Consolaro

Profª Drª Simone Aparecida Galerani Mossini

COMISSÃO ORGANIZADORA

Christyna Beatriz Genovez Tavares

Érica Aparecida Pereira

Jéssica Yuri Sakurada

Juliana Aparecida Fernandes

Lygia Beatriz Dziendzik da Silva

Maria Luiza Fróes da Motta Dacome

Rafael Renato Brondani Moreira

Vânia Azevedo Cardoso

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

Sumário

Resumos expandidos

1. RNA VIABILITY TIME AND THE IMPACT OF FREEZING ON CDNA BY QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL SAMPLES
2. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CURCUMIN-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY ON BOTH FORMS OF *Sporothrix brasiliensis*
3. LEVANTAMENTO DE DADOS DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS HLA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA DE MARINGÁ E REGIÃO
4. NOVOS ALELOS HLA-B IDENTIFICADOS NO LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
5. ANÁLISE NO COMPORTAMENTO DE SEGURANÇA NA MANIPULAÇÃO E APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES DA AGRICULTURA FAMILIAR
6. COMBINAÇÃO IN VITRO DE ANTIMICROBIANOS EM CONCENTRAÇÕES TERAPÊUTICAS CONTRA *ENTEROBACTERALES* COM RESISTÊNCIA NATURAL E ADQUIRIDA PARA ESTES FÁRMACOS
7. EFEITOS DO USO DE CURCUMINA LIVRE E NANOEMULSIFICADAS ISOLADAS OU EM ASSOCIAÇÃO COM METOTREXATO NO FÍGADO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE
8. PERINATAL FACTORS ASSOCIATED WITH THE USE OF HUMAN MILK SUPPLEMENTATION: HOW TO MINIMIZE DAMAGE?
9. ESTUDO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES RURAIS
10. ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE A SOROPOSITIVIDADE PARA *Toxoplasma gondii* E A SINTOMATOLOGIA DE ESQUIZOFRENIA: ESTUDO DE REVISÃO

11. QUANTIFICAÇÃO DE RNAS Y EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS) DE PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

12. LMM2: POTENTIAL ANTIFUNGAL AGENT IN THE TREATMENT OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

13. EFEITO CITOTÓXICO DA COMBINAÇÃO DE TAMOXIFENO E CRISINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HORMÔNIO POSITIVO

14. AVALIAÇÃO IN VIVO DA BIOCOMPATIBILIDADE DO COMPÓSITO PVDF-HAP OBTIDO POR IMPRESSÃO 3D

15. ASSOCIATION BETWEEN THE PRESENCE OF ANTI-TOXOPLASM ANTIBODIES AND SOCIO-EPIDEMIOLOGICAL AND LEARNING DATA IN CHILDREN AGED 6 TO 11 YEARS

16. ASSOCIATION BETWEEN THE POLYMORPHISM (RS1758566) OF IFNA1 GENE AND CRITICAL CASES OF COVID-19

17. DESAFIOS NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

18. A ASSOCIAÇÃO DE CURCUMINA LIVRE OU EM NANOEMULSÃO E METOTREXATO NO JEJUNO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE: ANÁLISES MORFOLÓGICAS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

19. EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC DOSES OF PURE AND COMBINED MEROPENEM AND POLYMYXIN B ON TIME KILL AND BIOFILM FORMATION OF *Acinetobacter baumannii* MULTI-RESISTANT

20. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF IRON OXIDE NANOTUBES FOR CELLULAR APPLICATIONS

21. EFEITO DA INFECÇÃO PELO *Toxoplasma gondii* SOBRE OS OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6

22. CANDIDA INFECTIONS - EPIDEMIOLOGICAL TRENDS AT THE HOSPITAL OF THE NORTHWESTERN PARANÁ

23. AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO PASSIVA CONTRA COVID-19 EM NEONATOS PREMATUROS VIA TRANSPLACENTÁRIA E PELO LEITE HUMANO

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

Resumos simples

1. CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA NEFRITE LÚPICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

2. IMPACTOS DA DIETA CONTENDO GLÚTEN NA FERTILIDADE MASCULINA

3. INTOXICAÇÕES POR DROGAS DE ABUSO NO ESTADO DO PARANÁ DE 2018 A 2023

4. DIETA CONTENDO 70% DE GLÚTEN ALTERA ALTURA DO EPITÉLIO PROSTÁTICO

5. TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO NANOENCAPSULADO PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

6. ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA APÓS ENXERTO DE BIOCERÂMICA ASSOCIADA A PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM CALVÁRIAS DE RATOS *WISTAR*

7. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE APÓS O USO DE FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO (BCP) OBTIDO DE OSSOS DE PEIXES PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA

8. ESTUDO DO EFEITO GENOTÓXICO DE AGROTÓXICOS EM MULHERES DA AGRICULTURA FAMILIAR

9. ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs5743836 NO GENE *TLR9* NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

10. PRÉ-CAQUEXIA E CAQUEXIA AUMENTA O TAMANHO DE NEURÔNIOS NITRÉRGICOS EM CAMUNDONGOS COM CÂNCER INDUZIDO

11. SCAFFOLDS IMPREGNATED WITH METHYLENE BLUE: A NEW APPROACH FOR THE TREATMENT OF *FUSARIUM OXYSPORUM* INFECTIONS

12. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE PRIMERS PARA ANÁLISE DAS PRINCIPAIS REGIÕES DE INTERESSE CLÍNICO DO GENE ASXL1 ASSOCIADO A NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

13. ANÁLISE DA INCOMPLETUDE DOS DADOS DAS NOTIFICAÇÕES DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SRAG) POR HOSPITAIS SENTINELAS DO ESTADO DO PARANÁ NO ANO DE 2023

14. AVALIAÇÃO DE UM DERIVADO DE SEMICARBAZONA FRENTE A BACTÉRIAS GRAM POSITIVA, NEGATIVA E CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*

15. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA FORMAÇÃO DE OSSO NOVO NO ALVÉOLO DENTÁRIO APÓS EXODONTIA E ENXERTO COM BIOMATERIAIS A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO

16. IMPACTOS DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* NO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS BALB/C

17. QUERCETINA E *Bifidobacterium animalis* AMENIZAM ALTERAÇÕES DESENCADEADAS PELO DMH NA ALTURA EPITELIAL PROSTÁTICA

18. AS CONSEQUÊNCIAS COGNITIVAS PROMOVIDAS PELA SÍNDROME PÓS-COVID E SUA CORRELAÇÃO COM A ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS

19. AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE INH CONTRA CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* RESISTENTES

20. ATIVIDADE DA HIPERICINA EM PARASITOS, FUNGOS E BACTÉRIAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

21. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A INFECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* SOBRE AS FIBRAS COLÁGENAS DO CÓLON EM CAMUNDONGOS BALB/C

22. CARACTERIZAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DA ERITROSINA B EM ASSOCIAÇÃO À POLÍMEROS SOBRE *Trichophyton rubrum*

23. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RIFAMPICINA ASSOCIADA COM TIMOL EM *Mycobacterium kansasii*

24. ESCORPIONISMO: PANORAMA DE ACIDENTES NO PARANÁ DE 2019 A 2023 ATIVIDADE DO TERMOGEL DE *Curcuma longa* E ÓLEO ESSENCIAL DE *Pectis brevipendunculata* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L) amazonensis*

25. POLIMORFISMO DO GENE *GSTP1* OBSERVADO EM AGRICULTOR FAMILIAR E SUA RELAÇÃO COM O CONSUMO DE BEBIDAS ALCÓOLICAS

26. DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE PARA ANÁLISE IN-SILICO DA LIGAÇÃO HLA-PEPTÍDEO: PROVA DE CONCEITO E APLICAÇÕES NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE

27. IMPACT OF NUTRITIONAL CONDITIONS ON *Candida albicans* BIOFILM FORMATION

28. BIOMARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM VOLUNTÁRIOS PRATICANTES DE MEDITAÇÃO TRANSCENDENTAL NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ: UM ESTUDO PRELIMINAR

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

Resumos Expandidos

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

RNA VIABILITY TIME AND THE IMPACT OF FREEZING ON CDNA BY QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL SAMPLES

Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka[1]; Guilherme Castellani[2]; Matheus Braga[1]; Julyane Schavaren[2]; Quirino Alves de Lima Neto[3]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[3].

[1] PhD Student, Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Maringá, PR

[2] Master's Student, Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Maringá, PR

[3] Faculty Member, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: aleiayamanaka@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Ribonucleic acid (RNA) is a fundamental biomolecule involved in various cellular processes. The pathway for protein synthesis begins with the synthesis of messenger RNA (mRNA) from the DNA template strand, followed by the transport of amino acids (by transfer RNA, or tRNA) to the ribosome's two subunits (ribosomal RNA, or rRNA). Therefore, RNA is a key mediator between DNA and protein synthesis (1). Additionally, RNA is directly involved in the regulation of gene expression. The identification of numerous non-coding RNAs (ncRNAs) has greatly expanded our understanding of gene regulation, as these RNAs play critical roles in processes such as cell signaling, maintaining structural integrity, and catalyzing enzymatic reactions (2). Examples of ncRNAs are: miRNAs, about 22 nucleotides, are critical for regulating processes such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis (3); long non-coding RNAs (lncRNAs), which more than 200 nucleotides in length and are involved in chromatin modification, transcriptional regulation, and mRNA stability (4); small nucleolar RNAs (snoRNAs), which participate in the chemical modification of ribosomal RNA; and Y RNAs, which are associated with DNA replication and RNA quality control (5).

Given their diverse functions within the organism, RNAs are ubiquitous across all cell types, including those of the immune system. A specific group of cells, known as peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which include lymphocytes (T cells, B cells, and natural killer cells), monocytes, and dendritic cells, play a pivotal role in immune responses, such as antigen recognition and inflammation regulation, making them an ideal model for studying gene expression, particularly the regulatory functions of ncRNAs in both healthy and diseased states (6). Moreover, PBMCs are often analyzed to uncover gene expression patterns that contribute to immune dysregulation. Non-coding RNAs, including miRNAs and lncRNAs, have been shown to influence immune pathways by modulating cytokine production, lymphocyte activation, and immune cell differentiation (7). Due to their central role in the immune system, PBMCs offer a valuable opportunity to investigate RNA expression and its regulatory mechanisms.

Despite their potential, manipulating RNA poses significant technical challenges, especially regarding its stability. RNA is highly susceptible to degradation, and improper handling during collection, processing, or storage can compromise its quality and quantity. This is particularly relevant in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) experiments, where degraded RNA or improperly stored complementary DNA (Cdna) can result in variability in gene expression measurements (8). Ensuring RNA integrity and optimizing cDNA storage conditions, such as minimizing freeze-thaw cycles, are critical steps for achieving reliable qPCR results (9). Thus, the objective of this study was to determine the RNA viability time after collection and the impact of cDNA freezing on qPCR analysis. The use of PBMCs, which serve as a rich source of both coding and non-coding RNAs, provides valuable insights into best practices for preserving RNA integrity, a critical factor for molecular analyses.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Total RNA extraction

About two mL of peripheral blood samples were collected and processed to obtain PBMCs through density gradient separation using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA), following the manufacturer's recommendations. After cell sampling, total RNA was extracted using the TRIzol® LS method (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. To determine the RNA viability time, blood was stored at 4°C, PBMCs samples and RNA extraction were performed at distinct time points: t0=0h, t1=2h, t2=4h, t3=8h, and t4=24h after collected.

To determine the quantity of the obtained RNA, the concentration of total RNAs was analyzed by optical density at 260 nm and 280 nm using a NanoDrop 2000® spectrophotometer (Thermo Scientific). To evaluate the quality of the extracted RNA, an aliquot of RNA was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide.

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the State University of Maringá (CAAE: 27723114.0.0000.0104).

2.2. DNase I treatment and conversion to cDNA

Following RNA extraction, samples were treated with RNase-free DNase I (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) to digest both single-stranded and double-stranded genomic DNA. This step is a standard procedure prior to RT-qPCR, as the presence of DNA is regarded as a contaminant."

The reverse transcription reaction was conducted using the purified total RNA obtained from the previous step to synthesize cDNA with random primers, using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™ Foster City, CA, USA).

The validation of cDNA was performed using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers targeting the messenger RNA that encodes the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). PCR amplification was performed in a total volume of 10 µL mixture containing 10 ng cDNA, 1X PCR buffer, 1.5 mM of $MgCl_2$, 0.25 mM of each dNTPs, 0.25 mM of sense and antisense GAPDH primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA). PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose with SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen LifeTechnologies,Grand Island,NY, USA).

2.3. Determination of the Cycle threshold by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Following the successful validation of the obtained cDNA, qPCR was conducted targeting the GAPDH mRNA to accurately determine the Cycle threshold (Cq), critical step to measure of gene expression levels. Primer sequences for GAPDH were sense 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' and antisense 5'-CCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG-3'. qPCR amplification was performed in triplicate in a total volume of 10 µL mixture containing 5 ng cDNA, 600 mM of each primer, 1X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™ Foster City, CA, USA). The cycles were performed on the StepOnePlus™ System (Thermo Scientific): two-minute cycle at 50°C; two-minute cycle at 95°C; 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 58°C and 30 seconds at 72°C. The melting curve was performed 25 seconds at 95°C, one-minute at 60°C AND 15 seconds at 95°C.

To evaluate the impact of cDNA freezing on its stability and functionality, three samples were compared: fresh sample (t0) and sample that had been stored at -20°C for one year (t1).

3. RESULTS

3.1. Viability time of RNA extracted from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Temporal and storage conditions of a sample represent critical determinants in ensuring the requisite quality and quantity of RNA, given its increased instability in comparison to DNA. At time point t0, RNA purification demonstrated efficacy, yielding a concentration of 115.8 ng/µL and a 260/280 ratio of 2.04. Similarly, the concentrations and their respective 260/280 ratios at subsequent time points were as follows: t1 = 134.7 ng/µL, 2.11; t2 = 137.9 ng/µL, 2.09; t3 = 31.3 ng/µL, 2.15; t4 = 79.4 ng/µL, 2.15. As time progresses, a diminution in RNA concentration and the 260/280 ratio is observed, indicating a decline in the quality of the material obtained.

RNA was assessed by gel electrophoresis, revealing a characteristic smear typical of total RNA samples, in addition to two distinct bands corresponding to ribosomal RNA, identified as 28S and 18S (Figure 1).

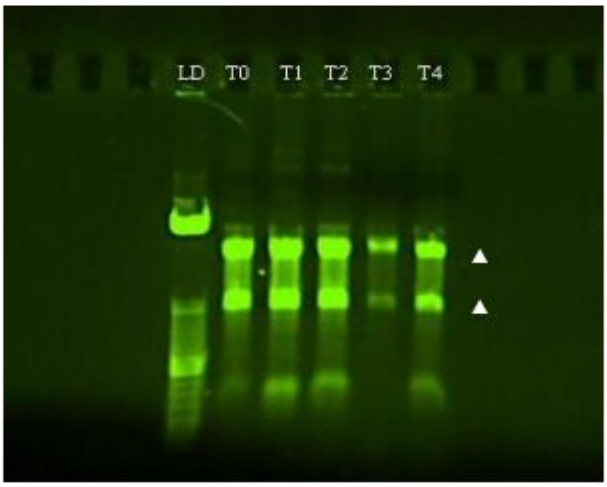


Figure 1: RNA band patterns formed after different extraction times in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). LD: 50 bp molecular weight marker; t0=0h; t1=2h; t2=4h; t3=8h; t4=24h. The arrow indicates a band 18S and 28S.

3.2. Validation of cDNA

To ensure the reliability of the results in the subsequent step, a PCR using cDNA was performed. This test allows for the detection of potential DNA contamination, in case the DNase I treatment was ineffective, resulting in the formation of a 1755 bp fragment. Furthermore, the successful conversion of RNA to cDNA can be verified by the presence of a 123 bp fragment on the agarose gel (Figure 2).

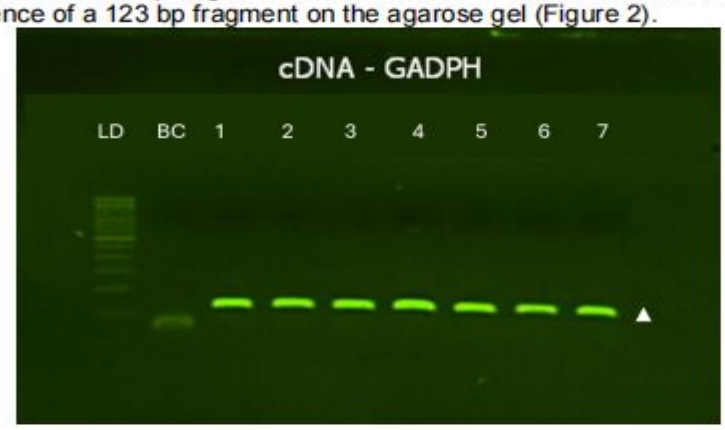


Figure 2: Polymerase chain reaction (PCR) for the GAPDH gene in cDNA samples. LD = 50 bp molecular weight marker; BCO = negative reaction control; the arrow indicates a band with a 123 bp fragment.

3.3. Impact of freezing on cDNA

cDNA is more stable than RNA, making it more suitable for long-term storage. Therefore, we evaluated the impact of freezing on its stability. The averages Cq for the fresh cDNA samples were 19.226, 19.654,21.953, 19.526 and 19.628. Results similar have been observed in frozen cDNA samples: 18.786, 19.523, 22.201, 20.354, 21.032 (Table 1).

Table 1. Determination of the Cycle threshold (Cq) by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of fresh sample and sample that had been stored for one year.

ID sample	Condition	Cq	Average Cq	Condition	Cq	Average Cq
1	t=0	19.437 19.143 19.099	19.226	t=1	18.569 18.846 18.944	18.786
2	t=0	19.954 19.462 19.545	19.654	t=1	19.605 19.466 19.499	19.523
3	t=0	21.959 21.926 21.974	21.953	t=1	22.361 22.057 22.186	22.201
4	t=0	19.428 19.652 19.498	19.526	t=1	20.754 20.104 20.204	20.354
5	t=0	19.418 19.747 19.718	19.628	t=1	21.406 20.965 20.726	21.032

Cq: Cycle threshold, t=0: fresh cDNA samples; t=1: frozen cDNA samples.

4. DISCUSSION

The determination of the viability time of a sample after collection for extraction can provide crucial parameters for future research, as well as minimize potential biases. In our results, it was observed that the high yield and quality of RNA were maintained for up to 4 hours post-collection in PBMC samples stored at 4°C. After this period, the RNA concentration decreased to 31.3 ng/µL. Nevertheless, the 260/280 ratio remained above 2.0, indicating the presence of RNA in the solution with low DNA contamination, which was corroborated by agarose gel analysis. The presence of a smear on the gel suggests that the RNA extraction was successful, reflecting the broad diversity of total RNA sizes present in the cells. The 18S and 28S bands indicate that the recovered material has structural integrity, suggesting that the RNA extraction was consistent. However, agarose gel analysis provides a subjective and qualitative assessment of the integrity of the obtained RNA. To obtain quantitative data on the integrity, recovery, and purity of the RNA, the material should be subjected to capillary electrophoresis, allowing for the determination of the RIN (RNA Integrity Number) and eliminating individual interpretations in RNA quality control.

RNA should be stored at extremely low temperatures, ideally below -80°C, in accordance with manufacturer recommendations to prevent degradation. Elevated temperatures significantly accelerate this process, with RNA exposed to 25°C exhibiting a half-life of 140 days, whereas at 60°C, the half-life is drastically reduced to 0.6 days. Furthermore, RNA length is negatively correlated with its stability, meaning that longer molecules are more susceptible to degradation. Regarding the concentration of the stored solution, it has been observed that increasing RNA concentration contributes to greater stability (10).

RNA is more susceptible to degradation by RNases due to intrinsic characteristics of its structure. The ribose present in RNA has a hydroxyl group (-OH) at the 2' position, which makes it more prone to non-enzymatic degradation due to its potential to cause cleavage in the backbone by attacking the adjacent phosphodiester bond. Additionally, a single RNA strand is less stable than a double strand of nucleic acids (10). Moreover, the presence of RNase can be a determining factor in the efficient recovery of RNA. RNase is an enzyme that degrades RNA molecules by catalyzing the cleavage of phosphodiester bonds between nucleotides. RNase is commonly found in cells and on the skin, and mishandling or improper storage can lead to RNA degradation (1).

Thus, an alternative approach may involve the storage of cDNA. Complementary DNA (cDNA) is synthesized from an mRNA template through the action of the enzyme reverse transcriptase, and this conversion is a fundamental step in gene expression studies. Although research indicates that cDNA may degrade more rapidly than mRNA—likely due to the formation of a cDNA–RNA hybrid complex that is more vulnerable to nuclease activity than RNA, which possesses a more complex secondary structure, and the post-transcription buffer conditions that enhance degradation (11), our findings did not show any evidence of degradation. A comparison of Cq values between freshly processed and one-year frozen samples revealed no significant differences.

5. CONCLUSION

Our results indicate that the quality and yield of RNA extraction using the TRIzol® LS reagent decrease over time, remaining viable up to 4 hours after collection in PBMCs samples. However, further studies are necessary to assess the impact of total RNA obtained after 8 hours on qPCR reactions. Regarding the effect of freezing cDNA samples, our data show no differences in the average Cq between fresh samples and those frozen for one year. Nevertheless, additional tests, including freeze-thaw cycles, are required to evaluate cDNA stability.

FUNDERS

CAPES and CNPq.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the volunteer participants of the project and the collaborators from the Immunogenetics Laboratory at the State University of Maringá.

REFERENCES

1. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, John Wilson, Tim Hunt. 6th ed. Porto Alegre: Santana, 2017.
2. Mattick JS. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. EMBO Rep. 2001;2(11):986-991
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009;136(2): 215-233.
4. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. Nat Rev Genet. 2014;15(1): 7-21.
5. Dieci G, Preti M, Montanini B. Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. Genomics. 2009;94(2): 83-88.
6. Kumar P, Banik S. Immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. Methods Mol Biol. 2015(1315): 127-138.
7. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. MicroRNA regulation of inflammatory responses. Annu Rev Immunol. 2010(28): 435-441.
8. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med. 2006;27(2-3):126-139.
9. Kong BW, Hudson N, Seo D, Lee S, Khatri B, Kim S, et al. Impact of cDNA synthesis and storage conditions on stability of qPCR reference genes for long term storage. PLoS One. 2017;12(2).
10. Chheda, U, Pradeepan S, Esposito E, Strezsak S, Fernandez-Delgado O, Kranz J. Factors Affecting Stability of RNA – Temperature, Length, Concentration, pH, and Buffering Species. Pharmaceutical Biotechnology, 2024; 113 (2): 377-385.
11. Stefan Wilkeninga S, Baderb A. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction: Methodical Analysis and Mathematical Model. J Biomol Tech, 2004; 15(2):107-111.

Keywords: Real-Time Polymerase Chain Reaction, RNA Stability, DNA Complementary.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CURCUMIN-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY ON BOTH FORMS OF *Sporothrix brasiliensis*

Ana Luiza de Paula Vasconcelos[1]; Juliana Aparecida Fernandes[2]; Glaucia Sayuri Arita[3]; Isis Regina Capoci[4]; Érika Seki Kioshima Cotica[4]; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça[4]

[1]Graduate student (Master's degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

[2]Graduate student (PhD degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

[3]PhD, Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

[4]Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: analuizapvasconcelos@gmail.com

1. INTRODUCTION

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by thermodimorphic fungi of the genus *Sporothrix*, with high prevalence in Latin American countries, especially Brazil (1, 2). It is currently listed as one of the major neglected tropical diseases related to the skin (cutaneous NTDs) for 2021-2030 by the World Health Organization (3). Sporotrichosis is not a notifiable disease at the national level, being mandatory only in some states (4). Transmission can occur through traumatic inoculation of contaminated organic matter or through bites and scratches from contaminated cats, the latter is associated with the species *Sporothrix brasiliensis* (1, 5).

Cutaneous or lymphocutaneous lesions are the most common clinical forms, but systemic involvement can occur, affecting the central nervous system, lungs, bones; or also, presentation of mucosal and immunoreactive forms (6). Conventional treatment is carried out with itraconazole (the drug of choice) or with potassium iodide, terbinafine and amphotericin B, depending on the clinical form and severity of the case. The average duration of treatment is three to four months (6, 7). Prolonged treatment favors the occurrence of important drug interactions as well as side effects and also increases the chance of the etiological agent developing resistance to antifungal drugs (8). In this regard, there is an urgent need for the study and knowledge of alternative therapies such as cryotherapy and photodynamic therapy (PDT) (9, 10).

PDT is a treatment with anti-cancer and antimicrobial potential that has been used successfully in various areas of medicine such as gynecology, urology, oncology and dermatology. Its operating principle is based on three key components: presence of molecular oxygen, photosensitizer (PS) and light with appropriate wavelength; which, combined, are capable of eliciting the death of target cells through mechanisms that are not yet fully understood (11). PDT has great potential for the topical treatment of sporotrichosis because the cutaneous and lymphocutaneous clinical forms are the most prevalent (6, 12). Although there are already some articles demonstrating the activity of PDT against *Sporothrix* spp. (10, 13-17), more studies are needed to understand the potential therapeutic action and the various combinations of PS and light. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of PDT with CUR in plancktonic cells and mature biofilms of filamentous and yeast forms of *S. brasiliensis* isolates.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Fungal isolates and thermoconversion

Twenty isolates in filamentous and yeast form of *Sporothrix brasiliensis* from the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) were used (18), maintained in Mycosel medium in a BOD incubator at 25 °C in the Medical Mycology Laboratory of the State University of Maringá (UEM). For thermoconversion, an adjusted inoculum of 1 x 10^5 conidia/mL in brain heart infusion (BHI) broth medium supplemented with 2% glucose and pH 7.8 was shaken at 150 rpm at 37 °C for 7 days. After this period, an aliquot of the growth was transferred to a new medium and shaken under the same conditions described. Subsequently, successive platings were made on BHI agar with incubation at 37 °C to obtain creamy white colonies with a yeast appearance.

2.2. Photosensitizer agent and light source

The photosensitizer was prepared by the Photodynamic Systems Research Center (NUPESF) of UEM. Curcumin powder (Inlab® Confiança) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma®) to prepare a curcumin stock solution at 5000 µM. Working concentrations (50-0.09 µM) were prepared by diluting the stock solution in sterile distilled water. The light source consisted of a system of LEDs with a wavelength of 450 nm.

2.3. Preparation of the fungal inoculum

For filamentous inoculum, *S. brasiliensis* isolates were subcultured on Sabouraud Dextrose Agar medium with chloramphenicol and incubated for 7 days at 25 ºC. The growth was scraped in 0.85% saline and filtered through cotton to obtain the conidia. For the yeast form, the isolates were plated on BHI agar medium and incubated for 5 days at 37 ºC. The yeast colonies were dispersed in 0.85% saline. Conidia and yeast were counted using a hemocytometer on a common optical microscope. The inoculum was adjusted to 1 x 10^6 CFU/mL for the photoinactivation assay on planktonic cells and, for the biofilm assays, it was adjusted to 2.4 x 10^6 CFU/mL.

2.4. Photoinactivation in planktonic cells

To evaluate the antifungal activity of PDT, in a 96-well plate, curcumin (50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.56; 0.78; 0.39; 0.19 and 0.09 µM) was incubated together with the inoculum for 15 min in the dark. Then, irradiation was carried out at a fluence of 15.46 J/cm² for 15 minutes. Dark (inoculum with curcumin without light) and light (inoculum with light without curcumin) controls were performed. The Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was evaluated by plating aliquots from each well and was considered as a reduction in growth ≥ 3 logs compared to positive control. Colony forming units (CFU) were also counted, plating 20 µL of each concentration (Pure, dilutions 1:10 and 1:100), the results were evaluated by logarithmic reduction (log10). This experiment was carried out in duplicate and on both forms of the fungus, filamentous and yeast-like forms. Plating for the filamentous form was done on SDA and incubated at 25 ºC for 5 days, while for yeast it was done on BHI agar and incubated at 37 ºC for 5 days.

2.5. Photoinactivation in mature biofilm

For this experiment, for each form, two isolates were randomly chosen that had a high and low MFC. The medium used for biofilm formation was YPD (yeast extract, peptone and glucose) pH 6.5 for the filamentous form and BHI broth with 2% glucose and pH 7.8 for yeast. For biofilm formation, in a 24-well plate, 500 µL of the inoculum prepared with medium was added to each well. For the filamentous form, the adhesion time was 6 hours with incubation at 25°C and, for the yeast form, the adhesion was 24 hours at 37 °C (Cite articles here). After adhesion, the medium was removed, the wells were washed twice with 250 µL of PBS (Phosphate buffered saline) and 500 µL of fresh medium was added. The plate was incubated again until 72 hours after the start of biofilm formation. With the biofilm formed, the medium was removed and washed 1x with PBS. PDT was performed with concentrations of MFC, 2x MFC, 4x MFC and 50 µM and the parameters (incubation time, irradiation time and fluence) are the same as those used in the planktonic cell assay. For CFU, the contents of the wells were scraped and transferred to a 96-well plate for dilutions and plating. The evaluation of the total biomass of the biofilm was performed by fixing the fungal growth with methanol, staining with crystal violet, washing with distilled water and resolubilizing the dye with 33% acetic acid.

2.6 Statistical analysis

The results of antifungal activity of PDT with CUR were analyzed using Prism 8.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) and unpaired t-test. Values were considered significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

The MFC values for photoinactivation in planktonic cells in the filamentous and yeast forms of *S. brasiliensis* are shown in Table 1. The combination of PDT with CUR demonstrated fungicidal efficacy against all isolates. The concentrations of CUR ranging from 0.39 to 12.5 μM and from 0.09 to 6.25 μM for the filamentous and yeast-like forms, respectively. The isolates chosen to perform the filamentous biofilm tests were 8761/1 (high MFC) and 8678 (low MFC). The yeast biofilm was performed with isolates 8854/1 (high MFC) and 8729 (low MFC).

The CFU and biomass assays for mature biofilm are shown in Figure 1. When compared with the positive control, the concentrations that demonstrated statistical difference were: 8761/1 had a reduction of 2.97 log_{10}CFU/mL for 2x MFC. while 8854/1 had reductions of 0.88: 0.89 and 3.27 log_{10}CFU/mL for the concentrations of MFC, 2x MFC and 4x MFC, respectively. For all isolates, the 50 μM concentration was able to cause a reduction of >3 log_{10} in CFU, with statistical significance compared to the control. There was no statistical difference for crystal violet absorbances between tested concentrations and the control in the four isolates tested (Figure 1E-1H). However, it is possible to observe that isolate 8678 had higher absorbance values when compared to the other three isolates (Figure 1F).

Table 1. Minimum fungicidal concentration for *S. brasiliensis* isolates in filamentous and yeast forms

Sporothrix brasiliensis strains	MFC mold form (μM)	MFC yeast form (μM)
9362/1	3.125	0.09
8639/1	3.125	0.09
8862/1	6.25	0.39
8664/3	6.25	1.56
9090/1	6.25	1.56
8761/1	12.5	0.09
8488	3.125	0.39
8648	3.125	1.56
8718	0.78	0.09
8854/1	3.125	6.25
8887	3.125	6.25
8695	0.78	1.56
8723/1	0.39	1.56
8678	0.78	0.39
8547	0.78	3.125
8881/2	3.125	3.125
9345	1.56	3.125
8729	1.56	0.09
8726	1.56	1.56
8756/1	1.56	3.125

MFC: Minimum fungicidal concentration, it was determined by the first concentration of curcumin that there was a reduction of ≥3 logs when compared to the positive control

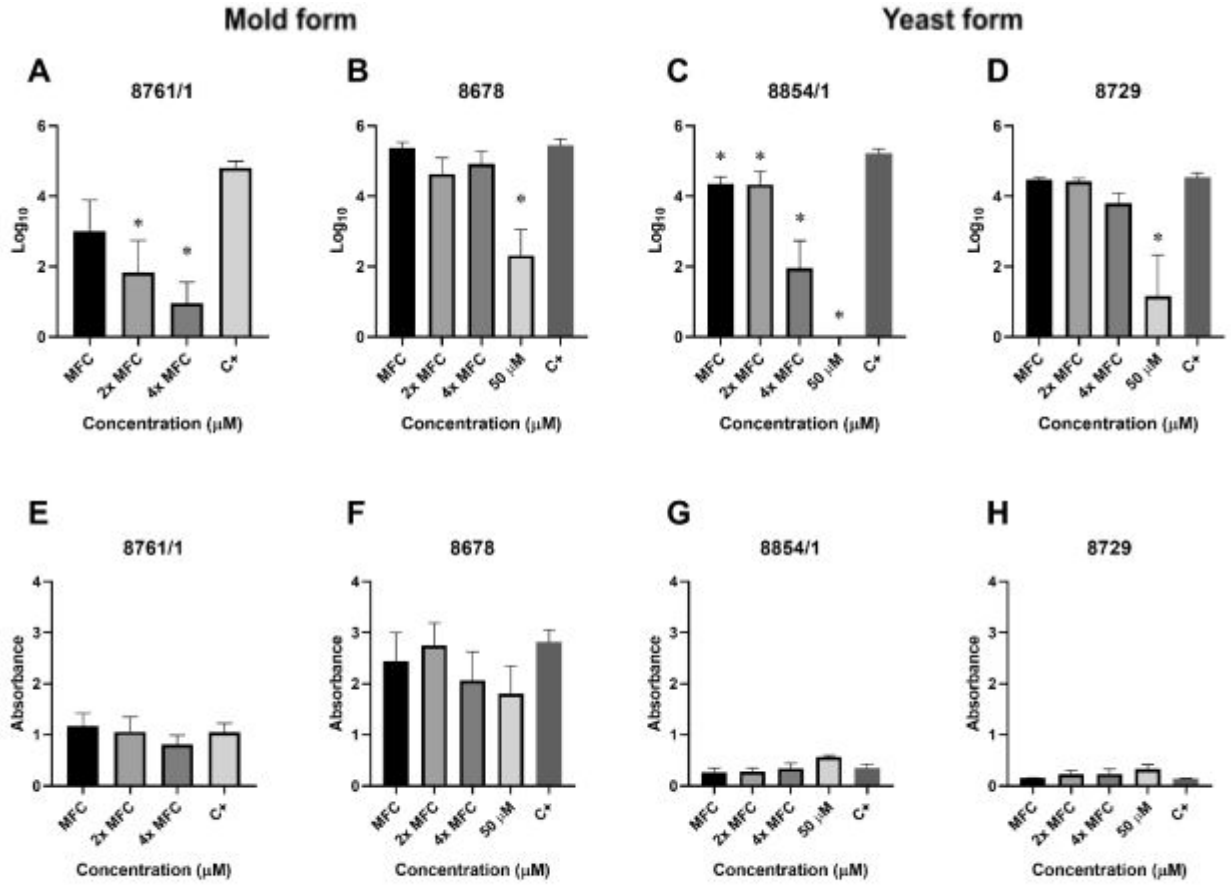


Figure 1. Effect of PDT with CUR on mature biofilm in both forms of *S. brasiliensis*. (A-D) Colony forming units (CFU) for mold form (A, B) and yeast form (C, D). (E-F) Total biofilm biomass for mold

4. DISCUSSION

Our research group has conducted an investigation into the efficacy of photodynamic therapy (PDT) with curcumin (CUR) in the treatment of *S. brasiliensis* (10). The results of this investigation have yielded promising outcomes. In this new work, we undertake a more detailed investigation with the aim of gaining a deeper understanding of the fungicidal action of PDT with CUR. Our results showed that PDT with CUR has fungicidal activity for all tested isolates and in both forms, filamentous and yeast. The thermodimorphic characteristic of the *Sporothrix* genus encourages investigations that expand knowledge about both morphological forms (1-5).

The results of this work show that the yeast form proved to be more susceptible than the filamentous form to PDT with CUR, as the CFM concentration was lower, ranging from 0.09 to 6.25 µM for the yeast form and ranging from 0.39 to 12.5 µM for the filamentous form. It is important to highlight that 0.09 µM was the lowest concentration tested and this MFC value was obtained for 20% of the yeasts. This greater susceptibility of *Sporothrix* spp. yeasts to PDT was also observed for *S. globosa* yeasts with the PS 5-aminolevulinic acid and red light (633 nm) (17). The potential of CUR as a photosensitizer for the treatment of *Sporothrix* has yet to be fully explored, with minimal research having been conducted in this area. Our research group has focused its efforts on investigating the biological variability of this active ingredient in the context of different infections, as evidenced by the findings of various studies (19-21).

Biofilm is an important virulence factor for microorganisms, conferring resistance to the host's immune system and to the antimicrobial agents used in treatment (22). Therefore, knowledge of the action of PDT on *Sporothrix brasiliensis* biofilms is extremely important for understanding the therapeutic potential of PDT against this fungus. This context may be directly linked to the structure of ulcerated lesions that occur in patients with Sporotrichosis. Interestingly, the clinical isolates tested have different potential to form biofilm. Knowing that biofilm is a complex structure, which consists of viable cells and extracellular matrix, we see that isolates in the filamentous form have a more organized biofilm with a larger extracellular matrix than yeasts. And among all isolates tested for biofilm, 8678 has incredible cell and matrix viability. The variability among isolates is a positive point of this work, which showed an in-depth investigation into a large number of clinical isolates of *S. brasiliensis*. To evaluate PDT on formed biofilm, two isolates were randomly chosen for each morphology, one with a high MFC value and the other with a low MFC. In general, PDT with CUR was efficient in acting on cell viability in mature biofilm of both forms of *Sporothrix*. For isolates in the mycelial form, the isolate with high MFC for planktonic cells had the most sensitive biofilm to PDT for the concentrations tested, with a statistically significant reduction when compared to the control for the concentrations 2x MFC and 4x MFC (Figure 1A). The isolate with low MFC obtained a significant logarithmic reduction only at the concentration of 50 µM (Figure 1B). For yeast biofilms, a similar behavior was observed and the isolate with high MFC was also more sensitive and had a statistically significant reduction for all concentrations tested (MFC, 2x MFC, 4x MFC and 50 µM) when compared to the control (Figure 1C). The low MFC isolate for yeast also only showed significant reduction at 50 µM (Figure 1D). Despite reaching fungal cells and decreasing or eliminating viability, PDT with CUR was not able to decrease total biomass assessed by crystal violet. The evaluation of the total biomass of formed biofilms for all isolates showed no statistical difference for any of the tested concentrations when compared to the positive control (Figure 1E-1H), which can be explained by the PDT intervention being carried out in minutes on a formed biofilm, with no subsequent incubation time after treatment. Studies evaluating other interventions on *Sporothrix* biofilm usually leave the test treatment in contact with the biofilm for hours or even days (23, 24).

Our study is the first to evaluate the action of PDT on mature biofilm of *Sporothrix* spp. Other studies evaluating the action of other treatments on *Sporothrix* biofilm use minimum inhibitory concentration (MIC) values, and also require high values to obtain considerable reductions in the biofilm (23-25). Another difference to be considered is that these studies leave the test substance in contact for hours (23-25) and the present study performed PDT in minutes and immediately afterwards the CFU and crystal violet techniques are performed and even so, PDT is able to reduce fungal growth in the biofilm.

5. CONCLUSION

PDT with CUR demonstrated effective *in vitro* antifungal activity against planktonic cells and biofilm of *S. brasiliensis* in both forms of the fungus, which demonstrates the promising character of PDT with CUR as an alternative treatment against sporotrichosis lesions. Additional studies are needed to better understand the mechanisms of action and the therapeutic scheme for the treatment of sporotrichosis in an animal model.

FUNDING

CAPES e CNPq.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the collaborators of the Medical Mycology Laboratory at the State University of Maringá.

REFERENCES

1. Orofino-Costa R, Macedo PMd, Rodrigues AM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. Anais brasileiros de dermatologia. 2017;92:606-20.
2. Gremião IDF, Oliveira MME, Monteiro de Miranda LH, Saraiva Freitas DF, Pereira SA. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. Emerg Infect Dis. 26. United States2020. p. 621-4.
3. World Health O. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030: World Health Organization; 2020.
4. Rabello VBS, Almeida MA, Bernardes-Engemann AR, Almeida-Paes R, de Macedo PM, Zancopé-Oliveira RM. The Historical Burden of Sporotrichosis in Brazil: a Systematic Review of Cases Reported from 1907 to 2020. Braz J Microbiol. 2022 Mar;53(1):231-44. PubMed PMID: 34825345. PMCID: PMC8882507. Epub 20211126. eng.
5. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic Sporothrix species. Mycopathologia. 2020 Oct;185(5):813-42. PubMed PMID: 32052359. Epub 20200212. eng.
6. Orofino-Costa R, Freitas DFS, Bernardes-Engemann AR, Rodrigues AM, Talhari C, Ferraz CE, et al. Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. An Bras Dermatol. 2022 Nov-Dec;97(6):757-77. PubMed PMID: 36155712. PMCID: PMC9582924. Epub 20220922. eng.
7. Poester VR, Basso RP, Stevens DA, Munhoz LS, de Souza Rabello VB, Almeida-Paes R, et al. Treatment of Human Sporotrichosis Caused by Sporothrix brasiliensis. J Fungi (Basel). 2022 Jan 10;8(1). PubMed PMID: 35050010. PMCID: PMC8779703. Epub 20220110. eng.
8. Waller SB, Dalla Lana DF, Quatrin PM, Ferreira MRA, Fuentefria AM, Mezzari A. Antifungal resistance on Sporothrix species: an overview. Braz J Microbiol. 2021 Mar;52(1):73-80. PubMed PMID: 32476087. PMCID: PMC7966672. Epub 20200531. eng.
9. Sethi S, Mehta S, Makkar V. Sporotrichosis in a Renal Transplant Patient: A Rare Case Report with a Review of the Literature. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2023 Jan 1;34(1):80-3. PubMed PMID: 38092718. Epub 20231212. eng.
10. Legabão BC, Galinari CB, Santos RSD, Bruschi ML, Gremião IDF, Boechat JS, et al. In vitro antifungal activity of curcumin mediated by photodynamic therapy on Sporothrix brasiliensis. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2023 Sep;43:103659. PubMed PMID: 37336466. Epub 20230617. eng.
11. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. Biomed Pharmacother. 2018 Oct;106:1098-107. PubMed PMID: 30119176. Epub 20180717. eng.
12. Legabão BC, Fernandes JA, de Oliveira Barbosa GF, Bonfim-Mendonça PS, Svidzinski TIE. The zoonosis sporotrichosis can be successfully treated by photodynamic therapy: A scoping review. Acta Trop. 2022 Apr;228:106341. PubMed PMID: 35131203. Epub 20220204. eng.
13. Gilaberte Y, Aspiroz C, Alejandre MC, Andres-Ciriano E, Fortuno B, Charlez L, et al. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: an in vitro and in vivo study. Photomedicine and laser surgery. 2014;32(1):54-7.
14. Nunes Mario DA, Denardi LB, Brayer Pereira DI, Santurio JM, Alves SH. In vitro photodynamic inactivation of Sporothrix schenckii complex species. Medical mycology. 2014;52(7):770-3.
15. de Paula Guirado GM, Navarro RS, Rossoni RD, Junqueira JC, dos Santos Feitosa L. In vitro reduction of pathogenic sporothrix schenckii fungus by photodynamic therapy. Mundo da Saude. 2017:138-43.
16. Li J, Zhu M, An L, Chen F, Zhang X. Fungicidal efficacy of photodynamic therapy using methylene blue against Sporothrix globosa in vivo and in vivo. European Journal of Dermatology. 2019;29:160-6.
17. Chen R, Song Y, Zhen Y, Yao L, Shi Y, Cui Y, et al. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy has effective antifungal activity against Sporothrix globosa in vitro. Mycoses. 2020;63(12):1311-20.

18. Boechat JS, Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gremião IDF, Machado ACdS, Oliveira RdVC, et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2018;113:185-96.
19. Ravazzi TPQ, de Jesus IM, de Oliveira Santos GP, Reis TA, Rosa LP, Rosa FCS. The effects of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with nanotechnology-applied curcumin and 450nm blue led irradiation on multi-species biofilms in root canals. Lasers Med Sci. 2023 Nov 6;38(1):254. PubMed PMID: 37932526. Epub 20231106. eng.
20. Zheng N, Xie Y, Zhou M, Liu Y, Xu H, Zeng R, et al. Utilizing the photodynamic properties of curcumin to disrupt biofilms in Cutibacterium acnes: A promising approach for treating acne. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2024 Feb;45:103928. PubMed PMID: 38070633. Epub 20231207. eng.
21. Yuan Y, Liu Q, Huang Y, Qi M, Yan H, Li W, et al. Antibacterial Efficacy and Mechanisms of Curcumin-Based Photodynamic Treatment against Staphylococcus aureus and Its Application in Juices. Molecules. 2022 Oct 21;27(20). PubMed PMID: 36296729. PMCID: PMC9612228. Epub 20221021. eng.
22. Martinez LR, Fries BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. Curr Fungal Infect Rep. 2010 Dec 1;4(4):266-75. PubMed PMID: 21660222. PMCID: PMC3109917. eng.
23. Brilhante RSN, de Aguiar FRM, da Silva MLQ, de Oliveira JS, de Camargo ZP, Rodrigues AM, et al. Antifungal susceptibility of Sporothrix schenckii complex biofilms. Med Mycol. 2018 Apr 1;56(3):297-306. PubMed PMID: 28595275. eng.
24. Borba-Santos LP, Nicoletti CD, Vila T, Ferreira PG, Araújo-Lima CF, Galvão BVD, et al. A novel naphthoquinone derivative shows selective antifungal activity against Sporothrix yeasts and biofilms. Braz J Microbiol. 2022 Jun;53(2):749-58. PubMed PMID: 35258797. PMCID: PMC9151959. Epub 20220308. eng.
25. Garcia LGS, de Melo Guedes GM, Fonseca X, Pereira-Neto WA, Castelo-Branco D, Sidrim JJC, et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of Sporothrix brasiliensis. Int J Biol Macromol. 2020 Jan 15;143:341-8. PubMed PMID: 31812752. Epub 20191206. eng.

Keywords: *Sporothrix*; photochemotherapy; curcumin.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

LEVANTAMENTO DE DADOS DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS HLA DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA DE MARINGÁ E REGIÃO

Ana Paula Sokolowski de Lima[1]; Matheus Braga[2]; Fernanda Pelisson Massi[3]; Larissa Danielle Bahls Pinto[4]; Bruna Karina Banin Hirata[4]; Quirino Alves de Lima Neto[4]; Joana Maira Valentini Zacarias[4]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[4]

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

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

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

[4]Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: anapaulasokolowskidelima@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Complexo Principal de Histocompatibilidade ou MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) foi descoberto em 1940, por Peter Gorer e George Snell, após um estudo de transplante de tecido em camundongos (1). Ele está localizado no braço curto do cromossomo 6, contendo mais de 35.000 alelos, registrados no banco de dados IMGT/HLA, o que permite a apresentação de um enorme repertório de peptídeos ao linfócito T, para a inicialização da resposta imune adaptativa (2,3).

Nos seres humanos, este complexo gênico é representado pelos genes do sistema leucocitário humano (HLA, do inglês, *human leukocyte antigens*), compreendendo os genes de classe I e II (4). As moléculas HLA de classe I são codificadas por genes HLA-A, -B, -C e são encontradas na superfície celular de todas as células nucleadas, com a principal função de exibir fragmentos de peptídeos para células T citotóxicas e células Natural killer (NK) (4). Os genes HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 e - DPB1 codificam as moléculas HLA de classe II, as quais apresentam os peptídeos aos linfócitos T helper. Ambas participam no processo de transplantes de órgãos e de células-tronco hematopoiéticas, além de estarem associadas a uma ampla gama de doenças (1).

Devido à complexidade dos genes HLA, houve a necessidade da implementação de métodos mais robustos para elucidar de forma detalhada a composição gênica do HLA, como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), permitindo a caracterização em alta resolução do HLA nas diversas populações em todo mundo, diminuindo ambiguidades alélicas e estabelecendo frequências alélicas e haplotípicas da população que até então, era limitada aos métodos clássicos de sequenciamento (5–8).

O sistema HLA é o sistema genético mais polimórfico do genoma humano, ele é formado por glicoproteínas com estruturas e funções distintas, o que aumenta a diversidade de moléculas HLA disponíveis (1). Em decorrência dos polimorfismos nos genes HLA, as diversas populações podem ser estudadas com relação às frequências alélicas que apresentam, com o objetivo de caracterização genética dessas populações, principalmente, no âmbito dos transplantes, pois a frequência dos alelos HLA e o padrão de haplótipos são característicos de cada etnia e o conhecimento do polimorfismo populacional é de importância para a compreensão da distribuição alélica na população estudada e associações com doenças (1,9).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as frequências de alelos e haplótipos de 11 *loci* HLA em indivíduos cadastrados como doadores voluntários de medula óssea (DVMOs), cujas amostras foram recebidas e processadas pelo Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM) entre os anos de 2021 e 2024.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 População do estudo

Este estudo incluiu 3.000 amostras de DVMOs inscritos de 2021 a 2024 para realização de exame de tipagem HLA na rotina do laboratório, o qual segue as normas das Portarias vigente (RDC N° 61 de 01 de dezembro de 2009, Portaria N° 1.229 de 15 de junho de 2021 e Portaria N° 685 de 16 de junho de 2021) e Vigilância Sanitária do município de Maringá, após envio das amostras pelo Hemocentro Regional de Maringá, Hemonúcleo Regional de Paranavaí e Unidade de Coleta e Transfusão de Cianorte que aplicam o termo de consentimento livre e esclarecido. Os doadores se autoidentificaram como brancos (65,8%), pardos (28,3%), pretos (3,1%), amarelos (2,7%) e não se autoindentificaram (0,1%). Foram coletadas amostras de 1.983 mulheres (66,1%) e 1.017 homens (33,9%). A idade média geral da coorte foi de 25,24 anos (variação de 18 a 35 anos) com desvio padrão de 4,94.

2.2 Amostras de sangue

As amostras de sangue dos DVMOs cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá, Hemonúcleo Regional de Paranavaí e Unidade de Coleta e Transfusão de Cianorte, foram encaminhadas ao LIG-UEM em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Elas foram registradas em um banco de dados no computador e congeladas em freezer -20ºC. O congelamento foi realizado em tubo de congelamento contendo 1 mL do sangue total e os tubos armazenados na caixa de congelamento.

2.3 Extração do material genético

A extração do DNA foi realizada a partir do sangue total. As amostras foram submetidas à extração com metodologia padronizada, utilizando kits Qiagen.

2.4 Concentração e pureza do DNA

Para avaliar a concentração e pureza do DNA, foram realizadas medidas no equipamento NanoDrop® 2000. A avaliação da pureza consiste na base da leitura da densidade óptica das amostras feitas pelo aparelho. Os procedimentos foram realizados mediante os comandos do *software*.

2.5 Metodologia de tipificação HLA

A tipificação HLA foi realizada pela técnica NGS (do inglês, *Next Generation Sequencing*) utilizando kits de genotipagem *All Type Fast* da One Lambda no iSeq™ 100 da Thermofisher, posteriormente os resultados foram analisados em *software* apropriado (TSV 3.0 e 3.1).

2.6 Registro dos resultados HLA no REDOMEWEB

Os resultados da tipificação do HLA de cada DVMO foram encaminhados para o REDOMEWEB pelo LIG-UEM por meio de uma planilha do tipo "csv", contendo o registro de doador de medula (DMR) e os HLA de classe I e II obtidos.

2.7 Atribuições de grupos de ambiguidade

Os alelos HLA com sequências de nucleotídeos que codificam a mesma sequência de proteína para os domínios de ligação de peptídeo (éxon 2 e 3 para HLA classe I e éxon 2 apenas para alelos HLA classe II) foram designados por um "P" ou "G" maiúsculo, que segue a designação do alelo de 2 campos do alelo de menor numeração no grupo.

2.8 Levantamento dos alelos e haplótipos HLA e análise estatística

O levantamento dos resultados da tipificação HLA foi realizado por meio de consultas aos livros de registros preenchidos no LIG-UEM. Já para os dados dos doadores: sexo, idade e etnia, foi utilizado o site REDOMEWEB para consulta. Dessa forma, através dos dados obtidos, foi confeccionada uma planilha do tipo Excel, contendo o DMR, sexo, idade, etnia, HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1, -DRB3/B4/B5, -DQA1 e -DPA1 e a seguir foi realizado o cálculo das frequências alélica e haplotípica, por meio do programa estatístico RStudio v. 4.2.1.

3. RESULTADOS

3.1 Frequência alélica

3.1.1 *Loci* de classe I: No total, 67 alelos distintos de classe I foram identificados durante o estudo; 18 alelos HLA-A, 30 alelos HLA-B e 19 alelos HLA-C. As frequências dos alelos mais comuns de classe I estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência de alelos HLA classe I observados em 3.000 DVMOs.

HLA	Contagem	Frequência
HLA-A*02:01:01	1.292	0,2153333
HLA-A*01:01:01	578	0,0963333
HLA-A*24:02:01	560	0,0933333
HLA-B*51:01:01	491	0,0818333
HLA-B*35:01:01	381	0,0635000
HLA-B*07:02:01	361	0,0601667
HLA-C*04:01:01	973	0,1621667
HLA-C*07:01:01	575	0,0958333
HLA-C*07:02:01	506	0,0843333

3.1.2 *Loci* de classe II: Os alelos de classe II apresentaram 107 alelos distintos. As frequências dos alelos mais comuns de classe II estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2: Frequência de alelos HLA classe II observados em 3.000 DVMOs.

HLA	Contagem	Frequência
DPA1*01:03:01	3.928	0,6546667
DPA1*02:01:01	859	0,1431667
DPB1*04:01:01	1272	0,2120000
DPB1*02:01:02	605	0,1008333
DQA1*05:05:01	822	0,1370000
DQA1*01:02:01	808	0,1346667
DQB1*05:01:01	724	0,1206667
DQB1*02:02:01	608	0,1013333
DRB1*07:01:01	759	0,1265000
DRB1*03:01:01	425	0,0708333
DRB4*01:03:01	799	0,1331667
DRB3*02:02:01	729	0,1215000

3.2 Frequências haplotípicas

Analisamos as associações de alelos e haplótipos contendo os 11 *loci* (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DPA1). Os principais haplótipos e suas frequências foram o HLA-A*01:01:01~B*08:01:01~C*07:01:01~DRB1*03:01:01~DQB1*02:01:01~DPB1*04:01:01~DQA1*05:01:01~DPA1*01:03:01 (0,003%), HLA-1*33:01:01~B*14:02:01~C*08:02:01~DRB1*01:02:01~DQB1*05:01:01~DPB1*04:01:01~DQA1*01:01:02~DPA1*01:03:01 (0,002%) e HLA-A*03:01:01~B*07:02:01~C*07:02:01~DRB1*15:01:01~DQB1*06:02:01~DPB1*04:01:01~DQA1*01:02:01~DPA1*01:03:01 (0,002%).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, caracterizamos alelos e haplótipos em alta resolução de uma grande amostra de DVMOs do sul do Brasil. O Brasil é o quinto maior país do mundo em área e o quinto mais populoso, com histórico genético heterogêneo. A declaração étnico-racial é, geralmente, tomada como critério de ancestralidade: Europeia, Africana, Nativa Americana e Leste-Asiático (10). A análise em NGS permite uma cobertura e sequenciamento detalhado de genes HLA, permitindo a detecção de variantes e alelos novos na qual, utilizando métodos moleculares de baixa resolução não seriam suficientes para a detecção. Os dados gerados a partir deste estudo fornecem ferramentas importantes para o entendimento da distribuição populacional, compatibilidade imunológica e a distribuição genética populacional.

Os alelos de classe I HLA-A*02:01:01 (25,1%), -B*51:01:01 (8,18%) e -C*04:01:01 (1,6%) foram os mais frequentes em nossa população, resultado semelhante aos achados do estudo realizado em Curitiba-PR no sul do Brasil (11). A população norte-americana é caracterizada por quantidade ampla dos grupos étnicos; com base no *website "AlleleFrequencies"*, foi possível realizar observações sobre a frequências alélica, sendo predominante o alelo HLA-A*02:01 (27%) em descendentes europeus e o alelo HLA-A*01:01 (26%), semelhante ao achado do estudo. O alelo HLA-B*07:02 foi o mais frequente em um estudo realizado no Sul do Brasil e o B*51:01 apresentou uma frequência de 5% em descendentes europeus. O alelo C*04:01, o mais prevalente do estudo, apresenta uma grande taxa na população afrodescendente, em descendentes da América Central.

As frequências de alguns alelos HLA de classe II foram semelhantes aos perfis descritos em populações europeias (12,13). Sendo o HLA-DPA1*01:03:01 (65,46%), -DPB1*04:01:01 (21,20%), -DQA1*05:05:01 (13,70%), -DQB1*05:01:01 (12,06%) e o -DRB1*07:01:01(12,65%) os mais prevalentes em nossa análise. O segundo alelo mais frequente, o HLA-DQA1*01:02:01 (13,46%), foi um dos alelos mais frequentes na população de Han (15,81%), na Oceania (45,8%) e na África Subsaariana (31,9%) (14). Os países da Europa e América do Norte apresentaram frequência maior que 80% para o alelo DPA1*01:03 (14,15) e, as frequências haplotípicas mais frequentes foram HLA-A*01:01:01~B*08:01:01~C*07:01:01~DRB1*03:01:01~DQB1*02:01:01~DPB1*04:01:01~DQA1*05:01:01~DPA1*01:03:01, diferente do encontrado em uma análise realizada no Sul do Brasil, onde o haplótipo predominante foi HLA-A*02-B*44 (4,7%), -B*35-C*04 (10,6%), -A*01-B*08-C*07 (4%), -A*01-B*08-DRB1*03 (3%), -DRB1*07-DQB1*02 (11,6%) e -DQB1*03-DPB1*04 (16%) (16).

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo abrange as características de 11 *loci HLA*, sendo eles o HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1 e DRB3/4/5 em nível de alta resolução de pacientes DVMOs da região noroeste do estado do Paraná no Brasil. Nossos dados destacam a diversidade de alelos entre as diferentes etnias em um determinado território. Estas descobertas têm o potencial de contribuir significativamente para estudos de associações do HLA com doenças e em transplantes.

FINANCIADORES

CAPES, CNPq e LIG-UEM.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. Tissue Antigens [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2024 Aug 16];64(6):631–49.
2. Boquett JA, Bisso-Machado R, Zagonel-Oliveira M, Schüler-Faccini L, R Fagundes NJ, Juliano Boquett CA. HLA diversity in Brazil. 2019 [cited 2024 Sep 8]; Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tan.13723
3. Suri A, Lovitch SB, Unanue ER. The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. Curr Opin Immunol [Internet]. 2006 Feb [cited 2024 Aug 16];18(1):70–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16316750/

4. Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai. Minha Biblioteca: Imunologia Celular e Molecular [Internet]. [cited 2024 Jul 16].

5. Kim JY, Lee SY, Kim GG, Song HI, Jang MM, Lee CS, et al. Validation and application of new NGS-based HLA genotyping to clinical diagnostic practice. HLA. 2023 May 1;101(5):496–506.

6. Creary LE, Gangavarapu S, Mallempati KC, Montero-Martín G, Caillier SJ, Santaniello A, et al. Next-Generation Sequencing reveals new information about HLA allele and haplotype diversity in a large European American population. Hum Immunol [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2024 Sep 8];80(10):807. Available from: /pmc/articles/PMC6778037/

7. Cornaby C, Schmitz JL, Weimer ET. Next-generation sequencing and clinical histocompatibility testing. Hum Immunol. 2021 Nov 1;82(11):829–37.

8. Gabriel C, Fürst D, Faé I, Wenda S, Zollikofer C, Mytilineos J, et al. HLA typing by next-generation sequencing – getting closer to reality. Tissue Antigens [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2024 Aug 16];83(2):65–75. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tan.12298

9. Montgomery RA, Tatapudi VS, Leffell MS, Zachary AA. HLA in transplantation. 2018 [cited 2024 Aug 11]; Available from: www.nature.com/nrneph

10. Racial Ambiguity among the Brazilian Population [Internet]. [cited 2024 Sep 8]. Available from: https://escholarship.org/uc/item/9182b929

11. Kay CSK, Scola RH, Arndt RC, Lorenzoni PJ, Werneck LC. HLA-alleles class I and II associated with genetic susceptibility to neuromyelitis optica in Brazilian patients. Arq Neuropsiquiatr [Internet]. 2019 May 13 [cited 2024 Sep 8];77(4):239–47. Available from: https://www.scielo.br/j/anp/a/Lv6D7cN8pJ4ynmBzvDYJNry/?lang=en

12. Creary LE, Gangavarapu S, Mallempati KC, Montero-Martín G, Caillier SJ, Santaniello A, et al. Next-Generation Sequencing reveals new information about HLA allele and haplotype diversity in a large European American population HHS Public Access. Hum Immunol. 2019;80(10):807–22.

13. Creary LE, Fernández-Viña MA. High-resolution HLA allele and haplotype frequencies in several unrelated populations determined by next generation Corresponding authors.

14. Tao S, You X, Chen N, Dong L, Zhao S, He Y, et al. The characteristic of HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, and HLA-DPB1 alleles in Zhejiang Han population. Immunogenetics [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 8]; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39107575/

15. Caragea AM, Ursu RI, Maruntelu I, Tizu M, Constantinescu AE, Tălăngescu A, et al. High Resolution HLA-A, HLA-B, and HLA-C Allele Frequencies in Romanian Hematopoietic Stem Cell Donors. Int J Mol Sci [Internet]. 2024 Aug 14;25(16):8837. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/25/16/8837

16. Mayer Leite JL, Getz J, Nasser Dornelles L, Oliveira LA de. Frequências Alélicas E Haplotípicas De Genes Hla Em Doadores De Células-Tronco Hematopoiéticas Cadastrados Em Laboratório Do Paraná. Cadernos da Escola de Saúde. 2023 Dec 5;23(2):34–50.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

NOVOS ALELOS HLA-B IDENTIFICADOS NO LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Anthony Marçal Leão de Oliveira[1]; Fernanda Pelisson Massi[2]; Quirino Alves de Lima Neto[3]; Bruna Karina Banin Hirata[3]; Larissa Danielle Bahls Pinto[3]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[3].

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

[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Departamento de Biomedicina e Análises Clínicas, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[3]Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: anthonymarcaloliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA, sigla do inglês para *Human Leukocyte Antigens*) são glicoproteínas apresentadoras de antígeno codificadas por genes localizados no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, sigla do inglês para *Major Histocompatibility Complex*), cuja função principal é conferir proteção contra patógenos (1,2).

O MHC situa-se no braço curto do cromossomo 6, nele estão contidos os genes para a transcrição e tradução das moléculas HLA de classe I e classe II, além disso, os genes de algumas proteínas imunológicas auxiliares, por exemplo o Fator de Necrose Tumoral, também são encontrados nessa região (2).

Como mencionado no parágrafo anterior, as moléculas HLA são divididas em classe I e II, isso se deve a suas diferentes estruturas e modo de ação. O HLA de classe I é composto por 4 domínios extracelulares, sendo eles, α1, α2 e α3, ou simplesmente cadeia pesada, onde o domínio α1 é o mais próximo a região N-terminal e o α3 é o mais próximo a membrana celular, e também uma β2-microglobulina, ou cadeia leve (3,4). As moléculas HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) são expressas em todas as células nucleadas e apresentam peptídeos intracelulares processados para os receptores de células T (TCRs) de linfócitos $TCD8^+$ citotóxicos (1,3). Já o HLA de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP) é composto por duas cadeias proteicas α e β, cada uma com dois domínios extracelulares, onde os domínios α1 e β1 formam a fenda de ligação peptídica (3,4). Diferentemente das moléculas de classe I, o HLA de classe II possui uma expressão limitada a células apresentadoras de antígenos e linfócitos B e apresentam antígenos exógenos para os receptores de linfócitos $TCD4^+$ auxiliares (1,3).

Uma das principais características do HLA é seu alto nível de polimorfismo, isso pode conferir uma vantagem na detecção dos inúmeros patógenos existentes e suas variantes, entretanto, essa característica também pode levar a pessoa a desenvolver uma doença autoimune onde as células do sistema imunológico começam identificar o tecido próprio como maligno e destruí-lo (3).

Hoje, o estudo das moléculas HLA tem como objetivo otimizar os transplantes de células e órgãos, favorecendo maiores chances de sucesso, visto que, elas são as responsáveis pelas rejeições que acontecem durante os transplantes. Para reduzir as chances de um transplante mal sucedido é necessário que haja compatibilidade HLA entre o doador e o receptor, ou seja, histocompatibilidade, desse modo podemos dizer que quanto maior a compatibilidade menor serão os riscos (5).

Para identificar tal compatibilidade com precisão faz-se necessário o uso de técnicas robustas e de alto-rendimento, atualmente, a genotipagem do DNA para os *loci* HLA dos doadores e receptores é a maneira mais eficaz de se obter esses resultados, para isso, utilizam-se metodologias de sequenciamento do material genético, sendo as mais modernas classificadas como NGS (sigla do inglês para *Next-Generation Sequencing*, ou, Sequenciamento de Nova Geração) (6). Esta metodologia faz uso de equipamentos que são divididos em gerações, visto suas diferentes capacidades. A Primeira Geração de Sequenciadores baseia-se na técnica de sequenciamento de DNA desenvolvida por Frederick Sanger em 1977, e perdurou como padrão ouro por 30 anos. Entretanto, devido a certas limitações do sequenciamento de Sanger, tornou-se necessário a introdução de equipamentos mais avançados que suprissem tais demandas. Então, em 2005 foi introduzido no mercado o NGS, que cumpriu seu papel e revolucionou o campo da genética devido a sua capacidade de geração de dados extremamente superiores em relação ao seu antecessor (7).

Com isso, a tipificação HLA evoluiu exponencialmente, passando a catalogar milhares de novos alelos HLA em um curto período de tempo, tais alelos são utilizados para investigar a histocompatibilidade doador-receptor e ficam armazenados em bancos de dados genéticos internacionais, dentre eles, o *GenBank*, *European Nucleotide Archive* (ENA) e *DNA Data-Bank of Japan* (DDBJ) que cooperam entre si através da colaboração internacional de banco de dados de sequências de nucleotídeos, além disso, existe um banco de dados focado exclusivamente em alelos HLA, sendo ele o IPD-IMGT/HLA (6,8–12).

Dito isso, a proposta desse trabalho foi compilar todos os novos alelos HLA-B identificados por NGS no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM) e realizar a notificação dos mesmos aos bancos de dados para que assim esses alelos sejam catalogados mundialmente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A tipificação HLA faz parte da rotina do LIG-UEM, pois, o Laboratório é responsável pelo cadastramento de doadores voluntários de medula óssea (DVMO) da região metropolitana de Maringá no REDOME (Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea), além da tipificação HLA confirmatória de doadores e receptores de transplante de medula óssea e investigação dos novos alelos HLA identificados na rotina laboratorial. A realização dessas atividades é autorizada pelo Ministério da Saúde/Secretaria de Atenção Especializada à Saúde através da Portaria N°525, de 31 de Agosto de 2022 publicado no Diário Oficial da União em 06 de Setembro de 2022 (13). Dessa forma, as amostras utilizadas neste trabalho são provenientes dos DVMO cadastrados no REDOME durante os anos de 2022 a 2024.

O DNA genômico foi extraído das células brancas periféricas utilizando o Kit QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. A tipificação HLA foi realizada através da metodologia NGS com o equipamento iSeq 100, pertencente a plataforma Illumina, e kit de sequenciamento AllType™ FASTPlex™ NGS 11 *Loci* (One Lambda). Os dados gerados foram analisados utilizando o software Type Stream Visual versão 3.0.0 (One Lambda).

Os novos alelos identificados necessitam de confirmação de resultados através da execução de uma segunda metodologia de sequenciamento. Desse modo, foi realizado o sequenciamento de Sanger (PCR-SBT) utilizando o kit SeCore™ HLA (One Lambda) e equipamento ABI 3500xL (Applied Biosystems) ou Nanopore (sequenciamento de fragmentos longos) utilizando o kit NanoTYPER 24/11 e equipamento MinION (Oxford Nanopore Technology). Para analisar os dados desse novo sequenciamento foi empregado o software µType versão 7.3 (One Lambda) para o sequenciamento de Sanger e NanoTYPER® (Omixon) para sequenciamento Nanopore.

Após a confirmação dos novos alelos HLA, os dados referentes a eles, isso é, sequência genética, sequência de aminoácidos e mutação foram submetidos ao *GenBank* e sucessivamente ao IPD-IMGT/HLA para que assim recebessem sua nomenclatura e fossem catalogados corretamente.

3. RESULTADOS

Durante o período de Janeiro/2022 a Agosto/2024, um total de 3.515 amostras de DVMO foram sequenciadas no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, dentre elas foram identificados 20 novos alelos, onde 5 pertencem ao gene *HLA-B*, sendo eles, *HLA-B*18:226, HLA-B*39:03:02, HLA-B*40:543, HLA-B*44:373* e *HLA-B*35:20:03* (Tabela 1). Com exceção do alelo *B*35:20:03*, todos apresentaram mutações em éxons chave, isso é, éxon 2 e 3 que codificam a fenda de ligação peptídica para HLA de classe I (Figura 1).

Tabela 1. Descrição dos novos alelos *HLA-B* enaltecendo o alelo mais próximo, éxon, posição da mutação, a mutação, códon, troca de amino ácido e número de acesso no banco de dados.

Alelo HLA	Alelo Similar	Éxon	Posição	Mutação	Códon	Troca de Amino Ácido	GenBank
HLA-B*18:226	HLA-B*18:01:01:21	Éxon 3	834	T > A	130.2	Leucina > Glutamina	ON925002
HLA-B*39:03:02	HLA-B*39:03:01:01	Éxon 3	874	C > T	143.3	Treonina > Treonina	ON983762
HLA-B*40:543	HLA-B*40:04:01:01	Éxon 3	527	T > A	152.2	Valina > Ácido Glutâmico	OQ885051
HLA-B*44:373	HLA-B*44:03:01:02	Éxon 2	127	G > A	19.1	Ácido Glutâmico > Lisina	OQ418140
HLA-B*35:20:03	HLA-B*35:20:01	Éxon 4	687	C > A	205.3	Alanina > Alanina	PQ009210

Legenda: T = Timina, A = Adenina, C = Citosina e G = Guanina.

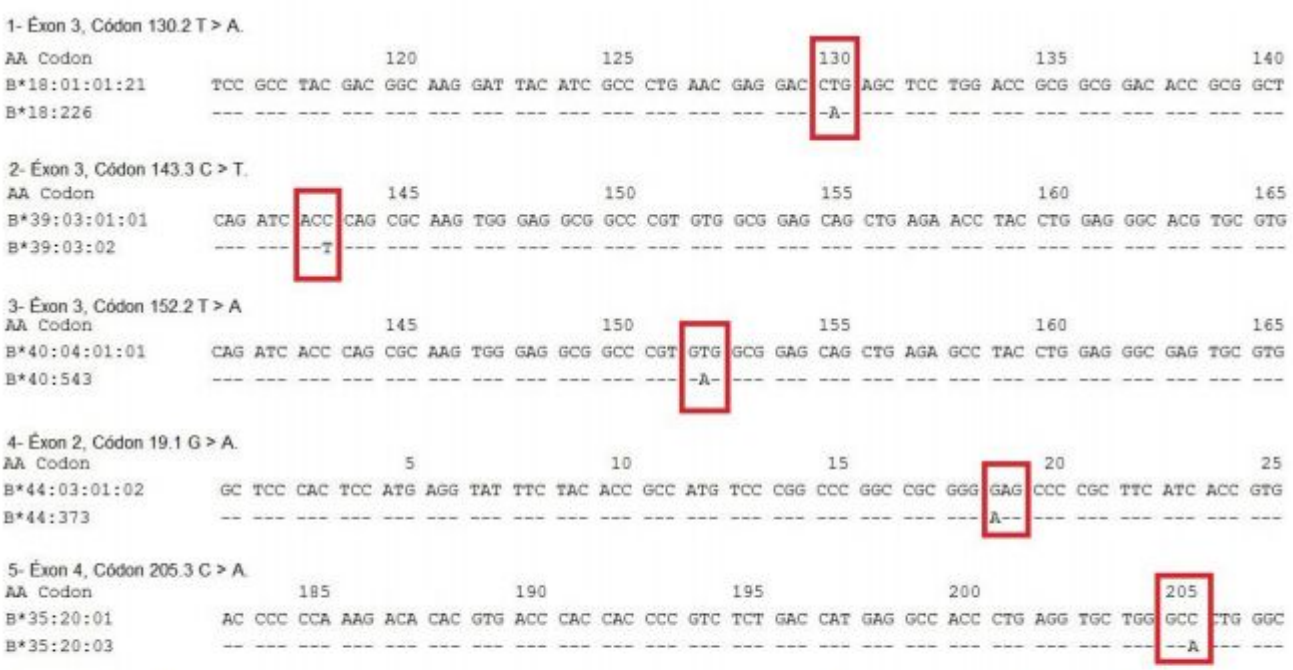


Figura 1. Alinhamento parcial dos novos alelos em comparação com seu alelo de referência. (1) Alinhamento parcial do éxon 3 de *B*18:226* e *B*18:01:01:21*; (2) Alinhamento parcial do éxon 3 de *B*39:03:02* e *B*39:03:01:01*; (3) Alinhamento parcial do éxon 3 de *B*40:543* e *B*40:04:01:01*; (4) Alinhamento parcial do éxon 2 de *B*44:373* e *B*44:03:01:02*; (5) Alinhamento parcial do éxon 4 de *B*35:20:03* e *B*35:20:01*.

Legenda: T = Timina, A = Adenina, C = Citosina e G = Guanina. Números acima da sequência indicam posição do códon e traços indicam mesmo nucleotídeo que a referência.

4. DISCUSSÃO

Indiscutivelmente, o NGS mostrou-se como uma tecnologia capaz de realizar a tipificação HLA e detectar mutações com excelente precisão e exatidão. Devido a essas características, laboratórios do mundo todo migraram para utilizar tal metodologia em sua rotina (14–17). No Brasil, essa mudança ocorreu principalmente a partir de 2021 com a publicação de novas Portarias do Ministério da Saúde que regulamentem os procedimentos de tipificação HLA (18,19).

Além disso, entre 2010 e 2015, o número de alelos HLA identificados duplicou, passando de 6.000 para 12.000. Esta expansão é potencialmente atribuível ao advento do NGS (6). Atualmente, a base de dados responsável pelo armazenamento desses alelos, o IPD-IMGT/HLA, conta com 39.627 alelos HLA, sendo o gene *HLA-B* o mais numeroso, com 10.080 alelos (12).

Mesmo com todas as capacidades do NGS, ainda existem melhorias que podem ser realizadas. Uma das limitações é seu sequenciamento de pequenos fragmentos (*short-reads*) que pode causar ambiguidade de resultados dificultando a análise e definição do genótipo (20). Por esse motivo a terceira geração de sequenciadores foi desenvolvida, dando continuidade à evolução das técnicas de sequenciamento de DNA. Os sequenciadores de terceira geração (TGS, *Third-Generation Sequencing*) surgiram em 2009 com a Helicos Bioscience, entretanto, essa primeira tentativa de desenvolvimento de um equipamento de sequenciamento de terceira geração não foi satisfatória, visto que, o equipamento apresentava diversas limitações e erros (21). Já em 2011, a PacBio desenvolveu seu próprio sequenciador que passou por diversas melhorias até alcançar o patamar de qualidade desejado, e em 2014 a Oxford Nanopore Technologies lançou o MinION que apresentou um método de sequenciamento completamente diferente (21). Essa nova tecnologia, comparada ao NGS, é capaz de sequenciar fragmentos longos (*long-reads*), eliminando as ambiguidades. No momento atual, acredita-se que uma abordagem onde utilizam-se ambas as técnicas, NGS (*short-reads*) e TGS (*long-reads*) é o ideal para gerar dados ainda mais robustos (20,22).

De todos os 20 novos alelos identificados no LIG-UEM, 5 deles pertencem ao gene *HLA-B*, aquele com o maior número de novos alelos identificados dentre nossas análises, corroborando com o que é observado no banco de dados do IPD-IMGT/HLA, ou seja, que o *HLA-B* é o gene mais polimórfico presente no genoma humano (2). Além disso, todas as mutações que apresentamos foram Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP, sigla do inglês para *Single Nucleotide Polimorphism*), isso é, mutações onde ocorre a troca de apenas 1 nucleotídeo da sequência gênica, a mais comum das mutações que ocorrem no DNA (2).

Durante nosso período de submissão dos alelos aos bancos de dados, poucos materiais instrucionais foram encontrados para que essas notificações pudessem ser realizadas com clareza, tornando o processo mais complexo nas primeiras tentativas. Entretanto, após nova pesquisa realizada recentemente encontramos uma quantidade razoável de materiais guia para submissão, a maioria proveniente de *Webnars* (*Web based seminars*, ou, seminários realizados pela internet).

Os nomes dos alelos descritos foram oficialmente atribuídos pelo Comitê de Nomenclatura da OMS para Fatores do Sistema HLA em setembro de 2022, agosto de 2022, maio de 2023, março de 2023 e agosto de 2024, respectivamente. Isso segue a política acordada de que, sujeito às condições declaradas no Relatório de Nomenclatura mais recente, nomes serão atribuídos a novas sequências à medida que forem identificadas. Listas com esses novos nomes serão publicadas no Relatório de Nomenclatura da OMS a seguir (23).

5. CONCLUSÃO

A investigação sobre os novos alelos HLA mostrou-se benéfica, visto que, até o momento, foram identificados alelos que não tinham sido notificados aos bancos de dados, porém, com esse estudo eles foram compilados e catalogados corretamente. Acredita-se que com o passar do tempo a rotina de tipificação HLA do LIG-UEM irá identificar mais alelos, entretanto, foi desenvolvido um procedimento para que os membros do laboratório consigam realizar essa tarefa sem grandes dificuldades, assim, beneficiando a comunidade de histocompatibilidade local através do entendimento da diversidade alélica do HLA na região.

FINANCIADOR

CAPES, CNPq e LIG-UEM.

REFERÊNCIAS

1. Mosaad YM. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. Vol. 82, Scandinavian Journal of Immunology. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 283–306.
2. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. Vol. 5, Nature Reviews Genetics. 2004. p. 889–99.
3. Kulski JK, Inoko H. Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes. In: Encyclopedia of Life Sciences. Wiley; 2006.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. 10th edição. Elsevier, editor. 2023. 143–144 p.
5. Wood-Trageser MA, Xu Q, Zeevi A, Randhawa P, Lesniak D, Demetris AJ. Precision transplant pathology. Vol. 25, Current Opinion in Organ Transplantation. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 412–9.
6. Lan JH, Zhang Q. Clinical applications of next-generation sequencing in histocompatibility and transplantation. Vol. 20, Current Opinion in Organ Transplantation. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 461–7.
7. McGinn S, Gut IG. DNA sequencing - spanning the generations. N Biotechnol. 2013 May 25;30(4):366–72.
8. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. Nucleic Acids Res. 2013 Jan 1;41(D1).
9. Yuan D, Ahamed A, Burgin J, Cummins C, Devraj R, Gueye K, et al. The European Nucleotide Archive in 2023. Nucleic Acids Res. 2024 Jan 5;52(D1):D92–7.
10. Tanizawa Y, Fujisawa T, Kodama Y, Kosuge T, Mashima J, Tanjo T, et al. DNA Data Bank of Japan (DDBJ) update report 2022. Nucleic Acids Res. 2023 Jan 6;51(D1):D101–5.
11. Arita M, Karsch-Mizrachi I, Cochrane G. The international nucleotide sequence database collaboration. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D121–4.
12. Barker DJ, Maccari G, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Robinson J, et al. The IPD-IMGT/HLA Database. Nucleic Acids Res. 2023 Jan 6;51(D1):D1053–60.

13. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. PORTARIA Nº 525, DE 31 DE AGOSTO DE 2022 [Internet]. [cited 2024 Oct 8]. Available from: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-525-de-31-de-agosto-de-2022-427277752

14. Lee JK, Lee S, Park JW, Lim S, Kang E. Identification of the novel *HLA-DRB3*02:209* allele by next-generation sequencing. HLA [Internet]. 2024 Jul 29;104(1). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tan.15630

15. Troiano M, Bianculli AG, Di Luzio A, Pinto RM, Andreani M. Identification of the novel *HLA-A*02:01:189* allele. HLA [Internet]. 2024 Aug 27;104(2). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tan.15651

16. Zheng C, Eravelli V, Kosierb M, Ge J, Choo SY. The novel *HLA-A*24:618* allele identified in Ecuadorian individual from New York City. HLA [Internet]. 2024 Aug 27;104(2). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tan.15662

17. Loginova M, Smirnova D, Paramonov I. Two novel HLA class II alleles identified by next-generation sequencing. Vol. 104, HLA. John Wiley and Sons Inc; 2024.

18. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria N° 1.229 de 15 de junho de 2021.

19. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria N° 685 de 16 de junho de 2021.

20. ZHANG LL, ZHANG C, PENG JP. Application of Nanopore Sequencing Technology in the Clinical Diagnosis of Infectious Diseases. Vol. 35, Biomedical and Environmental Sciences. Elsevier Ltd; 2022. p. 381–92.

21. Athanasopoulou K, Boti MA, Adamopoulos PG, Skourou PC, Scorilas A. Third-generation sequencing: The spearhead towards the radical transformation of modern genomics. Life. 2022 Jan 1;12(1).

22. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Vol. 39, Nature Biotechnology. Nature Research; 2021. p. 1348–65.

23. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Vol. 75, Tissue Antigens. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 291–455.

Palavras-chave: HLA; Next-Generation Sequencing; Imunogenética.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ANÁLISE NO COMPORTAMENTO DE SEGURANÇA NA MANIPULAÇÃO E APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES DA AGRICULTURA FAMILIAR

Beatris Truzzi Silva[1]; Clayton Ferreira Mendonça[1]; Lyriel de Oliveira dos Santos[2]; André Inácio da Silva[3]; Samuel Botião Nerilo[4]; Simone Aparecida Galerani Mossini[5]

[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
[2]Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Bolsista USF, Uningá, Maringá, PR
[3]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC
[4]Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[5]Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
e-mail: btruzzisilva@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O uso extensivo de insumos agrícolas se tornou uma prática comum na agricultura moderna, seu principal foco é o controle de pragas e doenças que ameaçam as plantações. Embora esses produtos químicos tenham contribuído para o aumento da produtividade agrícola, também acarretam riscos significativos para a saúde humana e ambiental (1).

Atualmente o Brasil consome a maior quantidade de insumos agrícolas do mundo por hectare plantado. Quando analisamos um processo crescente de consumo desde 2013, podemos observar que neste ano foram utilizadas 495.764,55 toneladas de insumos agrícolas, enquanto em 2021 a quantidade consumida foi de 719.507,44 toneladas. Isso representa um crescimento de 45,1% em oito anos e corrobora com a ampliação do uso, quando contraposto com a área plantada, pois no mesmo período houve um crescimento de 19,1% no total de áreas plantadas (2).

O uso indiscriminado e inadequado de agrotóxicos levanta preocupações em relação à saúde humana, ao meio ambiente e à sustentabilidade agrícola. Os agrotóxicos não possuem seletividade, de modo que a exposição humana à essas substâncias podem ocasionar efeitos prejudiciais à saúde, como alterações no sistema nervoso central, gastrointestinal e cardiovascular, além da ocorrência de distúrbios hormonais e de seu potencial mutagênico (3).

A exposição aos agrotóxicos pode ocorrer por diferentes maneiras, como o contato direto dos agricultores durante a manipulação e aplicação, pela ingestão de alimentos contaminados por resíduos de agrotóxicos e através da contaminação ambiental resultante do uso excessivo ou inadequado (4). Isso evidencia a grande necessidade de atenção e cuidados com a saúde dos trabalhadores expostos, especialmente por se tratar, na grande maioria dos casos, de uma população vulnerável, com baixo nível educacional, o que pode refletir em um baixo conhecimento dos riscos e da forma correta de manuseio destas substâncias.

O trabalhador rural expõe-se aos agrotóxicos em todas as etapas de produção: compra, transporte, preparo e manipulação do produto, sendo que nas duas últimas fases a exposição ocorre de forma mais crítica e intensa, tornando o trabalhador rural o grupo populacional mais afetado pelos agrotóxicos (5). Na agricultura familiar, essa situação é ainda mais preocupante, pois muitos agricultores operam em áreas onde os recursos são escassos e o acesso a Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) adequados é limitado. Além disso, na agricultura familiar, a exposição prolongada aos agrotóxicos também pode afetar diretamente as famílias que vivem e trabalham na propriedade, aumentando os riscos à saúde e à segurança de todos os envolvidos (6).

Em novembro de 2023, foi aprovada pela Comissão de Meio Ambiente do Senado Federal, a PL 1.459/2022, um novo projeto de lei que facilita o registro de insumos agrícolas, incluindo compostos considerados potencialmente mutagênicos e desreguladores hormonais. Neste contexto, a tendência ao aumento do uso e exposição aos insumos agrícolas é um fato para esta população, o que pode acarretar aumento de intoxicações agudas e crônicas, danos à saúde reprodutiva e doenças crônicas, impondo a necessidade de maior fiscalização, monitoramento e vigilância em saúde (2). Estudos evidenciam que os agrotóxicos podem ser responsáveis por cerca de 200.000 mortes a cada ano e a maior parte dessas mortes ocorrem em países vulneráveis e em desenvolvimento, sem órgãos reguladores eficientes na proteção da saúde desta população frente às exposições (2).

Diante do exposto, surgiu o seguinte questionamento: como os trabalhadores da agricultura familiar entendem o risco da exposição aos agrotóxicos e como ocorre a manipulação destes compostos durante o processo laboral? Este conhecimento se faz importante, visto que esses trabalhadores estão expostos e o entendimento acerca dos riscos pode desempenhar um papel fundamental nas atitudes adotadas frente o manejo dessas substâncias. Além disso, uma carência de estudos capazes de responder este questionamento e trazer avanços para o aprimoramento do processo seguro de trabalho no campo, justifica a realização desse estudo, cujo objetivo é apreender como os agricultores concebem o risco e os aspectos que facilitam e dificultam a abordagem/assistência na orientação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em conjunto com as atividades do Projeto de Extensão Institucional "Monitoramento da Exposição Ocupacional" (Processon°7303/08), do Núcleo de Pesquisa Centro de Controle de Intoxicações da Universidade Estadual de Maringá, do Laboratório de Toxicologia da UEM (LATOX-UEM), do projeto de pesquisa institucional "Agrotóxicos: impactos na saúde humana", e das atividades dos projetos "Promoção à saúde de trabalhadores rurais: análise do comportamento de segurança na manipulação e aplicação de agrotóxicos" e "Promoção à saúde de trabalhadores rurais: análise do comportamento de segurança na manipulação e aplicação de agrotóxicos – Parte II", estes últimos financiados pelo programa Universidade Sem Fronteiras do Fundo Gestor Paraná (Edital nº 01/2022-UGF).

Trata-se de um estudo descritivo-exploratório, de abordagem qualitativa, transversal, realizado com a população de agricultores residentes em áreas rurais da região Norte central do Paraná, abrangendo os municípios de Centenário do Sul e Cafeara. O município de Centenário do Sul, com uma população de 10.832 pessoas em 2022, possui um IDH de 0,668, conforme o censo de 2010 e as principais atividades agropecuárias do município incluem o cultivo de soja, sorgo, cana-de-açúcar e milho. Em 2017, foram registrados 795 estabelecimentos agropecuários na região (7). Cafeara, tem uma população de 2.627 habitantes, apresenta um IDH de 0,693, de acordo com dados de 2010, possui 158 estabelecimentos agropecuários no município (IBGE, 2017), as principais atividades agropecuárias são o cultivo de soja, seguido por milho, cana-de-açúcar e mandioca, de acordo com a Emater em 2019 (8).

2.2. Critério para seleção das cidades

O critério para seleção das cidades foi a análise do Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDH-M) no estado do Paraná, priorizando os municípios com os menores índices, selecionados pelo Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES) em documento "Desafios para o Desenvolvimento Regional" constante no Edital nº 01/2022-UGF. Dentre as 45 cidades listadas no documento, foram selecionadas Cafeara e Centenário do Sul, por estarem localizadas mais próximas a Maringá.

2.3. Coleta de dados inicial

Os dados foram provenientes de um banco de dados, construído a partir de um evento realizado em uma etapa anterior do projeto "Promoção à saúde de trabalhadores rurais: análise do comportamento de segurança na manipulação e aplicação de agrotóxicos" com o intuito de avaliar o perfil e informações relativas à exposição dos agricultores aos agrotóxicos. O evento foi realizado em parceria com as prefeituras das cidades selecionadas e o apoio do IDR- Paraná. Um questionário foi aplicado e elaborado tendo como guia o protocolo de Avaliação das Intoxicações Crônicas por Agrotóxicos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (9), aos agricultores que consentiram participar.

2.4. Seleção para etapa de avaliação do comportamento de segurança

Inicialmente foi feito um levantamento de dados dos indivíduos que manifestaram interesse em dar continuidade ao estudo e tinham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido oferecido no primeiro questionário aplicado, seguido por uma análise da exposição atual de cada um deles. Seguindo esses critérios, os agricultores foram selecionados de forma aleatória e contactados para entrevista via telefônica.

2.5. Análise qualitativa

Os trabalhadores foram agendados para um encontro presencial, realizado na casa dos mesmos, onde foi feita uma análise geral sobre as condições da propriedade, armazenamento de agrotóxicos, uso e armazenamento de Equipamento de Proteção Individual (EPI), distância entre armazenamento e local de convívio, entre outros pontos importantes. Os dados qualitativos foram coletados através de entrevistas presenciais, individuais e áudio-gravadas.

2.6. Transcrição das entrevistas

As entrevistas áudio-gravadas foram inicialmente transcritas a partir do software de transcrição Transkriptor® 2022, um software que converte automaticamente arquivo de áudio para documentos em formato word.

2.7. Análise dos dados

Os dados fornecidos pelo questionário inicial foram analisados por meio de estatística descritiva e analítica, com utilização do programa Microsoft Excel. Foi realizada uma imersão nos dados coletados. O presente estudo adotou como referencial metodológico Bardin (2011), que consiste em uma análise onde se busca compreender as características sistemas ou padrões subjacentes aos fragmentos de mensagens colocados em vista no trabalho, a partir da transcrição das entrevistas, seguida de leitura e observações em busca por unidades de significado e de registro (trechos relevantes), palavras-chave, frases ou trechos que expressassem a essência das experiências relatadas. O critério para o número de entrevistados tem como base a saturação de dados, após a análise de cada entrevista, ao identificarmos repetições e o mesmo tipo de respostas, sem nenhuma nova informação ou tema citado, consideraremos o ponto de saturação identificado.

2.8. Critérios de inclusão

Exposição ocupacional a agrotóxicos, tempo de exposição prolongado que varia de 4 a 40 anos e trabalhadores acima de 18 anos de idade.

2.9. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (CAAE N° 65018017.7.0000.0104), parecer nº 6.209.432.

3. RESULTADOS

Analisando os dados obtidos em questionário para avaliar o perfil de uso de agrotóxicos e informações relativas à exposição dos agricultores, foram obtidos os dados observados na tabela 1.

TABELA 1 - **Práticas de segurança no uso de agrotóxicos, histórico de intoxicação e agrotóxicos usados com mais frequência nos últimos 3 meses dos agricultores dos municípios de Cafeara e Centenário do Sul-PR**

Usar todo EPI* para aplicar ou manipular agrotóxico	Muito provável	23 (32,86%)
	Pouco provável	11 (15,71%)
	Indiferente	5 (7,15%)
	Pouco improvável	5 (7,15%)
	Muito improvável	18 (25,71%)
	NR	8 (11,42%)
Trocar de roupa ou tomar banho imediatamente após pulverização	Muito provável	35 (50%)
	Pouco provável	5 (7,15%)
	Indiferente	8 (11,42%)
	Pouco improvável	3 (4,29%)
	Muito improvável	11 (15,71%)
	NR	8 (11,42%)
Os agrotóxicos podem causar prejuízo a saúde de quem os manipula	Muito provável	51 (72,86%)
	Pouco provável	1 (1,43%)
	Indiferente	6 (8,57%)
	Pouco improvável	0 (0,0%)
	Muito improvável	4 (5,71%)
	NR	8 (11,42%)
Já se intoxicou alguma vez?	Sim	18 (25,71%)
	Não	46 (65,71%)
	NR	8 (11,42%)

n=70; *EPI = Equipamento de Proteção Individual

A partir da análise desses dados, realizou-se a seleção dos trabalhadores, como descrito na metodologia, e se iniciaram as entrevistas áudio-gravadas e até o momento foram entrevistados 10 agricultores, cujos dados estão sendo transcritos e analisados. Dentre as informações obtidas até agora podemos notar que a falta de orientação pode influenciar firmemente na percepção de risco que os agrotóxicos podem oferecer para a saúde. Nota-se que os agricultores que anteriormente já haviam participado de palestras ou eventos sobre o tema apresentam uma maior percepção do risco, mas ainda não entendem completamente o risco ao qual estão expostos. Em contrapartida, os entrevistados que nunca participaram de cursos ou palestras anteriormente não têm percepção sobre o risco ao qual estão expostos, como podemos observar em algumas falas trazidas durante as entrevistas de um agricultor que alegou não participar de palestras ou eventos sobre o assunto: *"Olha, agrotóxico que nós usamos hoje, ele é muito mais seguro do que os antigos. Os antigos, sim, eram perigosos, mas que eles tinham que ter muito cuidado, porque ele fazia um efeito rápido e era na hora."* E quando questionado se os agrotóxicos são seguros para si e para sua família: *"Se você tiver um pouco de cuidado, eles são seguros"* e *"Para a humanidade inteira. Para todos. O agrotóxico não traz problema para o ser humano, não"*.

Nota-se também que, os entrevistados que não participam das palestras não conseguem ter uma percepção positiva sobre leis impostas e seus reais objetivos, como citado na fala a seguir: *"Porque existe muita lei ambiental que só te prejudica. Eles vêm, eles chegam, eles não comunicam com você, eles querem te multar. A multa não resolve o seu problema, você não vai aprender a fazer. Você só vai pagar a multa"*.

Em contrapartida, observamos falas mais conscientes dos participantes que alegaram já participarem de palestras e campanhas sobre o tema, como vistas quando perguntados se consideram o uso de agrotóxicos seguros: *"Não, não é. Ah, porque na verdade a gente usa por necessidade, porque adianta o processo, mas seguro não é, porque a gente sabe que além de estar prejudicando o meio ambiente, até a gente está correndo risco, né?"* ou *"É... Eu não falo que é seguro, mas é necessário, né? Seguro eu acho que não é, mas é necessário, né? Eu acho que é muito prejudicial à saúde da gente, né? Mesmo a gente se protegendo, mesmo assim ainda... Ainda faz mal, né?"*

A realização de eventos e palestras pode trazer uma maior consciência para a população, como na fala a seguir: *"A gente via antes que o pessoal usava até a mão direto pra mexer algum produto que hoje em dia com esses cursos, essas palestras, a gente vê que o pessoal já mudou um pouco a cabeça, não dá mais igual antes."* E quando questionados sobre as leis, vemos uma opinião diferente de quem nunca participou de eventos de informação*: "Eu acho que nas leis, a gente entende pouco, mas tem que mudar muita coisa, né?"*

Mesmo percebendo falas mais conscientes, ainda fica evidente a necessidade de maiores informações, como mais uma vez podemos observar nas falas: *"Em sua opinião, como seria o jeito ideal de aplicar os agrotóxicos sem oferecer risco para o senhor?" "Ixi, aí eu não posso responder não, porque o que a gente pode fazer, a gente faz. Eu não sei o que eu posso fazer mais do que o que a gente já faz."*

Quando questionados sobre o uso de EPI, as respostas foram similares entre os dois grupos e ambos não utilizam os EPI completos. Como podemos notar: *"Equipamento de proteção só o básico, tá? Só protege a mão e ali o nariz e pronto."* e *"E quando você mexe com agrotóxicos no seu dia-a-dia, você consegue utilizar o equipamento de proteção?" "Completo, não" "Por quê?" "Porque a gente não é sempre que usa. Aí a gente não tem todo o equipamento ainda, então a gente usa o que tem."* ou *"Às vezes, dependendo se eu uso a máscara, dependendo de máscara eu uso, né?" "O que o senhor usa? A máscara?" "Só a máscara." "A Luva não também?" "É, não."*

Ao analisarmos os insumos agrícolas mais citados pelos produtores, a classe dos herbicidas se destaca, correspondendo a 62,5% do total, seguida pelos inseticidas, com 21,9%, e fungicidas, que representam 15,6%. Apesar dos herbicidas serem considerados substâncias de baixa toxicidade e risco ambiental moderado, estudos indicam que essas substâncias podem causar toxicidade crônica, especialmente nos sistemas hormonal e reprodutivo. Nos relatos também podemos observar a utilização simultânea de mais um insumo agrícola e pouco se sabe sobre como o acúmulo dessas substâncias podem interferir em seus níveis de toxicidade. Alguns estudos trazem que a mistura entre herbicidas pode apresentar efeito sinérgico, sendo capazes de potencializar o efeito tóxico causado em humanos de ambos (10).

4. DISCUSSÃO

Visualizando o aumento crescente no uso de agrotóxicos pela população de trabalhadores rurais, fica evidente a necessidade de entender as motivações, crenças, normas sociais e desafios enfrentados pelos agricultores em relação ao uso desses insumos. É fundamental realizar mais estudos relacionados ao tema que sejam capazes de fornecer uma compreensão mais abrangente do problema e contribuir para o desenvolvimento de estratégias de intervenção eficazes. Essas estratégias devem ser capazes de diminuir os riscos e preencher lacunas no conhecimento existente, proporcionando uma compreensão mais rica e contextualizada do problema.

A análise das respostas indica que, embora a maioria dos participantes reconheça a importância das práticas seguras no manuseio de agrotóxicos, como o uso de EPIs, a adesão a essas práticas é muito baixa. O uso adequado de EPIs é fundamental para proteger os trabalhadores rurais, que estão frequentemente expostos a misturas de compostos com diferentes níveis de toxicidade. A alta adesão a essa prática indicaria uma maior conscientização sobre a necessidade de reduzir a exposição a agentes químicos.

Os herbicidas é a classe mais usada pela população estudada, são considerados insumos de baixa toxicidade e moderado risco ambiental, porém existem estudos que mostram que essas substâncias podem apresentar toxicidade crônica, dando ênfase principalmente nos sistemas hormonais e reprodutivos deixando evidente a necessidade de mais estudos em relação a toxicidade desses compostos (11). Uma comparação trazida pelo livro "Ambiente, saúde e agrotóxicos desafios e perspectivas na defesa da saúde humana, ambiental e do(a) trabalhador(a)" traz dados analisando o mapa do Brasil e mostra que a maior prevalência de câncer e malformação congênita do país ocorre nas áreas de maior uso de agrotóxicos, como o Sul e Sudeste, onde se destaca o uso de herbicidas, principalmente em monoculturas (12).

A escassez de dados e notificações sobre os efeitos dos agrotóxicos na saúde, incluindo a invisibilidade de seus impactos na saúde, evidencia a negligência do governo nas ações de proteção à saúde das populações expostas a esses produtos, assim como na formação de profissionais de saúde e no desenvolvimento de pesquisa científica (2). Existem programas e protocolos voltados para promover o uso seguro de agrotóxicos, e o estado do Paraná está à frente nessa questão, implementando diversas iniciativas. No entanto, esses protocolos ainda não foram plenamente integrados aos atendimentos de saúde. A falta de capacitação dos profissionais de saúde e a dificuldade em acessar a população rural são obstáculos significativos.

A escassez de estudos na área rural também se torna um impasse para descobrir as medidas adequadas e eficientes. Essa escassez pode ser explicada por diversos fatores que dificultam sua realização, especialmente em termos logísticos e financeiros. No Brasil, as zonas rurais geralmente apresentam estradas não pavimentadas e locais de difícil acesso. A condução de um estudo de base populacional exige financiamento e apoio dos órgãos públicos, além de amplo conhecimento da região, uma série de estratégias para alcançar os domicílios e localizar as residências dentro das propriedades, estradas estreitas ou intransitáveis e pontes interrompidas, que só podem ser confirmadas presencialmente. Ademais, surgem imprevistos, como a presença de animais soltos nas vias ou animais domésticos nas propriedades, que dificultam o acesso às moradias, além das dificuldades de contato e de compatibilizar o horário de disponibilidade dos moradores para a coleta de dados com o das entrevistadoras (13).

Para implementar ações de saúde eficazes ou elaborar políticas públicas apropriadas, é fundamental compreender a população rural, levando em conta suas particularidades (14), (15). Poucos estudos analisam as condições gerais ou múltiplos indicadores de saúde dessa população em nível nacional ou em municípios específicos (16). A maior parte das pesquisas concentra-se na investigação de determinados aspectos da saúde de trabalhadores rurais (16), (17), e são estudos com abordagens quantitativas, com análises estatísticas e questionários fechados. Para enfrentar esses desafios, é fundamental adotar uma análise abrangente que aborde tanto os aspectos educacionais e de conscientização quanto questões socioeconômicas e culturais, uma análise qualitativa mais aprofundada pode fornecer *insights* valiosos sobre os fatores contextuais, culturais e emocionais tornando possível explorar as perspectivas e experiências dos agricultores de forma mais detalhada.

5. CONCLUSÃO

A partir da análise dos dados e relatos, percebe-se uma lacuna no entendimento dos riscos por parte dos agricultores. Como prática de segurança, grande parte dos trabalhadores não considera o uso de todo o EPI necessário e a troca de roupa e/ou banho após a exposição aos agrotóxicos, mesmo que muitos deles tenham respondido ser muito provável que os agrotóxicos possam causar prejuízo a saúde de quem os manipula. Esse cenário reforça a urgência de políticas públicas eficazes, maior fiscalização e uma abordagem participativa na vigilância e proteção à saúde das populações expostas.

FINANCIADORES

TED n. 47/2023 - SETI e UGF, CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IDR-Paraná e aos colaboradores do Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Silva L, et al. Impactos ambientais do uso de agrotóxicos na agricultura: uma revisão. Rev Ambiente Água. 2018;13(5). doi: 10.4136/ambi-agua.2265.
2. Associação Brasileira de Saúde Coletiva (Abrasco). Nota Técnica: "Agrotóxicos, exposição humana, dano à saúde reprodutiva e vigilância da saúde". 2023.
3. Gunnarsson LG, Bodin L. Occupational exposures and neurodegenerative diseases: a systematic review and meta-analyses. Int J Environ Res Public Health. 2019;16(3):337. doi: 10.3390/ijerph16030337.
4. Oliveira G, et al. Agrotóxicos e seus efeitos na saúde humana: uma revisão. Rev Eletrônica Acervo Saúde. 2020;12(1). doi: 10.25248/reas.e1276.
5. Pignati WA, et al., eds. Desastres sócio-sanitário-ambientais do agronegócio e resistências agroecológicas no Brasil. 1ª ed. São Paulo: Outras Expressões; 2021.
6. Pimentel AB, Abreu LS, Contrigiani AC. Agricultura familiar. Araras: UFSCar/CPOI; 2021. 14 p. (Coleção Agroecologia em Foco).
7. Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná. Plano de desenvolvimento municipal de Cafeara. 2022 [citado 2024 set 18]. Disponível em: https://www.idrparana.pr.gov.br/system/files/publico/Transparecia%20Institucional/TermosCooperacaoMunicipios/2022/C/CafearaPlano.pdf.
8. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES). Caderno Estatístico do Município de Centenário do Sul. 2022 [citado 2024 set 18]. Disponível em: http://www.ipardes.gov.br/cadernos/MontaCadPdf1.php?Municipio=86630.
9. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Protocolo de avaliação das intoxicações crônicas por agrotóxicos. Curitiba: Superintendência de Vigilância em Saúde; 2013.
10. Martin O, et al. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: a systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. Environ Int. 2021;146:106206.
11. Carmo DA, et al. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. Rev Ambiente Água. 2013;8(1):133-43. https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1073.
12. Hess SC, et al. Cenário agrícola brasileiro: monoculturas e silvicultura, agrotóxicos e incidência de câncer, suicídio e anomalias congênitas. In: Roccon PC, et al., eds. Ambiente, saúde e agrotóxicos. São Carlos: Pedro & João Editores; 2023. p. 149-76.
13. Gonçalves H, et al. Estudo de base populacional na zona rural: metodologia e desafios. Rev Saude Publica. 2018;52(Supl 1):3s. https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000270.

14. Ministério da Saúde (BR). Vigilância do câncer ocupacional e ambiental. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado 2017 maio 20]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/inca/arquivos/publicacoes/vigilanciadocancerocupacional.pdf.
15. Ministério do Desenvolvimento Agrário (BR). Políticas públicas para agricultura familiar. Brasília (DF); 2013 [citado 2017 maio 20]. Disponível em: http://www.mda.gov.br/portalmda/sites/default/files/ceazinepdf/politicas_publicas_baixa.pdf.
16. Moreira JPL, et al. A saúde dos trabalhadores da atividade rural no Brasil. Cad Saude Publica. 2015;31(8):1698-708. https://doi.org/10.1590/0102-311X00105114.
17. Silva JM, et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. Cienc Saude Colet. 2005;10(4):891-903. https://doi.org/10.1590/S1413-81232005000400001.

Palavras-chave: insumos agrícolas; percepção de risco; saúde do trabalhador.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

COMBINAÇÃO *IN VITRO* DE ANTIMICROBIANOS EM CONCENTRAÇÕES TERAPÊUTICAS CONTRA *ENTEROBACTERALES* COM RESISTÊNCIA NATURAL E ADQUIRIDA PARA ESTES FÁRMACOS

Bruna Leticia dos Santos Vinha[1]; Heloisa de Oliveira Rabelo[2]; Lucas Guilherme Toshio Takeuti Wada[3]; Nathalie Kira Tamura[4]; Fabricia Gimenes[5]; Maria Cristina Bronharo Tognim[6]

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

[2]Acadêmica de Graduação, Curso de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[3]Acadêmico de Graduação, Curso de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[4]Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário Regional de Maringá, Maringá, PR

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

[6]Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde e do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: bruna.vinha@hotmail.com

1.INTRODUÇÃO

A ordem *Enterobacterales* inclui várias famílias de bacilos gram-negativos (BGN), que fazem parte da microbiota dos seres humanos e são patógenos oportunistas, podendo causar infecções respiratórias, urinárias e da corrente sanguínea (1).

A resistência dessas bactérias aos antimicrobianos é um problema que tem dificultado cada vez mais o tratamento de infecções, resultando em altas taxas de morbimortalidade, onde recentemente foi estimado que houve 4,95 milhões de óbitos no mundo. Atualmente, além das bactérias resistentes não responderem aos tratamentos convencionais, elas também são facilmente disseminadas no ambiente hospitalar. O tratamento empírico com uso de antimicrobianos é comum em vários tipos de infecções devido à demora na execução dos exames de diagnóstico, como cultura e antibiograma, o que favorece ainda mais o desenvolvimento da resistência bacteriana. A resistência das bactérias pode surgir de forma intrínseca ou adquirida, produzindo moléculas que superam a ação dos antimicrobianos, onde essas bactérias, normalmente susceptíveis, sofrem modificação genética (mutação ou adição de genes). Como principais mecanismos de resistência as bactérias apresentam produção de enzimas, superexpressão da bomba de efluxo e modificação das porinas (1, 2, 3).

Os carbapenêmicos são considerados os antibióticos mais efetivos no tratamento de infecções bacterianas severas, sendo o primeiro caso de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (CRE) reportado na década de 90. Um dos principais mecanismos responsáveis por essa resistência são as carbapenemases adquiridas, enzimas que hidrolisam esses antibióticos. Atualmente as carpabenemases mais significativas do ponto de vista clínico e epidemiológico são a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metalobetalactamase (NDM) e oxacilinase-48 (OXA-48), que possuem a habilidade de hidrolisar e inativar uma variedade de antimicrobianos além dos carbapenêmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (4, 5).

O Meropenem é um carbapenêmico, que atua na inibição da síntese da parede celular das bactérias. É um antibiótico tempo-dependente, sendo necessário que a porcentagem de tempo da droga na corrente sanguínea exceda a concentração inibitória mínima (CIM) da bactéria. É considerado antibiótico de escolha, apesar da necessidade de altas dosagens para sua efetividade (3, 6).

A Polimixina B, assim como a polimixina E (colistina) são antibióticos antigos da classe das polimixinas, usados há mais de 50 anos. Atuam se ligando aos componentes lipoproteicos da membrana das bactérias Gram-negativas, principalmente no lipídeo A do lipopolissacarídeo presente na membrana externa bacteriana. Sua atividade na membrana faz com que esta perca sua barreira osmótica seletiva, levando a lise celular e consequente morte. Seu uso foi reduzido com o tempo devido sua nefrotoxicidade. No caso das CRE, a resistência a polimixina B pode também ser adquirida por meio de plasmídeos que carregam o gene *mcr* e alteram o lipídio A, impedindo a ligação do fármaco na membrana externa da bactéria (7, 8).

A Tigeciclina também é um antimicrobiano desenvolvido para combater tanto bacilos Gram-negativos quanto bacilos Gram-positivos, sendo bacteriostático e o único membro da classe das glicilciclinas, derivada das tetraciclinas (1,7).

Com o aparecimento de bactérias multirresistentes, muitos estudos avaliam a efetividade da combinação de antibióticos para o tratamento através do sinergismo entre eles (3). O sinergismo ocorre quando o efeito combinado dos antibióticos tem resultado superior à quando são usados de forma isolada. Diversas metodologias podem ser utilizadas para avaliar o sinergismo *in vitro* de antibacterianos. Entre estas metodologias estão: Curva de Morte, *Checkerboard*, aproximação de discos de difusão, sobreposição das fitas de difusão de gradiente, entre outras (9).

Considerando a necessidade de opções terapêuticas seguras para o tratamento de CRE o presente projeto pretende avaliar a ação da Polimixina B, da Tigeciclina e do Meropenem puros e combinados em concentrações terapêuticas diferentes contra bactérias da ordem *Enterobacterales* com resistência intrínseca e adquirida a esses antibióticos, de forma a auxiliar no tratamento de doenças causadas por cepas multirresistentes (9, 10).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção dos isolados clínicos

Foram selecionados 6 isolados bacterianos da ordem *Enterobacterales* recuperados de amostras clínicas entre 2023-2024. A identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados foram identificados pelo sistema automatizado *BD-Phoenix* (BD Diagnostics Systems Sparks, MD). Previamente foram selecionados apenas isolados produtores de carbapenemases e resistentes à Polimixina B (intrínseca e adquirida). Apenas 3 isolados intrinsecamente resistentes à Polimixina B e produtores de carbapenemases foram recuperados, sendo incluídos no estudo. Entre os isolados produtores de carbapenemases e com resistência adquirida a Polimixina B, foram identificados 2 isolados apenas da espécie *Klebsiella pneumoniae*. Para selecionar isolados com maior variabilidade genética de *cluster* entre a espécie de *K.pneumoniae* foi realizada a tipagem molecular por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR).

2.2. Tipagem molecular

Isolados Gram-negativos pertencentes à mesma espécie foram tipificados pela reação de ERIC-PCR conforme descrito por Silbert et al. (2004) (11). A interpretação dos padrões gerados pelo ERIC-PCR foi realizada através do BioNumerics® Software (Applied Maths, Sint - Martens-Latem, Bélgica). O coeficiente de similaridade entre as amostras foi calculado através do coeficiente de Dice, e os isolados categorizados como pertencentes ao mesmo cluster quando o coeficiente de similaridade foi superior a 93%.

2.3. Detecção das principais carbapenemases

A pesquisa dos genes de carbapenemases foi realizada pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex*, padronizada no LMM/UEM que contempla a pesquisa dos genes *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC), *New Delhi metalo-betalactamase* (NDM) e oxacilinase-48 (OXA-48) conforme *primers* descrito por Poirel et al., 2011 (12).

2.4. Pesquisa do gene MCR-1

Para todos os isolados resistentes às polimixinas (Polimixina B e Colistina) foi realizada a pesquisa do gene MCR-1, pelo método de PCR utilizando *primers* específicos previamente descritos (13).

2.5 Agentes antimicrobianos

Três agentes antimicrobianos foram selecionados para serem testados isoladamente e em duplas, resultando em 3 diferentes combinações, sendo elas: Meropenem com Polimixina B, Meropenem com Tigeciclina e Polimixina B com Tigeciclina. Todas as combinações foram realizadas em duplicata.

2.6 Método *Checkerboard*

Os testes foram realizados em placas de microdiluição com 96 cavidades contendo Muller Hinton Agar-Cátion Ajustado e as doses mínima e máxima dos antimicrobianos foram utilizadas e diluídas de acordo com as doses terapêuticas padronizadas. O inóculo foi adicionado ao teste na concentração final de 10^4 - 10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), contendo controle de crescimento em cada placa. Após o preparo, as placas foram incubadas em estufa a 35ºC por 16 a 20 horas, onde as CIMs de cada antibiótico e suas combinações foram determinadas. Em seguida, foi utilizado para o cálculo do índice da fração inibitória (IFI): IFI = (CIM A+B/CIM A) + (CIM B+A/CIM B), onde: CIM A+B representa a CIM do antimicrobiano A quando associado ao antimicrobiano B. CIM B+A representa a CIM do antimicrobiano B quando associado ao antimicrobiano A. CIM A representa a CIM do antimicrobiano A quando testado isoladamente. CIM B representa a CIM do antimicrobiano B quando testado isoladamente.

Os efeitos das combinações dos agentes antimicrobianos foram classificados de acordo com os critérios propostos por Moody como: sinergismo (ΣIFI ≤ 0,5), indiferente (ΣIFI > 0,5 < 4) e antagonismo (ΣIFI ≥ 4) (14, 15, 16).

A Tabela 1 apresenta as características genotípicas das 6 amostras estudadas, juntamente com o sítio de origem da amostra obtida.

Tabela 1. Características das amostras usadas no estudo, tipagem e origem da amostra

Isolados	Microrganismo	Marcadores de Resistência	Origem da amostra
Pv 01	*Proteus vulgaris*	NDM; ESBL;	Urina
Prs 03	*Providencia stuartii*	NDM; ESBL;	Secreção de coxa
Kp 719	*Klebsiella pneumoniae*	NDM; ESBL;	Sangue
Kp 844	*Klebsiella pneumoniae*	KPC;	Urina
Vigi 2117	*Morganella morganii*	NDM; ESBL;	Swab retal
Vigi 2405	*Escherichia coli*	KPC;	Swab retal

CIM: Concentração Inibitória Mínima; KPC:*K. pneumoniae* carbapenemase; NDM: New Delhi metalo-betalactamase; ESBL: Beta-lactamases de Espectro Estendido.

3. RESULTADOS

Todos os isolados apresentaram genes codificadores de carbapenemases na pesquisa genotípica, com predominância do gene bla_{NDM} (4/6). Também, betalactamase de espectro estendido foi detectada (*BD-Phoenix*) em todos os isolados (Tabela 1). Todos os isolados foram avaliados usando os critérios de interpretação do EUCAST/BrCAST 2024 (17), com as amostras da mesma espécie apresentando pouca diferença da CIM aos antimicrobianos testados, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos por isolado.

	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
Isolados	Meropenem	Polimixina	Tigeciclina
Pv 01	128	128	4
Prs 03	32	128	8
Kp 719	128	16	1
Kp 844	128	16	0,5
Vigi 2117	4	128	4
Vigi 2405	128	32	0,5

Principalmente a CIM da polimixina B ao ser combinada com a tigeciclina teve uma redução expressiva em comparação com sua ação pura. O meropenem combinado com a tigeciclina também teve um resultado semelhante, tornando o isolado sensível. Combinado com a polimixina B, o meropenem obteve um resultado mais satisfatório em cepas com a presença do gene bla_{KPC} nos isolados de *K. pneumoniae*.

A tabela 3 traz o cálculo de IFI para avaliação do sinergismo entre as combinações de 3 antimicrobianos (Meropenem, Polimixina B e Tigeciclina) testadas *in vitro* pela técnica de checkerboard , o sinergismo foi obtido em 7 combinações, com predominância da Tigeciclina em 86% das combinações sinérgicas. Com relação ao isolado, o *Proteus vulgaris* foi o que mostrou maior sensibilidade aos antimicrobianos combinados, mesmo possuindo alta resistência aos 3 antimicrobianos. Já a *E. colli*, apresentou ação indiferente aos testes realizados com esse isolado. Dos dados obtidos, podemos avaliar que 39,9% das combinações testadas apresentaram efeito sinérgico e 61% efeito indiferente.

Tabela 3. Resultados obtidos pelas combinações *in vitro* dos antimicrobianos nas 6 amostras de *Enterobacterales* pelo método *checkerboard*.

Isolados	Combinações de antimicrobianos		
	MEM+Pol ∑IFI (*)	MEM+Tig ∑IFI (*)	Pol+Tig ∑IFI (*)
Pv 01	0,5(S)	0,078(S)	0,312(S)
Prs 03	0,562(I)	0,14(S)	0,507(I)
Kp 719	2(I)	1,5(I)	0,312(S)
Kp 844	0,625(I)	2(I)	0,375(S)
Vigi 2117	0,531(I)	0,312(S)	2(I)
Vigi 2405	2(I)	1,5(I)	2(I)

Nota: MEM (Meropenem); Pol (Polimixina B); Tig (Tigeciclina); ∑IFI (*) (somatório do índice de fração inibitória e o efeito produzido). S (sinergismo), I (indiferença).

4. DISCUSSÕES

A combinação de antimicrobianos tem mostrado resultados promissores para o tratamento de doenças causadas por bactérias multirresistentes da ordem *Enterobacterales* associadas a altas taxas de mortalidade. Muitos estudos sobre combinação de antimicrobianos estão sendo realizados devido à escassez de opções terapêuticas e o fato de novos antimicrobianos possuírem custo muito elevado. O uso indiscriminado de antimicrobianos é o maior responsável pelo aumento do número de bactérias multirresistentes (1, 3, 18).

De forma isolada, a maior parte dos resultados das combinações estão classificadas como indiferentes pelo índice de fração inibitória devido ao efeito, porém, ao analisar os dados, podemos notar que combinados com a Tigeciclina, tanto o Meropenem quanto a Polimixina B tiveram um bom desempenho, onde alguns isolados classificados como resistentes se tornaram sensíveis para esses antimicrobianos. Neste estudo, podemos notar que o tema ainda precisa ser elucidado de uma forma mais ampla e que contemple uma gama maior de microrganismos para determinar a possibilidade de uma padronização do tratamento.

Ao estudar a terapia antimicrobiana, é importante lembrar que a concentração do fármaco no sítio infeccioso pode ser maior ou menor que no soro, situação diferente em estudos *in vitro*. Dessa forma, é necessário que os resultados sejam analisados e adaptados de forma que seja efetivo *in vivo*. Além disso, a CIM baseia-se na concentração do inóculo em escala pré-definida 10^5 UFC/mL, o qual pode ser um valor baixo se compararmos com a carga bacteriana presente em alguns sítios infecciosos (19).

Com isso, o uso de dois fármacos onde um pode diminuir a CIM do outro, mesmo que não ocorra sinergismo verdadeiro, acreditamos que possa levar a um caminho positivo no desfecho clínico dos pacientes quando se utilizamos apenas os parâmetros da CIM, nos trazendo outra visão aos desafios propostos.

5. CONCLUSÃO

Concluímos que tanto para bactérias com resistência intrínseca ou resistência adquirida a combinação de antimicrobianos parece ser uma boa alternativa. Até o momento, o melhor resultado entre as combinações testadas ocorreu predominantemente na presença de Tigeciclina, combinada tanto com Meropenem quanto com Polimixina, onde foi verificada atividade sinérgica contra isolados CRE, podendo trazer resultados promissores à terapêutica. Os resultados refletem a complexa dinâmica dos diferentes isolados frente ao uso de diferentes combinações *in vitro*, sendo necessário outras investigações para determinar se as observações são válidas na prática clínica.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Tompkins K, van Duin D. Treatment for carbapenem-resistant Enterobacterales infections: recent advances and future directions. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40(10):2053-68. doi:10.1007/s10096-021-04296-1.
2. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. J Infect Public Health. 2017;10(4):369-378. doi:10.1016/j.jiph.2016.08.007.
3. Bassetti M, Peghin M, Pecori D. The management of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Curr Opin Infect Dis. 2016;29(6):583-594. doi:10.1097/QCO.0000000000000314.
4. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Clin Lab Med. 2017;37(2):303-315. doi:10.1016/j.cll.2017.01.005.
5. Lutgring JD. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Na emerging bacterial threat. Semin Diagn Pathol. 2019;36(3):182-6. doi:10.1053/j.semdp.2019.04.011.
6. Steffens NA, Zimmermann ES, Nichelle SM, Brucker N. Meropenem use and therapeutic drug monitoring in clinical practice: a literature review. J Clin Pharm Ther. 2021;46(3):610-621. doi:10.1111/jcpt.13369.
7. Karaiskos I, Giamarellou H. Carbapenem-Sparing Strategies for ESBL Producers: When and How. Antibiotics (Basel). 2020 Feb 5;9(2):61. doi: 10.3390/antibiotics9020061.
8. Silva KED, Rossato L, Leite AF, Simionatto S. Overview of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. Ver Soc Bras Med Trop. 2022;55:e0349 doi:10.1590/0037-8682-0349-2021.
9. Gaudereto JJ, Neto LVP, Leite GC, Espinoza EPS, Martins RCR, Prado GVB, et al. Comparison of methods for the detection of in vitro synergy in multidrug-resistant gram-negative bacteria. BMC Microbiol. 2020; 16:20(1):97. doi: 10.1186/s12866-020-01756-0.
10. Fatsis-Kavalopoulos N, Roemhild R, Tan g PC, Kreuger J, Andersson DI. CombiANT: Antibiotic interaction testing made easy. PLoS Biol. 2020 Sep 17;18(9):e3000856. doi: 10.1371/journal.pbio.3000856.
11. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004 Oct;25(10):847-51. doi: 10.1086/502307.
12. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 May;70(1):119-23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
13. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb;16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
14. Moody, J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, 2004 p. 5.12.1–5.12.23. In H. D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, DC.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bactéria that grow aerobically: M7-A10. 10th ed. Wayne, PA: CLSI; 2018.
16. Wu X, Li Z, Li X, et al. Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria. Drug Des Devel Ther. 2017 Mar 22;11:939-946. doi: 10.2147/DDDT.S107195.
17. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Controle Interno de Qualidade de Rotina e Estendido para a Determinação da CIM e Disco-Difusão, conforme recomendações do BrCAST-EUCAST, versão 15-03-2023, disponível em http://www.brcast.org.
18. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr. 2016 Apr;4(2): 481-511. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
19. Fedrigo NH, Xavier DE, Cerdeira L, et al. Genomic insights of Acinetobacter baumannii ST374 reveal wide and increasing resistome and virulome. Infect Genet Evol. 2022 Jan;97:105148. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105148.

Palavras-chave: *checkerboard*; *Enterobacterales*; carbapenemase.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

EFEITOS DO USO DE CURCUMINA LIVRE E NANOEMULSIFICADAS ISOLADAS OU EM ASSOCIAÇÃO COM METOTREXATO NO FÍGADO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE

Camila Rodrigues Thom[1]; Karile Cristina da Costa Salomão[2]; Melissa Cumani[1]; Gabriela Barone Volceda Silva Aragão[2];Luciana Facco Dalmolin[3],JanetteBetzabeth Villarruel Muñoz[3];Renata Fonseca Vianna Lopez[3]; Roberto Kenji Nakamura Cuman[4]; Nilza Cristina Buttow[5]

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

[2]Acadêmica de Pós-Graduação, Programa de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá,PR

[3]Acadêmica de Pós-Graduação Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

[4]Docente, Departamento de Inflamação, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

e-mail: camilarthom@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica cujos principais sintomas são dores, inchaço e rigidez das articulações, impactando a qualidade de vida do paciente. É uma doença mais frequente em mulheres, especialmente as que se encontram no período da menopausa, o que leva a hipótese que fatores hormonais desempenham um papel no desenvolvimento da doença (1).

Vários fatores podem desencadear o progresso da AR, um destes seriam fatores genéticos. Pacientes que possuem o alelo HLA-DRB1, especialmente alelos HLA-DRB1*04 e DRB1*10 são os mais susceptíveis ao desenvolvimento da AR. Além disso, fatores ambientais e estilo de vida também estão relacionados ao surgimento da doença, tais como: exposição crônica à sílica, tabaco, dieta e infecções (2,3). A fisiopatologia ainda não está totalmente elucidada, mas algumas ideias já foram postuladas, uma delas é a de que proteínas com arginina podem ser convertidas em citrulina por enzimas específicas. Esses peptídeos citrulinados não são reconhecidos pelo sistema imune e consequentemente é desencadeado um processo inflamatório por citocinas que levam a inflamação das articulações (3).

Apesar da AR ser uma doença que afeta majoritariamente as articulações, a mesma pode ter uma repercussão sistêmica e se manifestar de forma extra articular, acometendo outros órgãos como o fígado (4). O fígado é a maior glândula do corpo, responsável por receber nutrientes absorvidos e pelo processo de desintoxicação provocado por medicamentos e outras substâncias. Por ser capaz de desintoxicação de medicamentos, alguns químicos, após o processo de biotransformação, podem levar a produção de moléculas que levam o fígado à injúria, como é o caso do Metotrexato, um medicamento utilizado para tratamento da AR (4,5).

O metotrexato (MTX) é um medicamento que já foi utilizado para tratamento de câncer quando administrado em altas doses, mas em doses menores pode ser administrado para tratamento AR (6). Porém, o mesmo pode levar a efeitos tóxicos ao tecido hepático, tais como hiperplasia de células de Kupffer, infiltrado de células de gordura e de células mononucleares, esteatose e fibrose (4,7)

Produtos naturais têm sido utilizados para tratamento de doenças inflamatórias e hepáticas, como é o caso da curcumina, devido ao fato de a mesma ter poucos efeitos colaterais e ser uma substância segura. Além disso, tem sido utilizado para o tratamento da AR, por ser um anti-inflamatório. Porém, a curcumina apresenta uma biodisponibilidade baixa, essa circunstância abriu portas para uma nova área de pesquisa, na qual seria melhorar a biodisponibilidade da curcumina através de nanoformulações e aumentar sua

distribuição (8). Logo, este trabalho visa avaliar os efeitos da curcumina tanto na sua forma livre quanto nanoemulsificada isoladas ou em associação com MTX no fígado de ratos artríticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o número nº 2012070222. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM. Foram utilizados 42 ratos albinos machos *Holtzman* com 50 dias de vida. Os ratos passaram pelo processo de adaptação e foram mantidos sob condições de claro/escuro por 12h em ambiente climatizado 22±2° C e alimentados com a ração padrão Nuvilab © e água *ad libium*. Os animais foram divididos em 7 grupos (n=6): grupo controle (C), grupo artrítico induzido por adjuvante (AIA); grupo artrítico tratado com curcumina livre (AIA+CL), grupo artrítico tratado com curcumina nanoemulsificada (AIA+CN), grupo artrítico tratado com metotrexato (AIA+MTX), grupo artrítico tratado com metotrexato associado com curcumina livre (AIA+MTX+CL) e grupo artrítico tratado com metotrexato associado com curcumina nanoemulsificada (AIA+MTX+CN).

2.2 Indução da artrite e tratamento

A indução da artrite foi realizada no dia 0 do experimento através de injeção intradérmica, na pata posterior esquerda, com 0,1 ml de Adjuvante completo de Freund (CFA) com 5% do *Mycobaterium tuberculosis* inativado pelo calor. Após confirmação da artrite do dia 7° até o 30° dia os grupos C e AIA receberam água diariamente por gavagem; os grupos tratados com curcumina livre ou em nanoemulsão receberam dose diária de 30 mg/kg de curcumina e os grupos que receberam MTX foram tratados com dose de 1mg/kg/semana.

2.3 Eutanásia

No 30° de experimento, os animais foram mortos com dose letal de Ketamina (210 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg) por via intramuscular. O fígado foi retirado, lavado com PBS, e seus lobos foram separados para as diferentes técnicas: lobo esquerdo para análises histológicas, fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. O lobo direito foi fragmento em três porções: superior para análise de EROs; porção central para análise de estresse oxidativo e analise da atividade enzimática da MPO e NAG e inferior para quantificação de nitrito, sendo então congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80ºC.

2.4Análises bioquímicas

Para análise do estresse oxidativo as metodologias foram realizadas conforme da Silva et al. (9). O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 200mM (pH a 6,5) e posteriormente, triturado. Uma porção do homogenado foi utilizado para mensurar a GSH, o resultado foi centrifugado por 20 minutos a 9.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para dosagem da atividade enzimática da SOD, CAT e GST. Para análise da atividade enzimática de MPO e NAG foi utilizado o *pellet*. O nitrito foi avaliado através da Reação de Greiss. E para EROs, a amostra foi triturada em tampão fosfato de sódio e lida em espectrofotômetro.

2.5 Histologia

As amostras passaram pelo processamento histológico de rotina com desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os cortes semiseriados histológicos foram feitos com 5 µm com uso do micrótomo com 4 cortes por lâminas sendo essas coradas com Hematoxilina e Eosina para análise de infiltrado inflamatório. Foram analisadas 40 imagens com microscópio óptico em aumento de 40X. E Ácido Periódico de Schiff (PAS) para a medida das áreas do perfil celular, citoplasma, núcleo do hepatócito e densidade de hepatócitos. Foram medidos um total de 100 hepatócitos por animal.Todas as análises foram feitas com o auxílio do programa de análise de Imagens Image Pro-Plus. As imagens foram capturadas com microscópio óptico em aumento de 40X. Os valores de referência para o score inflamatório utilizados foram: 0-33% - leve, 34-66% - moderado e >66% - grave.

2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prisma v.8.0.1. Foi feito o teste de normalidade de Shapiro Wilk, em caso de distribuição normal, foi feito o *Student test T* com resultados expressos em média ± erro padrão. Caso contrário, foi realizado o teste de Mann-Whitney,com resultados expressos em mediana ± intervalo de confiança. Foi considerado valor de p<0,05 estatisticamente significativo para todas as análises.

3. RESULTADOS

3.1 Massa corporal e do fígado

Na análise de massa observou-se que todos os animais induzidos a artrite sofreram perda de massa corporal comparados ao grupo CONT ($p<0.001$). O grupo AIA+CN aumentou em relação aos grupos AIA e AIA+CL ($p<0,05$). Já o grupo AIA+MTX diminuiu em relação ao grupo AIA ($p<0,05$). E tanto o grupo AIA+CL+MTX quanto o grupo AIA+CN+MTX aumentaram em relação ao grupo AIA+MTX ($p<0,05$).

Quanto à massa do fígado todos os grupos artríticos apresentaram diminuição quando comparados ao grupo CONT ($p<0,05$), não houve alteração de massa do fígado entre os grupos AIA e os tratamentos.

Na análise da relação da massa do órgão e da massa corporal, todos os grupos aumentaram em relação ao controle ($p<0,05$). Os grupos AIA+CL. AIA+CN, AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX diminuíram em relação ao grupo artrítico ($p<0,05$). E o grupo AIA+CN+MTX diminuiu em relação aos grupos AIA+MTX ($p<0,05$).

Tabela1. Valores da massa dos animais, do fígado e a relação entre a massa do fígado e corporal

	CONT	AIA	AIA+CL	AIA+CN	AIA+MTX	AIA+CL+MTX	AIA+CN+MTX
Massa corporal	315,4±18,23	252,7±6,71[a]	251,9±5,50[a]	258,7±6,09[abc]	241,4±5,66[abcd]	250,1±6,30[ade]	252,0±7,08[ae]
Massa do fígado	11,55±10,20; 12,07	9,535±8,340; 10,26[a]	9,325±8,060; 10,85[a]	9,100±8,30; 9,68[a]	9,720[a]±8,170; 10,13[a]	8,415±8,220; 9,560[a]	8,670±8,320; 9,320[a]
Relação massa do fígado/massa corporal	0,032± 0,0004	0,042±[a] 0,0003	0,039±[ab] 0,0006	0,037±[ab] 0,001	0,041± 0,0008[a]	0,038± 0,0007[ab]	0,038± 0,001[a bdf]

Grupo CONT (controle); grupo AIA (artrite induzida por adjuvante), grupo AIA+CL (artrite tratada com curcumina livre); grupo AIA+CN (artrite tratada com curcumina nanoemulsificada); grupo AIA+MTX (artrite tratada com metotrexato); grupo AIA+CL+MTX (artrite tratada com curcumina livre associado ao metotrexato) e grupo AIA+CN+MTX (artrite tratada com curcumina nanoemulsificada associado ao metotrexato).*Resultados expressos mediana com intervalo interquartil de 95% de intervalo de confiança (n=6)

2.2 Ensaios bioquímicos para estresse oxidativo e inflamação

Os resultados estão apresentados na tabela 3. Os níveis de GSH diminuíram em todos os grupos comparados ao grupo CONT ($p<0,05$). O grupo AIA+CN+MTX teve uma diminuição quando comparado aos grupos AIA e AIA+CL ($p<0,05$).

A atividade enzimática da CAT aumentou nos grupos AIA, AIA+CN, AIA+MTX e AIA+CN+MTX ($p<0,05$). O grupo AIA+CL+MTX teve menor atividade enzimática comparado aos grupos AIA, AIA+CN, AIA+MTX ($p<0,05$). Quanto a SOD, observamos que sua atividade enzimática sofreu diminuição em todos os grupos comparados ao CONT ($p<0,05$). Além disso, o grupo AIA+CN+MTX teve menor atividade enzimática comparada aos grupos AIA, AIA+CL e AIA+CL+MTX. ($p<0,05$). Quanto a atividade enzimática do GST, houve uma diminuição da sua atividade no grupo AIA comparado ao CONT ($p<0,05$) aumento do grupo AIA+MTX em relação ao grupo AIA ($p<0,05$) e aumento dos grupos AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX em relação aos grupos AIA, AIA+CL e AIA+CN ($p<0,05$). A dosagem de EROs mostrou que apenas os grupos AIA e AIA+MTX aumentaram em relação ao CONT ($p<0,05$).

A dosagem de nitrito mostrou aumento no grupo AIA comparado com todos os grupos ($p<0,05$). O grupo AIA+CN+MTX teve dosagem menor comparado aos grupos CONT, AIA+CL e AIA+CN ($p<0,05$).

Tabela 2. Dados das análises bioquímicas do fígado

	CONT	AIA	AIA+CL	AIA+CN	AIA+MTX	AIA+CL+MTX	AIA+CN+MTX
GSH	0,37± 0,04	0,16± 0,01[a]	0,18± 0,01[a]	0,19± 0,03[a]	0,13± 0,01[a]	0,15± 0,006[a]	0,13± 0,006[abc]
CAT	6,64± 0,77	9,81± 0,33[a]	8,44± 1,0	9,07± 0,34[a]	8,87± 0,45[a]	7,254± 0,32[bde]	8,801± 0,56[af]
SOD	370,5± 49,25	163,5± 11,7[a]	218,4± 30,45[a]	197,9± 30,22[a]	149,6± 15,43[a]	152,7± 6,015[a]	130,3± 6,467[abcf]
GST	91,47± 10,08	67,45± 2,42[a]	62,75± 8,60	67,78± 6,26	79,66± 4,68[b]	91,68± 3,81[bcd]	86,71± 4,57[bcd]
EROs	215,8± 11,74	295,1± 30,42[a]	241,5± 14,83	223,9± 13,14	404,0± 63,70[a]	281,3± 44,87	309,5± 43,12
NITRITO	101,9± 11,60	314,5± 66,97[a]	110,2± 12,38[b]	142,5± 22,27[b]	90,95± 16,56[b]	91,85± 16,56[b]	68,56± 6,527[bcd]
NAG	0,97± 0,13	0,28± 0,02[a]	0,27± 0,01[a]	0,14± 0,01[abc]	0,13± 0,01[abcd]	0,08± 0,004[abcde]	0,09± 0,001[abcde]
MPO	0,97± 0,13	0,28± 0,02[a]	0,29± 0,02[a]	0,15± 0,01[abc]	0,11± 0,005[abcd]	0,08± 0,004[abcde]	0,09± 0,002[abcde]

GSH (Glutationa; µg GSH/g tecido), CAT (Catalase; mmol/min/mg proteína), SOD (Superóxido dismutase; U SOD/mg proteína), GST (Glutationa-s-transferase; mmol/min/mg proteína), LOOH (hidroperóxidos lipídicos; mmol/mg tecido), NAG e MPO (N-acetilglicosaminosidase e Mieloperoxidase; mDO/mg proteína). Resultados expressos por média±erro padrão. *n*=6, grupos: grupo controle (CONT), grupo artrítico (AIA), grupo tratado com curcumina livre (AIA+CL), grupo artrítico tratado com nanoemulsões de curcumina (AIA+CN), grupo artrítico tratado com metotrexato (AIA+MTX), grupo artrítico tratado com curcumina livre e metotrexato (AIA+CL+MTX) e, grupo artrítico tratado com nanopartículas de curcumina e metotrexato (AIA+CN+MTX). Dados são expressos por média ± erro padrão.

3.3 Análise Morfométrica

Na análise da densidade de hepatócitos (Tabela 2), houve um aumento nos grupos AIA, AIA+CL e AIA+CN ($p<0,05$) comparados ao CONT, já os grupos AIA+MTX, AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX tiveram redução da densidade de hepatócitos ($p <0,05$) em relação ao grupo controle. Os grupos AIA+CL, AIA+MTX, AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX ($p=<0,05$) reduziram comparados ao grupo AIA. Os grupos AIA+MTX e AIA+CL+MTX também diminuíram em relação ao grupo AIA+CL, AIA+CN e AIA+CN+MTX ($p<0,05$).

Na análise do perfil celular do hepatócito (Tabela 2), todos os grupos apresentaram uma redução em relação ao controle ($p<0,05$). O grupo AIA+CL reduziu e os grupos AIA+CN, AIA+MTX e AIA+CL+MTX aumentaram comparados ao grupo AIA ($p<0,05$). Os grupos AIA+CN, AIA+MTX, AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX também aumentaram em relação ao grupo AIA+CL ($p<0,05$). Já o grupo AIA+CN+MTX teve redução no seu perfil celular ($p<0,05$) comparado aos grupos AIA+CN, AIA+MTX e AIA+CL+MTX.

Em relação ao citoplasma (Tabela 2), todos os grupos tiveram uma redução de sua área e quando comparados ao grupo CONT ($p<0,05$). A área do citoplasma dos grupos AIA+CL ($p<0,05$) foi menor quando comparado com o grupo AIA ($p<0,05$). O grupo AIA+CN aumentou em relação ao AIA ($p<0,05$). Já o grupo AIA+CN+ MTX reduziu em relação ao grupo AIA+CN ($p<0,05$).

Já a área do núcleo (Tabela 2), apenas o grupo AIA+CN aumentou em relação ao grupo CONT ($p<0,05$). Os grupos AIA+CL, AIA+CN e AIA+CL+MTX ($p<0,05$) aumentaram a área do núcleo em relação ao grupo artrítico. E o grupo AIA+CN+MTX diminuiu em comparação ao grupo AIA+CN e AIA+CL+MTX ($P<0,05$).

Tabela 3. Tabela com valores de densidade de hepatócitos, área do perfil celular, citoplasma e núcleo

	CONT	AIA	AIA+CL	AIA+CN	AIA+MTX	AIA+CL+MTX	AIA+CN+ MTX
N° de hepatócitos	151,7±0,8812	167,0±0,94[a]	163,4±0,68[a]	164,9±0,73[a b]	145,9±0,88[abcd]	146,3±0,73[abcd]	154,6±0, 71[acdf]
Perfil celular*	281,1± 221,0;344,1	194,3±160,8; 254,7[a]	169,7±136,1; 215,1[ab]	211,2±167,3; 251,5[abc]	207,2±172,1; 270,2[abc]	210,3±164,3; 279,2[abc]	188,8±13 8,8; 232,2[acdef]
Citoplasma *	217,2±163,7; 274,6	130,3±101,4; 180,7[a]	106,0±85,07; 134,4[ab]	157,0±116,3; 192,8[abc]	141,2±109,2; 190,5[acd]	145,6±103,2; 198,6[a]	128,7±84 ,83;157,0 [acdf]
Núcleo *	32,20-23,03; 40,22	30,64-25,19; 39,62	33,32-24,18; 42,83[b]	33,71-28,08; 42,39[abe]	31,69-26,16; 40,44	32,68-27,31; 41,33[b]	30,47-22, 43; 45,89[df]

Grupo CONT (controle); grupo AIA (artrite induzida por adjuvante), grupo AIA+CL (artrite tratada com curcumina livre); grupo AIA+CN (artrite tratada com curcumina nanoemulsificada); grupo AIA+MTX (artrite tratada com metotrexato); grupo AIA+CL+MTX (artrite tratada com curcumina livre associado ao metotrexato) e grupo AIA+CN+MTX (artrite tratada com curcumina nanoemulsificada associado ao metotrexato).*Resultados expressos mediana com intervalo interquartil de 95% de intervalo de confiança (*n*=5)

O score inflamatório demonstrou que o grupo CONT (20%) e o grupo AIA+CL+MTX (30%) tiveram um grau leve de inflamação, já os grupos AIA (45%), AIA+CL (37,5%), AIA+CN (37,5%), AIA+CL+MTX (30%), e AIA+CN+MTX (42,5%), apresentaram grau moderado de inflamação.

4.DISCUSSÃO

A artrite reumatoide apresenta um comprometimento sistêmico podendo afetar o fígado dos pacientes e dependendo da medicação esse comprometimento pode ser ainda maior. Por isso, o uso de substâncias naturais com efeitos benéficos e baixos efeitos colaterais são relevantes para o tratamento dessa patologia. Neste experimento é possível observar alterações no sistema antioxidante, massa do fígado, além de densidade e tamanho dos hepatócitos nos animais artríticos.

Através da análise dos parâmetros oxidativos observou-se que a Artrite promoveu alterações como a redução na atividade enzimática da SOD e GST, aumento da atividade da CAT e redução de GSH (grupos sulfídricos não proteicos) nos animais artríticos. Ahmed, 2024 (10) em um trabalho de revisão também demonstra haver diminuição dos níveis de GSH e da atividade enzimática de GST e SOD no soro de pacientes artríticos. Outro parâmetro avaliado foi o EROs que aumentou nos pacientes artríticos, assim como em nosso trabalho. Já Almeida et al. (11) estudando o fígado de ratos *Holtzman* também observou a queda nos níveis de GSH, aumento de EROs e diminuição da atividade enzimática da SOD, contudo houve aumento da atividade da CAT. Esses resultados demonstram que a Artrite gera estresse oxidativo no fígado. E buscando avaliar os efeitos do tratamento sobre estes parâmetros observou-se que o tratamento somente com MTX manteve os mesmos resultados dos animais artríticos sem tratamento. Os grupos AIA+CL, AIA+CN, AIA+CL+MTX e AIA+CN+MTX também tiveram as alterações sem, contudo, apresentarem aumento do EROs.

Na avaliação dos parâmetros inflamatórios observa-se que houve um aumento significativo de nitrito no grupo AIA, tendo redução nos grupos de tratamento com a curcumina, com o MTX ou em associação. O grupo AIA+CN+MTX foi o grupo o qual mais houve redução de nitrito, o que corrobora com a literatura, onde pacientes com psoríase que fizeram uso do MTX mostraram que após o uso da medicação, tiveram níveis de nitrito reduzido (12), demonstrando que o MTX é eficaz para redução do mesmo, bem como a curcumina, que possui capacidade de doar elétrons neutralizando espécies reativas de nitrogênio, como o nitrito. (13). Já quando avaliamos a atividade da Mieloperoxidase e da N-acetil-β-D-glicosaminidase observa-se uma redução das mesmas em todos os grupos artríticos. Sendo que o tratamento com nanoemulsão e com MTX associada ou não com curcumina livre ou em nanoemulsão, reduziu ainda mais estes parâmetros. Apesar da redução dos marcadores inflamatórios da MPO, observou-se aumento de infiltrados inflamatórios em todos os grupos artríticos. Em ensaios *in vitro*, Franck *et al.* (14)avaliou o cultivo de neutrófilos e o potencial da curcumina como anti-inflamatório, e observou que houve uma diminuição da atividade da MPO. A curcumina também já foi descrita (15) pelo seu potencial de suprimir a atividade de macrófagos, células que são responsáveis pela liberação da NAG, o que em ambos os casos da MPO e NAG são condizentes com nossos achados. Já o MTX por sua vez, pode levar a efeitos adversos como focos de inflamação hepática (16).

As análises morfométricas do fígado demonstraram que o mesmo apresentou uma redução de sua massa, atrofia dos hepatócitos e aumento da densidade celular. Estudos têm demonstrado que a inflamação contribui para a atrofia dos hepatócitos através da liberação de citocinas, pela indução do estresse celular, induzindo a alteração do metabolismo levando a inibição do crescimento celular. Os resultados de estresse oxidativo encontradas em nosso estudo podem ser uma das causas da atrofia dos hepatócitos nos animais artríticos. (17)

Em resumo, a artrite induzida por adjuvante promove alteração nos parâmetros oxidativos em todos os grupos artríticos no fígado de ratos *Holtzman* após 30 dias de indução. No grupo AIA aumenta as Espécies Reativas de Oxigênio caracterizando o estresse oxidativo e o tratamento com MTX isolado não altera esse parâmetro. No entanto, os outros tratamentos não apresentam aumento de EROs. A AIA aumenta os níveis de nitrito e todos os tratamentos são capazes de restaurar aos valores do controle. A AIA também promoveu redução da área do hepatócito caracterizando que o estresse celular pode afetar seu metabolismo.

5. CONCLUSÃO

Nenhum dos tratamentos com MTX, Curcumina livre, Curcumina nanoemulsificada isoladas ou em associação foram capazes de restaurar a homeostasia ou prejudicar ainda mais o fígado de ratos com AIA após 22 dias de tratamento. Compreender os mecanismos em que a inflamação compromete a homeostase do fígado de pacientes com AR é crucial para o desenvolvimento de estratégias capazes de mitigar os danos ao fígado e promover a sua recuperação.

FINANCIADORES

CAPES

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Laboratório de Histologia, a doutora Carolina Trevisoli Palomo e a docente Rosilene Fressatti Cardoso, do Itambém aos Laboratórios da UEM de Bacteriologia médica da UEM, de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Farmácia de São José do Rio Preto.

REFERÊNCIAS

1. Venetsanopoulou AI, Alamanos Y, Voulgari P V., Drosos AA. Epidemiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis Development. Mediterr J Rheumatol [Internet]. 2023;34(4):404. Available from: http://mjrheum.org/assets/files/792/file525_1799.pdf
2. Deshmukh R. Rheumatoid arthritis: Pathophysiology, current therapeutic strategies and recent advances in targeted drug delivery system. Mater Today Commun [Internet]. 2023;35(April 2022):105877. Available from: https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105877
3. Andrei-Flavius Radu and Simona Gabriela Bungau. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. Cells. 2021;42(5):237–42.
4. Radovanović-Dinić B, Tešić-Rajković S, Zivkovic V, Grgov S. Clinical connection between rheumatoid arthritis and liver damage. Vol. 38, Rheumatology International. Springer Verlag; 2018. p. 715–24.
5. Schjøtt J. Vol. 11, Regional Drug Information Centre. 2016. p. 13 Adverse Effects of Drugs and Toxins on the Liver. Available from: www.intechopen.com
6. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. Jt Bone Spine [Internet]. 2019;86(3):301–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004
7. Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. Eur J Med Chem [Internet]. 2018;158:502–16. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.027
8. Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, et al. Curcumin in liver diseases: A systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. Nutrients. 2018;10(7).
9. da Silva MC, Fabiano LC, da Costa Salomão KC, de Freitas PLZ, Neves CQ, Borges SC, et al. A Rodent Model of Human-Dose-Equivalent 5-Fluorouracil: Toxicity in the Liver, Kidneys, and Lungs. Antioxidants. 2023 Apr;12(5):1005.
10. Ahmed AB, Chetia P, Kalita H. A Systematic Review on Association of Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis Based on Cross-Sectional Case-Control Studies. Indian J Pharm Educ Res. 2024;58(3):709–21.

11. De Almeida Gonçalves G, De Sá-Nakanishi AB, Wendt MMN, Comar JF, Bersani Amado CA, Bracht A, et al. Green tea extract improves the oxidative state of the liver and brain in rats with adjuvant-induced arthritis. Food Funct. 2015;6(8):2701–11.
12. Tekin NS, Ilter N, Sancak B, Ozden MG, Gurer MA. Nitric oxide levels in patients with psoriasis treated with methotrexate. Mediators Inflamm. 2006;2006:1–5.
13. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A review of its effects on human health. Foods. 2017;6(10):1–11.
14. Franck T, Aldib I, Zouaoui Boudjeltia K, Furtmüller PG, Obinger C, Neven P, et al. The soluble curcumin derivative NDS27 inhibits superoxide anion production by neutrophils and acts as substrate and reversible inhibitor of myeloperoxidase. Chem Biol Interact [Internet]. 2019;297(October 2018):34–43. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.008
15. Mohammadi A, Blesso CN, Barreto GE, Banach M, Majeed M, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent. J Nutr Biochem [Internet]. 2019;66:1–16. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.12.005
16. Gaies E, Jebabli N. Methotrexate Side Effects: Review Article. J Drug Metab Toxicol. 2012;3(4).
17. Banerjee P, Gaddam N, Chandler V, Chakraborty S. Oxidative Stress–Induced Liver Damage and Remodeling of the Liver Vasculature. Vol. 193, American Journal of Pathology. Elsevier Inc.; 2023. p. 1400–14.

Palavras-chave: nanoemulsões; hepatotoxicidade; estresse oxidativo.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

PERINATAL FACTORS ASSOCIATED WITH THE USE OF HUMAN MILK SUPPLEMENTATION: HOW TO MINIMIZE DAMAGE?

Christyna Beatriz Genovez Tavares[1]; Joana Maira Valentini Zacarias[2]; Victor Hugo de Souza[3]; Jesuí Vergílio Visentainer[4]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[5].

[1]Postgraduate Student (Doctorate), Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Maringá-Pr/Brazil;
[2]Doctor. Postdoctoral student and advisor in the Postgraduate Program in Biosciences and Pathophysiology at the State University of MaringáPr/Brazil. Adjunct Professor, Faculty of Medicine of Marília – SP/Brazil;
[3]Doctor. Postdoctoral fellow at the State University of Maringá. PhD Professor, from Unicesumar University. Maringá-Pr/Brazil;
[4]Doctor. Advisor of the Postgraduate Program in Food Sciences at the State University of Maringá-Pr/Brazil.
[5]Doctor. PhD Professor and Advisor of the Postgraduate Program in Biosciences and Pathophysiology at the State University of Maringá-Pr/Brazil.

e-mail: cbgenovez@gmail.com

1. INTRODUCTION

Breastfeeding has numerous benefits, such as, strengthening the emotional bond between mother and child, nutritional benefits of human milk (HM) and broad protection against diseases and complications.[1] In addition, HM has biological aspects that ensure its ability to act as an important immunomodulatory agent and, consequently, prepares this individual for self-defense.[2]

According to the World Health Organization (WHO), low birth weight (LBW) babies has weigh less than 2,500 grams and premature babies (PTNB) are those with a gestational age (GA) of less than 37 weeks.[3] For this population, both the first few weeks of life are considered critical, both in relation to growth and nutritional quality. There is weight loss between the fourth and ninth day of life; from then on, growth speed tries to mimic intrauterine rates and birth weight (BW) is usually recovered between eight days of life, for older babies and, close to twenty-four days, for very low birth weight premature newborns(VPTLBW).[4]

When the mother's own milk is made available to PTNB as soon as possible after birth, the development of several complications is prevented, including necrotizing enterocolitis. In the absence of this food, it is recommended to use pasteurized HM (PHM) and, as a last resort, specific infant formulas for preterm infants are used.[5]

Despite the numerous health benefits of PTNB infants, it is not always possible to exclusively use the mother's own milk or PHM from human milk banks (HMB) as a form of nutrition. As a consequence, colonization of the digestive tract of PTNB infants and LBW, the immaturity of defenses and artificial feeding can cause necrotizing enterocolitis, which affects the ileal and colonic walls, leading to peritonitis and abnormal microbiological colonization.[6]

To avoid these problems, HMBs throughout Brazil work in a systematic and standardized way to obtain quality milk, primarily for preterm and LBW infants who do not suck.[7] However, in order to recover more quickly, weight loss is common in neonatology, the use of supplements or fortifiers based on bovine milk derivatives, as additives to PHM, with a commercial supplement called FM85® being commonly used in Brazil, which adds nutrients to HM.[4] But, there is concern regarding this supplementation , therefore, it can lead to changes in the defense action that HM provides, as well, as causing allergies and intolerances to the gastrointestinal tract of PTNBs who receive supplemented PHM. [8, 9]

In this context, comparing the differences between PTNBs who receive HM or PHM, with those who receive HM supplemented with FM85®, is necessary to elucidate the advantages and disadvantages of these two nutritional schemes. Therefore, we intend to verify the perinatal factors associated with the use of fortified HM and raise proposals for care that minimize its use.

2. MATERIAL AND METHODS

Cross-sectional, analytical, case-control study carried out at the State University of Maringá (UEM) and the University Hospital of Maringá (HUM), in the HMB, Neonatal-ICU and Immunogenetics Laboratory sectors of the Department of Basic Health Sciences at UEM. The collected samples were stored during the study and used to develop the defined objectives.

The total population was 137 babies. PTNB and LBW hospitalized in the HUM Neonatal-ICU during the data collection period, which took place from June 2022 to May 2023, were included in the research. 38 children met the inclusion criteria. Extreme preterm infants (<28 weeks), VPTLBW (BW<1000g), those who had associated comorbidities, those who used lactic formulas and those whose guardians did not agree to participate in the research were excluded.

The data sources were the PTNB's medical records. Perinatal variables were categorized as: sex, type of delivery, GA, BW, head circumference (HC), maternal age and parity.

Statistical associations were made between the variables and the type of food used by the baby, with cases being considered those who used the FM85® and controls those who did not use it. The data were compiled and comparisons were made using the chi-square ($\chi 2$) and t-Student tests. The established significance was $P<0.05$. The research was approved by the Ethics Committee (COPEP/UEM/5.257.520), with agreement and signature of the Free and Informed Consent Form by the person responsible.

3. RESULTS

Among the 38 PTNB included in the study, 57.90% were female and 42.10% were male. The rate of very premature newborns (VPTNB) was 44.74%; however, in relation to BW, VPTLBW presented lower rates (26.32%). In relation to HC, a proportionally higher rate of altered values was found for boys (37.50%), when compared to girls (27.27%). The most common type of birth was cesarean section (63.16%), the majority of women were primiparous and secondparous (63.16%), but the percentage of multiparous women was considerable (36.84%). The rate of adolescents and elderly women combined was 34.21%.

When Pearson's $\chi 2$ test was applied, associating the perinatal variables with the nutrition of the case and control groups, the boys were 2.70 times more likely to use the supplement ($P=0.009$), as were the VPTLBW. Children who presented HC with measurements outside expectations also demonstrated a risk 2.67 times higher ($P=0.022$). VPTNBs were 9 times more likely to use the FM85® ($P <0.001$). Babies born by cesarean section had 4.33 more risks ($P=0.001$) and babies born to women of appropriate age for the reproductive period (ARA) were protected from supplementation ($P=0.001$). There was no statistically significant association between parity and the use of FM85®.

In logistic regression with the Student's t-test, possible confounding variables were considered: BW and GA. After these analyses, altered HC continued to be a risk factor ($P=0.004$) and those born by cesarean section began to present even greater chances of supplementation ($P<0.001$). The ARA remained a protective factor for the use of the additive ($P<0.001$). The male sex, which was a risk, became a protective factor ($P=0.030$).

4. DISCUSSION

The study demonstrated that the majority were girls, probably because the samples were collected during the COVID-19 pandemic. Women in poor condition tend to produce girls and stress phenotypes in pregnant women are associated with male vulnerability and poor fetal outcomes.[10,11] An study concluded that the pandemic caused stress on pregnant women, with a disproportionate loss of male fetuses;[12] however, another study found no significance in the post-pandemic sex ratio at birth.[10] Therefore, maternal stress caused by COVID-19 may have influenced female adulthood, but more studies would be needed to confirm whether there really was this or not.

The $\chi 2$ test indicated male sex as a risk factor for supplementation, but after logistic regression (t-Student), this result was not confirmed. Studies [6,12] with VPTLBW also found no difference between the sexes in relation to supplementation. And nutritional guidelines for PTNB include feeding plans with support for development, regardless of gender.[13,14,15]

Preterm infants are classified as late (GA between 34 and 36 weeks), moderate (GA between 32 and 33 weeks), VPTNB (GA between 28 and 31 weeks) and extremely premature (GA below 28 weeks).[4] In this study, 44.74% were PTNB and had a higher risk of supplementation, as were the VPTLBW. The child's health is directly related to weight gain, with weight being one of the main indicators of preterm infant growth[16]. Therefore, identifying the contribution of prematurity and intrauterine growth restriction (IUGR) to LBW is essential in preventing this condition.[9]

An adequate diet is essential to meet the needs of newborns,[3] especially VPTLBW and IUGR infants, due to the greater risk of postnatal morbidity/mortality.[15] The purpose of nutrition for PTNBs is to promote growth similar to intrauterine growth (15g/kg/day) balancing the supply of proteins and energy.[8] Therefore, for premature babies to maintain this rhythm, intensive feeding is necessary, due to the difficult postnatal adaptation and need to recover growth, which ensures health and quality of life.[15]

Supplementation with FM85®, however, can modify immunological protection and intestinal

Regarding HC, it was observed that children who presented measurements outside the parameters were more likely to use FM85®. The HC measures brain development and in PTNBs the goal is to achieve growth of 0.5-0.8 cm/week.[16,20] Therefore, nutritional support actions and practices that promote better growth and development of PTNBs are essential. [8,20,21,22]HM is associated with better performance in intelligence tests and can increase educational level and income in adulthood.[23] This is a compelling justification for the use of homologous supplementation, considering that there is no strong evidence that supplemented HM, achieve important results, except the slight increase in intra-hospital growth.[22]

Cesarean section rates were also associated with the use of additives and the findings were confirmed in logistic regression. According to the WHO, rates above 15% suggest abusive use of this procedure, requiring effective actions to reduce unnecessary cesarean sections.[24,25] Prenatal monitoring makes it possible to identify problems and risks in a timely manner. Quality, not just the number of consultations, is the big challenge. Government programs must expand and qualify assistance to pregnant women and newborns, avoiding high-risk outcomes.[24,26]

ARA was a protective factor for supplementation, and these results were maintained after logistic regression. But teenagers and elderly women accounted for 34.21%. These rates can be explained because HUM is a reference for high-risk pregnancies, monitoring these women from prenatal care to the postpartum period. A study in maternity hospitals in Stork Net showed 20.5% of teenage mothers and a higher frequency of LBW and prematurity in this group. It also showed that elderly mothers are more likely to develop high-risk pregnancies and IUGR. Careful obstetric care minimizes harm to the woman and the newborn,[27,28] reduces avoidable deaths and prevents prematurity.[28]

5. CONCLUSION

Unfavorable perinatal factors such as LBW, altered HC and cesarean delivery were predisposing to the use of the FM85® additive, therefore, public policies to improve the quality of prenatal care and childbirth care could minimize these factors. Furthermore, incentives for HMB can provide greater availability of mother's own milk, greater volume of PHM, production of homologous additives and better guidance for nursing mothers on maintaining lactation. These measures can lead to better health outcomes for premature and LBW infants, as the use of HM and homologous additives is more physiological.

FUNDERS

CAPES e CNPq.

REFERENCES

01. Tavares, CBG. Técnicas de amamentação. In: Carvalho, MR; Gomes, CF. Amamentação: bases científicas. – 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. p. 145-162
02. Santos, RL; Elsas, MIG. Imunologia do leite materno. In: Carvalho, MR; Gomes, CF. Amamentação: bases científicas. – 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. p.73-81
03. Guerra E, Downey E, O'Mahony JA, Caboni MF, O'Shea CA, Ryan AC, et.al. Influence of duration of gestation on fatty acid profiles of human milk. Eur J LipidSciTechnol [Internet]. 13 abr 2016 [citado 23 ago 2024];118(11):1775-87. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ejlt.201500396
04. Carneiro-Sampaio M, Slhessarenko N. Vamos reduzir o volume de sangue colhido para exames laboratoriais? Rev Paul Pediatr 2014;32(2):291-2
05. Camilo, AT, Bôto, EG, Ferreira, FV, Chagas Neto, F. Interações entre o aleitamento materno e a microbiota intestinal infantil: uma revisão de literatura. RevPed SOPERJ. 2020; 20(3) 96-101. DOI: http://dx.doi.org/10.31365/issn.2595-1769. v20i3p96-101
06. Véras RM, Yépez MAT. A maternidade na política de humanização dos cuidados ao bebê prematuro e/ou de baixo peso – Programa Canguru. Ver. Estud. Fem. 2010; Jan-Abr; 18(1): 61-80
07. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de leite humano: prevenção e controle de riscos/ Agência nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2008. 160p
08. AMB. Associação Médica Brasileira. Conselho Federal de Medicina [Internet]. Terapia Nutricional no Prematuro Extremo. Projeto Diretrizes, 2011 [cited 2023 Jan 19]. Availablefrom: https://amb.org.br/files/_BibliotecaAntiga/terapia_nutricional_no_prematuro_extremo.pdf
09. SBP. Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Neonatologia. Prevenção da prematuridade – uma intervenção da gestão e da assistência. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2017. n.2. (Documento científico). Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/20399b-DocCient_-_Prevencao_da_prematuridade.pdf
10. Pavic, D. Sex RatioatBirthafterConcurrentEventsofEarthquakesandthe COVID-19 Pandemic in Croatia. Int. J. Environ. Res. Public Health 2024; 21(5): 572. https://doi.org/10.3390/ijerph21050572
11. Walsh, K, McCormack, CA, WebstereR , Pinto A, Lee S, Tianshu F, Krakovskye HS, O'Grady SM, Tycko B, Champanhe FA, Wernerd EA, Liu G, Monk C. Fenótipos de estresse pré-natal materno associados ao neurodesenvolvimento fetal e aos resultados do parto. PNAS | 2019; 116 (48): 23996 - 24005. https://doi.org/10.1073/pnas.1905890116
12. Masukume G, Ryan M, Masukume R, Zammit D, Grech V, Mapanga W, et.al. COVID-19 induced birth sex ratio changes in England and Wales. PeerJ [Internet]. 17 fev 2023 [citado 23 ago 2024];11:e14618. Disponível em: https://doi.org/10.7717/peerj.14618
13. RBLH. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. [Internet]. BLH-IFF/NT- 41.11: distribuição de leite humano ordenhado. [cited 2024 Jul 21]. Availablefrom: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_41.11_distribuicao_lho-1.pdf
14. RBLH. Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano. [Internet]. BLH-IFF/NT- 42.11: receptores: triagem, seleção e acompanhamento. [cited 2024 Jul 21]. Availablefrom: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_42.11_receptores_triagem_selec_acomp.pdf
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Guia de orientações para o Método Canguru na Atenção Básica: cuidado compartilhado/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 56 p
16. SBP. Sociedade brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Neonatologia. Monitoramento do crescimento de recém-nascidos pré-termos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria. São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2017. n.1. (Documento científico). Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2017/03/Neonatologia-Monitoramento-do-cresc-do-RN-pt-270117.pdf

17. Grance, TRS, Serafin, PO, Thomaz, DMC, Palhares, DB. Aditivo homólogo para a alimentação do recém-nascido pré-termo de muito baixo peso. Rev Paul Pediatr, 2015; 33 (1):28-33. http://dx.doi.org/10.1016/j.rpped.2014.07.001
18. Brunser, OT.El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y surelaciónconlasalud humana. Rev. chil. nutr, 2013; 40(3): 283-289.
19. Thomaz, DM, Serafim, PO, Palhares, DB, Melnikov, P, Venhofen, L, Vargas, MO. Comparação entre suplementos de leite humano homólogos e um suplemento comercial para recém-nascidos de muito baixo peso. J Pediatr, 2012; 88(2): 119 – 124. http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2166
20. Graber, EG. [Internet]. Crescimento físico de lactentes e crianças - Pediatria - Manuais MSD edição para profissionais. Revisado em Março, 2023. [cited 2024 Aug 02]. Availablefrom: https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/pediatria/crescimento-e-desenvolvimento/crescimento-f%C3%ADsico-de-lactentes-e-crian%C3%A7as#Comprimento_v7821024_pt
21. FIOCRUZ/IFF. [Internet]. Nutrição do recém-nascido pré-termo. Portal de Boas Práticas em Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente. Atenção ao recém-nascido. [cited 2024 Aug 02]. Availablefrom: https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/atencao-recem-nascido/nutricao-do-recem-nascido-pre-termo/
22. CommitteeonNutrition American AcademyPediatrics. Nutritionalneedsofpreterminfants. PediatricNutritionHandbook. 6th Edition ed. Elk Grove Village, Il: American AcademyofPediatrics; 2009.
23. Victora CG, Horta BL, de Mola CL, Quevedo L, Pinheiro RT, Gigante DP, et.al. Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from Brazil. Lancet Glob Health [Internet]. Abr 2015 [citado 23 ago 2024];3(4):e199-e205. Disponível em: https://doi.org/10.1016/s2214-109x(15)70002-1
24. Leal M C, Esteves-Pereira AP, Nakamura-Pereira M, et al. Prevalenceandriskfactorsrelatedtopretermbirth in Brazil. Reprod Health. 2016;13(S3):127.
25. Dias BAS, Leal MC, Esteves-Pereira AP, Nakamura-Pereira M. Variações das taxas de cesariana e cesariana recorrente no Brasil segundo idade gestacional ao nascer e tipo de hospital. Cad. Saúde Pública [Internet]. 2022;38(6):1-13 https://doi.org/10.1590/0102-311XEN073621
26. Oliveira, LL, Gonçalves, AC, Costa, JSD, Bonilha, ALL. Fatores maternos e neonatais relacionados à prematuridade. RevEscEnferm USP. 2016;50(3):382-389
27. Barreto CTG, Tavares FG, Theme-Filha M, Farias YN, Pantoja LN, Cardoso AM. Baixo peso ao nascer, prematuridade e restrição de crescimento intra-uterino: resultados dos dados de base da primeira coorte de nascimentos indígenas no Brasil (coorte de nascimentos Guarani). BMC Pregnancy and Childbirth. 2020; 20:748. Disponívelem: https://doi.org/10.1186/s12884-020-03396-8
28. Ferreira, PB, Luiz, L, Ribeiro e Silva, R, Silva, JC. Adverse maternal-fetal outcomesrelatedtoparity in a maternity hospital in Southern Brazil. Saude e Pesqui. 2023; 16(1): e-11176.

Keywords: preterminfants; humanmilk; dietarysupplements

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ESTUDO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES RURAIS

Clayton Mendonça Ferreira[1]; Beatris Truzzi da Silva[1]; Anna Beatriz da Silva[2]; Renata Simeão[2]; Patrícia Daniele Silva dos Santos[3]; Miguel Machinski Junior[4]; Simone Aparecida Galerani Mossini[4,5];

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

[2]Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[3]Academica de Pós-graduação (Pós-doutorado) no programa de Pós-Graduação em Química

[4]Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[5]Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: claytonmendoncaferreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores de risco para a saúde humana e meio ambiente, os agrotóxicos apresentam uma posição de destaque. No Brasil, a intoxicação provocada por esses compostos é mais preocupante, visto que, o país é um dos maiores consumidores de agrotóxicos (1). Segundo Dados do Departamento de Informática do SUS (DATASUS), no ano de 2023, foram 5.200 notificações de intoxicação aguda por agrotóxicos agrícolas, no qual a região nordeste e sul foram as que mais apresentaram números de notificações, com 1.385 e 1.377 casos respectivamente (2).

Os herbicidas são uma classe de agrotóxicos empregados para controlar o crescimento de espécies específicas ou até mesmo matá-las, e possuem ação principalmente no controle de ervas classificadas como daninhas (3). O herbicida, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é amplamente empregado no controle de ervas daninhas de folhas largas na agricultura, áreas de infraestrutura, ambientes aquáticos e gramados. Diferente de outros praguicidas, o 2,4-D não sofre biotransformação no organismo humano e é excretado principalmente pela via urinária, o que possibilita o uso da matriz urina como material biológico e fonte de pesquisa para presença do composto e avaliação de exposição (4).

O 2,4-D é absorvido de forma rápida pelo trato gastrointestinal e pode ser encontrado em tecidos e fluidos corporais em um curto período. O metabolismo do 2,4-D é predominantemente hepático, com a excreção ocorrendo principalmente por via urinária, o que sugere um potencial para acúmulo em órgãos específicos em casos de exposição prolongada. 2,4-D pode interferir em processos biológicos essenciais, como a síntese de proteínas e a integridade celular, resultando em respostas adversas que podem ser desde efeitos leves a graves dependendo da dose e da duração da exposição (5.6).

A avaliação prévia de uma exposição a agentes químicos permite a diminuição da ocorrência de efeitos nocivos à saúde. Na exposição ocupacional, os trabalhadores são expostos no momento do manuseio, transporte e/ou aplicação nas lavouras, estando em muitos casos desprotegidos contra estas misturas de agrotóxicos (7). Dessa forma, medidas de prevenção e controle podem ser implantadas a partir de informações referentes à monitorização das exposições a produtos químicos durante o processo de trabalho.

Em toxicologia ocupacional, existem poucos biomarcadores para monitorar as muitas substâncias a que os trabalhadores estão expostos. No âmbito da exposição aos agrotóxicos, é bastante utilizada a determinação da atividade das colinesterases, que é um bio indicador de efeito, para agentes que apresentam esse mecanismo de ação. Entretanto, nem todos os agrotóxicos inibem essas enzimas, como é o caso do 2,4D, sendo necessários outros indicadores que possibilitem avaliar a exposição. A pesquisa do próprio agente químico na urina, também são utilizados, embora não regulamentados, pelos órgãos governamentais, sendo caracterizados como bioindicadores de exposição, uma vez que comprovam a exposição através da presença qualitativa ou quantitativa do agrotóxico em amostras biológicas dos trabalhadores (8).

O monitoramento de intoxicações ocupacionais no Brasil é regulamentado pela NR 7 (Norma Regulamentadora). Contudo, não há biomarcadores para as outras classes de agrotóxicos (9). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas que sejam capazes de identificar outros indicadores biológicos referentes às demais classes de agrotóxicos. Deve-se levar em consideração que alguns fatores podem interferir na interpretação dos dados referente às análises laboratoriais realizadas. Parâmetros fisiológicos e nutricionais, suscetibilidade individual, sexo, uso de fármacos, tabagismo e etilismo podem interferir na interpretação dos resultados dos bioindicadores avaliados (10).

Desta forma, o projeto teve por objetivo analisar dados sociodemográficos e de exposição ocupacional de trabalhadores rurais do norte central paranaense e otimizar, validar e avaliar a aplicabilidade de uma metodologia para determinação urinária do herbicida Ácido diclorofenoxiacético (2,4D). Esta proposta visa auxiliar na implementação de novos métodos para avaliação ocupacional frente a substâncias químicas potencialmente tóxicas, assim como fortalecer os cuidados preventivos à saúde dos trabalhadores rurais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido em conjunto com as atividades do Projeto de Extensão Institucional "Monitoramento da Exposição Ocupacional" (Processon°7303/08), do Núcleo de Pesquisa Centro de Controle de Intoxicações da Universidade Estadual de Maringá, do Laboratório de Toxicologia da UEM (LATOX-UEM), do projeto de pesquisa institucional "Agrotóxicos: impactos na saúde humana" , e das atividades dos projetos "Promoção à saúde de trabalhadores rurais: análise do comportamento de segurança na manipulação e aplicação de agrotóxicos" e "Promoção à saúde de trabalhadores rurais: análise do comportamento de segurança na manipulação e aplicação de agrotóxicos – Parte II", estes últimos financiados pelo programa Universidade Sem Fronteiras do Fundo Gestor Paraná. O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (CAAE N° 65018017.7.0000.0104), parecer nº 6.209.432.

2.1. Amostragem

Foram utilizadas para analisar os dados sociodemográficos e de exposição ocupacional de trabalhadores rurais informações coletadas de questionários elaborados tendo como guia o protocolo de Avaliação das Intoxicações Crônicas por Agrotóxicos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (11). Foram utilizadas para o estudo amostras de urina de agricultores da cidade de Cafeara e Centenário do Sul. As amostras foram coletadas em copo coletor de polipropileno estéril por micção espontânea.

2.2. Otimização e Análise Cromatográfica

2.2.1. Preparo do padrão de 2,4-D e curva de calibração

Para o preparo da solução padrão 2,4-D (Aminomethilphosphonic acid - Sigma-Aldrich®) pesou-se 0,0010 g que foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura, obtendo uma concentração de 0,1 mg/mL, sendo está a solução estoque, a partir dela preparou-se a solução intermediária (SI) obtendo uma concentração de 0,01 mg/mL.

Para o preparo da curva de calibração realizou-se diluições seriadas da SI obtendo concentrações de 800, 80, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 ng/mL, todas as análises foram feitas em duplicata.

2.2.2. Preparo do branco e amostras fortificadas

Para o preparo do branco, foi coletada urina de voluntários saudáveis, não expostos ao herbicida 2,4-D, para realização da análise em triplicata. Para o preparo das amostras fortificadas, a mesma amostra foi adicionado do padrão 2,4-D em três concentrações, baixa 10 ng/mL, média 20 ng/mL e alta 40 ng/mL, para posterior extração e quantificação de 2,4-D.

2.2.3. Método de Extração para 2,4-D

O método utilizado foi o DLLME (do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction), que emprega um solvente dispersor, solúvel tanto no solvente extrator (fase orgânica) quanto na amostra (fase aquosa), e um solvente extrator, que não se mistura com a fase aquosa. A técnica é baseada em um sistema ternário de solventes. A DLLME é uma técnica de extração e pré-concentração de amostras, que se destaca por sua miniaturização, baixo custo, rapidez e alta eficiência, além de ser amplamente aplicável em campo (12). Até o momento, não há registros do emprego da técnica DLLME em urina na busca de pesquisa de agrotóxicos, o que torna este estudo inovador na exploração de seu potencial nesse tipo de matriz. Sua implementação nesse contexto pode abrir novas perspectivas para a extração e pré-concentração de amostras biológicas. Desta forma a técnica foi executada da seguinte maneira, em um tubo de ensaio foi pipetado 900 µL de amostra, 800 µL de diclorometano e 600 µL de acetonitrila, ambos graus HPLC da marca Panreac AppliChem, seguido de agitação branda no ultrassom por 2 minutos, e posteriormente centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Após isso, foi feita a transferência da fase extratora (diclorometano) para um frasco vial 300 µl e levado à evaporação do solvente orgânico a 40°C em banho-maria. Em seguida, o extrato foi armazenado a -20ºC até o dia da análise. Posteriormente, o extrato foi ressuspendido em 500 µL de acetonitrila grau HPLC - Panreac AppliChem® e filtrado com o auxílio de uma seringa de 5 mL e filtro da marca, merck S/A de Millex-HV® com membrana de PVDF, 0,45um de poro, 13 mm de diâmetro.

2.2.4. Análise cromatográfica

Para a identificação e quantificação de 2,4-D foi realizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters Symmetry® C18 (50 mm x 4,6 mm x 3,0 um). A composição da fase móvel foi: água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e acetonitrila (B), na proporção 25:75 (v/v) respectivamente. A vazão foi de 0,15 mL/min, com eluição isocrática. O MS foi operado em modo de ionização positivo (ESI+) e os parâmetros utilizados foram: voltagem do capilar = 3,5 kV; voltagem do cone = 25,0 V, temperatura da fonte de ionização = 130 °C; temperatura de dessolvatação do gás N, = 100°C; vazão do gás do cone = 10 L h'; vazão de gás de dessolvatação = 300 L/hr. Espectros de MS foram adquiridos no modo MS Scan (m/z 100-800), enquanto os íons de interesse e os íons fragmentos foram obtidos através do modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), utilizando argônio como gás de colisão a uma pressão de 4 x 10$ Pa. A aquisição dos dados espectrais foi feita com o software MassLynx (Waters®, Milford, EUA).

3. RESULTADOS

Foram coletados dados e amostras biológicas de 70 trabalhadores rurais. Os resultados referentes aos dados sociodemográficos obtidos ao longo da análise estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição sociodemográfica dos agricultores dos municípios de Cafeara e Centenário do Sul-PR, participantes do estudo

Sexo	Feminino	18 (25,71%)
	Masculino	52 (74,29%)
Idade	18-30 anos	2 (2,86%)
	31-50 anos	26 (37,14%)
	51-80 anos	42 (60%)
Raça	Branco	53 (75,71%)
	Pardo	15 (21,43%)
	Amarelo	1 (1,43%)
	Preto	1 (1,43%)
Escolaridade	Analfabeto	2 (2,86%)
	Ensino fundamental	32 (45,71%)
	Ensino médio	19 (27,14%)
	Ensino superior	17 (24,29%)
Renda mensal	R$ 1.000,00 / R$ 4.000,00	42 (60%)
	R$ 4.000,00 / R$ 7.000,00	14 (20%)
	R$ 7.000,00 ou mais	11 (15,72%)
	Não sabem responder	3 (4,28)

n=70

A maioria dos agricultores eram do sexo masculino, com mais de 51 anos, tendo como grau de escolaridade até o ensino fundamental e com renda mensal de R$ 1.000,00 a R$ 4.000,00.

A tabela 2 representa o histórico de intoxicação e agrotóxicos usados com mais frequência nos últimos 3 meses pelos agricultores dos municípios de Cafeara e Centenário do Sul-PR.

Tabela 2 - Histórico de intoxicação e agrotóxicos usados com mais frequência nos últimos 3 meses pelos agricultores dos municípios de Cafeara e Centenário do Sul-PR

Já intoxicou alguma vez?	Sim	18 (25,71%)
	Não	46 (65,71%)
	NR	8 (11,42%)
Agrotóxicos usados com mais frequência nos últimos 3 meses	2,4D	6 (8,57%)
	Glifosato	23 (32,85%)
	Select ®	5 (7,15%)
	Outros	25 (35,71%)
	NR	11 (15,71%)

n=70

O gráfico 1 representa a curva de calibração obtida como descrito em material e métodos, apresentando um coeficiente de correlação (R) de 0,9954. Além disso, os pontos de calibração mostraram

uma distribuição homogênea, sem desvios significativos, confirmando a confiabilidade do modelo linear empregado.

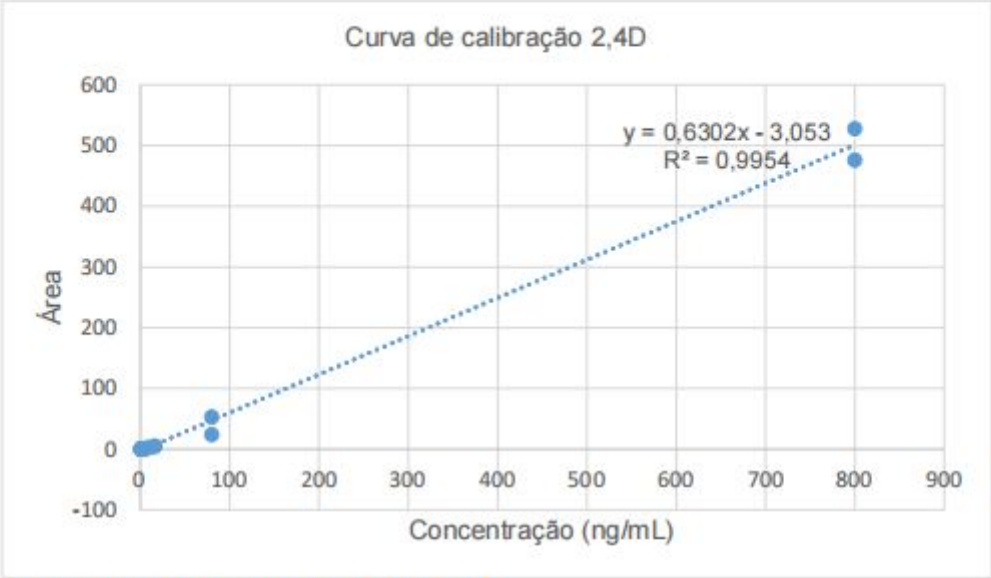


Gráfico 1: Curva de calibração do composto 2,4-D

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram um perfil predominante masculino entre os agricultores, refletindo uma realidade comum no que diz respeito à área agrícola, onde a maior parte da mão de obra ainda é composta por homens (13). A faixa etária predominante, entre 51 e 80 anos, evidencia um envelhecimento significativo da população rural.

Em relação ao nível de escolaridade, a prevalência do ensino fundamental reforça a necessidade de políticas públicas voltadas para a educação no meio rural. Embora haja necessidades específicas, o baixo nível de escolaridade pode limitar informações quanto à intoxicação por agrotóxicos, o acesso a novas tecnologias e também práticas sustentáveis, essenciais para aumentar a produtividade e melhorar as condições de trabalho (14).

A maioria dos agricultores afirmaram não passar por episódios de intoxicação. No entanto, embora a maioria não tenha se intoxicado, todo caso ocorrido é importante, mostrando a necessidade de cuidados à essa população.

Em relação aos agrotóxicos utilizados com mais frequência nos últimos três meses, percebeu-se que o glifosato é o que apresenta maior emprego, seguido do 2,4D e o Select®, esse padrão de uso pode estar relacionado a fatores como a eficácia desses produtos no combate a pragas específicas ou facilidade de acesso e custo-benefício. Além disso, reflete tendências regionais, condições climáticas sazonais e necessidades agrícolas específicas que influenciam a escolha do agrotóxico (15).

Quando à curva de calibração percebe-se que os resultados foram satisfatórios, demonstrado pelo coeficiente de correlação linear (R) próximo de 1, representado relação linear entre as concentrações dos padrões e a resposta analítica, evidenciando que o método foi eficaz em captar as variações na concentração dos analitos de maneira consistente e precisa. A distribuição dos pontos ao longo da curva foi homogênea, sem desvios significativos ou pontos discrepantes.

A validação analítica da técnica está sendo realizada para atendimento aos parâmetros exigidos pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. As amostras reais coletadas para o estudo estão em processo de análise, seguindo os mesmos procedimentos rigorosos aplicados durante o processo de validação.

5. CONCLUSÃO

O estudo trouxe importantes informações sobre o perfil sociodemográfico e a exposição ocupacional dos trabalhadores rurais da região norte central do Paraná. A análise dos dados permitiu identificar tendências que poderão guiar futuras intervenções, especialmente ao grupo de agrotóxicos utilizados e o histórico de intoxicações.

As etapas iniciais de otimização e validação da metodologia, para análise de 2,4-D, mostraram-se promissoras, com destaque para o desenvolvimento de metodologia de extração "verde". Assim, a aplicação da técnica de extração DLLME tendo como material biológico a urina é algo inovador, sendo uma estratégia promissora, com potencial para trazer avanços significativos para a ciência.

FINANCIADORES

TED n. 47/2023 - SETI e UGF, CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IDR-Paraná e aos colaboradores do Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório APLE-A da Universidade Estadual de Maringá, pela infraestrutura e espaço disponibilizado para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Bochner R. Óbito ocupacional por exposição a agrotóxicos utilizado como evento sentinela: quando pouco significa muito. Vigilância Sanitária em Debate. 2014 Nov 27;0(0).
2. DATASUS. Notificações por Ano Notificação segundo Agente Tóxico. 2022.
3. Scherer Roman E, Vargas L, Antonio Rizzardi M, Hall L, Beckie H, Wolf TM. COMO FUNCIONAM OS HERBICIDAS DA BIOLOGIA À APLICAÇÃO. 2005.
4. Boon D, Burns CJ. Biomonitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide: A global view. Vol. 152, Regulatory Toxicology and Pharmacology. Academic Press Inc.; 2024.
5. Megan. Toxicological Profile for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). 2020.
6. Burns CJ, Swaen GMH. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. Vol. 42, Critical Reviews in Toxicology. 2012. p. 768–86.
7. Machado SC, Souza BM, de Aguiar Marciano LP, Souza Pereira AF, de Carvalho DT, Martins I. A sensitive and accurate vortex-assisted liquid-liquid microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for urinary triazoles. J Chromatogr A. 2019 Feb 8; 1586:9–17.
8. Silvério ACP, Machado SC, Azevedo L, Nogueira DA, de Castro Graciano MM, Simões JS, et al. Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas Gerais, Brazil. Environ Toxicol Pharmacol. 2017 Oct 1; 55:99–106.
9. Governo Federal. NR 7-PROGRAMA DE CONTROLE MÉDICO DE SAÚDE OCUPACIONAL-PCMSO [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 11]. Available from: https://www.gov.br/trabalho-e-previdencia/pt-br/composicao/orgaos-especificos/secretaria-de-trabalho/inspecao/seguranca-e-saude-no-trabalho/normas-regulamentadoras/nr-07-atualizada-2022.pdf
10. MOREAU RL de M, SIQUEIRA MEPB. Ciências Farmacêuticas: Toxicologia analítica. 2° ed. Guanabara Koogan, editor. Vol. 2° ed. Rio de Janeiro; 2016. 141–155 p.
11. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DAS INTOXICAÇÕES CRÔNICAS POR AGROTÓXICOS. Curitiba; 2013. 1–76 p.
12. Martins ML, Primel EG, Caldas SS, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. Scientia Chromatographica. 2012;4(1):29–45
13. Monteiro R, Mujica FP. The socio-cultural identity of the young farmer in family viticulture and its relationship with rural succession. Revista de Economia e Sociologia Rural. 2021; 60:1–21.
14. De Lucca D, Preza C, Giraldo Da L, Augusto S. Vulnerabilidades de trabalhadores rurais frente ao uso de agrotóxicos na produção de hortaliças em região do Nordeste do Brasil* Farm workers' vulnerability due to the pesticide use on vegetable plantations in the Northeastern region of Brazil [Internet]. Vol. 37, Rev. bras. Saúde ocup. 2012. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home
15. Oliveira SF, Prado RB, Monteiro JMG. Impactos das mudanças climáticas na produção agrícola e medidas de adaptação sob a percepção de atores e produtores rurais de Nova Friburgo, RJ. Interações (Campo Grande). 2022 Dec 22;1179–201.

Palavras-chave: agrotóxicos; saúde ocupacional; ácido diclorofenoxiacético.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ESTUDO DAS RELAÇOES ENTRE A SOROPOSITIVIDADE PARA *Toxoplasma gondii* E A SINTOMATOLOGIA DE ESQUIZOFRENIA: ESTUDO DE REVISÃO

Erbson Rogério de Souza[1]; Débora de Mello Gonçales Sant´Ana[2]

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

[2]Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: pg404591@uem.br

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplama gondii* é um protozoário intracelular obrigatório largamente distribuído em todo o mundo (1). Normalmente provoca um quadro agudo assintomático em seres humanos imunocompetentes e, na infecção crônica os cistos formados são distribuídos por diferentes órgãos, dentre eles os do Sistema Nervoso Central (2). O parasito transpõe a barreira hemato encefálica por meio de diferentes mecanismos e invade neurônios e células da glia (3). A compreensão do neurotrofismo deste parasito levou pesquisadores a procurar a correlação entre a presença de cistos cerebrais, doenças neuropsiquiátricas e disfunções cognitivas (4).

Estima-se que a taxa de prevalência da toxoplasmose varia entre 20% e 90% da população mundial adulta, dependendo da localização geográfica. Isso porque, regiões quentes e úmidas, especialmente quando associadas às más condições de saneamento e hábitos alimentares, são as mais afetadas pela doença que acomete indivíduos de todas as idades (5). Todavia, a soroprevalência global entre pacientes neuropsiquiátricos foi recentemente indicada como 38,27% e a soroprevalência global entre controle saudáveis foi de 25,31% (3).

Vários estudos epidemiológicos e de meta-análises documentaram que indivíduos com toxoplasmose latente, apresentaram uma maior chance de desenvolver transtornos psiquiátricos (6). Mais de 200 estudos correlacionaram a toxoplasmose latente e um transtorno psiquiátrico como a esquizofrenia (7). Por outro lado, em estudos individuais e em uma meta-análise de 38 estudos não encontraram relação de causalidade entre soropositividade anti-*T. gondii* e esquizofrenia (8). A literatura apresenta controvérsias neste sentido. Em estudo de caso controle os dados obtidos não tiveram correlação positiva entre a infecção e a esquizofrenia (9). Porém, em outro estudo os autores consideram que a demonstração da causalidade entre soropositividade anti-*T. gondii* e esquizofrenia são consistentes. Já a correlação com outros distúrbios neurológicos ou neurocomportamentais ainda não apresentam estudos consistentes, e por isso, precisam de maiores estudos, para melhor elucidação do assunto (10). A relação de causalidade deve levar em consideração outros fatores como: imunidade e resistência ao patógeno; patogenicidade da cepa, genes de suscetibilidade, interação gene/gene e fatores epigenéticos (10).

Portanto, estudos sugerem que a infecção por *T. gondii* é uma causa provável de certos transtornos psiquiátricos, mas talvez um agente protetor em outros (11). Em uma população de baixa prevalência, a exposição ao *T. gondii* estava associada a um risco aumentado em indivíduos com início recente de psicose, mas não em indivíduos com esquizofrenia estabelecida. Coerente com essa possibilidade é o relato recente de níveis elevados de anticorpos contra Toxoplasma em indivíduos com formas de esquizofrenia resistentes ao tratamento (12).

Mediante a importância desta relação entre *T. gondii* e esquizofrenia em várias populações do mundo, o objetivo deste estudo é avaliar a relação entre a sorologia positiva de *T. gondii* e a esquizofrenia na população brasileira e também na população da região Sul do Brasil afim de fornecer subsídios para futuros estudos de nossa população e melhores ações de saúde pública. Neste resumo estão apresentados resultados parciais de um levantamento bibliográfico realizado para estudo teórico sobre o tema.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo epidemiológico transversal, observacional, quali-quantitativo, com produção de dados de características descritivas e analíticas, para a verificação de eventuais relações entre a soropositividade para *Toxoplasma gondii*.

Neste resumo são apresentadas informações obtidas da revisão de literatura. Foram realizadas buscas por artigos científicos no *PUBMED* com as palavras: Esquizofrenia e Toxoplasmose e selecionado estudos que avaliaram a detecção de anticorpos anti -*T. gondii*.

3. RESULTADOS PRELIMINARES

Foram identificados 12 estudos de caso controle que buscaram avaliar a correlação estatística entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* e o diagnóstico de esquizofrenia. Estes estudos usaram principalmente imunoensaio enzimático para detecção dos anticorpos do tipo IgG e IGM. A publicação mais antiga foi de 2004 e a mais recente de 2022. Dos doze artigos encontrados dez encontraram correlação positiva entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* e a esquizofrenia, com diferentes amostras e em diferentes países.

O quadro 1 apresenta os detalhes dos artigos avaliados neste estudo de revisão.

Quadro 1 – Informações sobre os artigos científicos de caso-controle avaliados nesta revisão de literatura sobre a correlação entre esquizofrenia e a presença de anticorpos anti *T. gondii*.

TÍTULO DO ARTIGO	País	Ano	No. EZF	no Ctl	Técnicas	Anticorpo	CORRELAÇÃO
Is latent *Toxoplasma gondii* infection associated with the occurrence of schizophrenia? A case-control study (9).	Etiopia	2022	47	47	Imunoensaio/ quimiluminescência	IgG IgM	Não
Evidence of increased exposure to *Toxoplasma gondii* in individuals with recent onset psychosis but not with established schizophrenia (12).	Canadá	2017	752	571	Imunoensaio enzimático	IgG	Não
Toxoplasma gondii infection and schizophrenia: a case control study in a low Toxoplasma seroprevalence Mexican population (13).	México	2011	50	150	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
The relationship between schizophrenia and toxoplasmosis: a critical study (14).	EUA	2005	405	150	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
Prevalence of Toxoplasma infection in first-episode schizophrenia and comparison between Toxoplasma-seropositive and Toxoplasma-seronegative schizophrenia (15).	China	2006	600	400	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia (16).	Alemanha	2004	113	102	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
Serum antibodies to *Toxoplasma gondii*, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1 and 2 in individuals with schizophrenia and bipolar disorder in rural Ethiopia (17).	Etiópia	2011	216	71	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
Toxoplasma gondii infection in first-episode and inpatient individuals with schizophrenia (18).	Irã	2010	98	48	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
The role of latent toxoplasmosis in the aetiopathogenesis of schizophrenia—the risk factor or an indication of a contact with cat? (19).	Turquia	2010	300	250	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
Relation between *Toxoplasma gondii* infections and schizophrenia (20).	Irã	2009	104	114	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
Seropositivity of toxoplasmosis in patients with schizophrenia (21).	Egito	2005	65	85	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim
The schizophrenia and *Toxoplasma gondii* connection: infectious, immune or both?(22).	Turquia	2008	40	37	Imunoensaio enzimático	IgG IgM	Sim

4. DISCUSSÃO

A associação entre a toxoplasmose crônica e a sintomatologia de esquizofrenia tem sido investigada há muitas décadas. Estudos epidemiológicos e meta-análises defendem que indivíduos com toxoplasmose apresentam uma maior probabilidade de desenvolver transtornos psiquiátricos (6). Muitos são os distúrbios psiquiátricos associados a toxoplasmose latente e a esquizofrenia é um dos distúrbios mais estudados (7). Todavia não há um consenso na literatura. Uma meta-análise de 38 estudos não encontraram relação de causalidade entre soropositividade anti-*T. gondii* e esquizofrenia (8), enquanto diversos estudos individuais encontraram.

Neste estudo de revisão da literatura observou-se que em dez dos doze artigos revisados houve correlação positiva entre a presença de anticorpos anti -*T. gondii* e a esquizofrenia. Todos os estudos avaliaram pacientes esquizofrênicos e grupos controle buscando a presença de IgG ou IgM contra o *T. gondii*. É interessante ressaltar que nove dos doze artigos foram realizados em países em desenvolvimento, e que não foi encontrado estudo de caso-controle no Brasil. Observa-se também grande variabilidade no tamanho da amostra investigada o que também pode ser um aspecto a ser observado nos diferentes resultados.

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico que abrange vários graus de delírios, pensamentos desorganizados, alucinações (principalmente auditivas), comportamentos desorganizados e sintomas negativos, como afeto embotado. Dificuldades em interações sociais, emoções e funcionalidade geral também são notadas. Diferentes estudos associaram infecções por *T. gondii* com esquizofrenia. Foi relatado que a toxoplasmose crônica associada à esquizofrenia é caracterizada por uma redução significativa na substância cinzenta, um achado não observado nos grupos de controle (23). A primeira meta-análise sobre o tema foi realizada em 2007 e atualizada cinco anos depois (24, 25), revelando taxas soropositivas significativamente elevadas de IgG e IgM anti-*Toxoplasma* em pacientes esquizofrênicos.

5. CONCLUSÃO

A revisão de literatura realizada demonstra que a maioria dos estudos avaliados encontraram correlação positiva entre a presença de anticorpos anti *T. gondii* e o diagnóstico de esquizofrenia. Todavia, dois estudos mais recentes não encontraram esta correlação. Não foram obtidos artigos que fizeram esta análise no Brasil. Desta forma, é reforçada a necessidade de estudos no Brasil envolvendo uma amostragem maior, visando contribuir com o esclarecimento desta correlação em diferentes grupos e regiões do nosso país.

FINANCIADORES

CAPES.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Sharifzadeh M, Rezanezhad H, Solhjoo K, Kargar Jahroml Z, Shadmand E, Shahabi S, et al. Sero-molecular survey on Toxoplasma gondii infection among drug addicted and non-addicted individuals: a case-control study. BMC Infect Dis. 2022 Jan 4;22(1):19. doi: 10.1186/s12879-021- 06979-8. PMID: 34983410; PMCID: PMC8725485.

2. Abdulai-saiku S, Tong WH, Vyas A. Behavioral Manipulation by Toxoplasmagondii: Does Brain Residence Matter?. Trends Parasitol. 2021 May;37(5):381-390. doi: 10.1016/j.pt.2020.12.006. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33461902.

3. Bisetegn H, Debash H, Ebrahim H, Mahmood N, Gedefie A, Tilahun M, et al. Global seroprevalence of Toxoplasma gondii infection among patients with mental and neurological disorders: a systematic review and meta-analysis. Health Sci Rep. 2023; 6:e1319. doi:10.1002/hsr2.1319.

4. Wohlfert EA, Blader IJ, Wilson EH. Brains and Brawn: Toxoplasma Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. Trends Parasitol. 2017 Jul;33(7):519-531. doi: 10.1016/j.pt.2017.04.001. Epub 2017 May 5. PMID: 28483381; PMCID: PMC5549945

5. Nayeri T, Sarvi S, Moosazadeh M, Hosseininejad Z, Amouei A, Daryani A. Toxoplasma gondii infection and risk of attention-deficit hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. Pathog Glob Health. 2020 May;114(3):117-126. doi: 10.1080/20477724.2020.1738153. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32186992; PMCID: PMC7241521

6. Murray AJ, Rogers JC, Katshu Liddle PF, Upthegrove R. Oxidative Stress and the Pathophysiology and Symptom Profile of Schizophrenia Spectrum Disorders. Front. Psyquiatry. 2021 JULY. V12. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.703452

7. Johnson HJ, Koshy AA. Latent Toxoplasmosis Effects on Rodents and Humans: How Much is Real and How Much is Media Hype? mBio. 2020 Mar 17;11(2):e02164-19. doi: 10.1128/mBio.02164-19. PMID: 32184245; PMCID: PMC7078474.

8. Ngô HM, Zhou Y, Lorenzi H, Wang K, Kim TK, Zhou Y, et al.; Toxoplasma Modulates Signature Pathways of Human Epilepsy, Neurodegeneration & Cancer. Sci Rep. 2017 Sep 13;7(1):11496. doi: 10.1038/s41598-017-10675-6. Erratum in: Sci Rep. 2019 May 28;9(1):8110. PMID: 28904337; PMCID: PMC5597608.

9. Ademe M, Kebede T, Teferra S, Alemayehu M, Girma F, Abebe T. Is latente Toxoplasma gondii infection associated with the occurrence of schizophrenia? A case- control study. PLoS One. 2022 Jun 23;17(6): e 0270377. doi: 10.1371/journal.pone.0270377. PMID: 35737701; PMCID: PMC9223392

10. Virus MA, Ehrhorn EG, Lui LM, Davis PH. Neurological and Neurobehavioral. Disorders Associated with Toxoplasma gondii Infection in Humans. J Parasitol Res. 2021 Oct 19;2021:6634807 doi: 10.1155/2021/6634807. PMID: 34712493; PMCID: PMC8548174

11. Carter CJ. Toxoplasmosis and Polygenic Disease Susceptibility Genes: Extensive Toxoplasma gondii Host/Pathogen Interactome Enrichment in Nine Psychiatric or Neurological Disorders. J Pathog. 2013;2013:965046 doi: 10.1155/2013/965046. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23533776: PMCID: PMC3603208

12. Yolken R, Torrey EF, Dickerson F. Evidência de aumento da exposição ao Toxoplasma gondii em indivíduos com psicose de início recente, mas não com esquizofrenia estabelecida. PLoS Negl Trop Dis 11(11): e0006040. (2017) https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006040

13. Alvarado-Esquivel C, Urbina-Álvarez JD, Estrada-Martínez S, Torres-Castorena A, Molotla-de-León G, et al. Toxoplasma gondii infection and schizophrenia: a case control study in a low Toxoplasma seroprevalence Mexican population. Parasitol Int. 2011 Jun;60(2):151-5. doi: 10.1016/j.parint.2010.12.003. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21292026.

14. Destounis N. The relation ship between schizophrenia and toxoplasmosis: a critical study. Del Med J. 1966;38:349–354

15. Wang HL, Wang GH, Li QY, Shu C, Jiang MS, Guo Y. Prevalence of Toxoplasma infection in first-episode schizophrenia and comparison between Toxoplasma-seropositive and Toxoplasma-seronegative schizophrenia. Acta Psychiatr Scand. 2006;114:40–48.

16. Leweke FM, Gerth CW, Koethe D, et al. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2004;254:4–8

17. Tedla Y, Shibre T, Ali O, et al. Serum antibodies to Toxoplasma gondii, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1 and 2 in individuals with schizophrenia and bipolar disorder in rural Ethiopia. Ethiop Med J. 2011;49:211–220

18. Hamidinejat H, Ghorbanpoor M, Hosseini H, et al. Toxoplasma gondii infection in first-episode and inpatient individuals with schizophrenia. Int J Infect Dis. 2010;14:e978–e981

19. Yuksel P, Alpay N, Babur C, et al. The role of latent toxoplasmosis in the aetiopathogenesis of schizophrenia—the risk factor or an indication of a contact with cat? Folia Parasitol. 2010;57:121–128.

20. Saraei-Sahnesaraei M, Shamloo F, Hashemi HJ, Khabbaz F, Alizadeh S. Relation between Toxoplasma gondii infections and schizophrenia. Iranian J Psychiatry Clin Psychol. 2009;15:3–9.

21. El-Sahn AA, Shatat HZ, Ghitany EM. Seropositivity of toxoplasmosis in patients with schizophrenia. J Egypt Public Health Assoc. 2005;80:509–524

22. Tamer GS, Yalug I, Caliskan S, Yazar S, Aker A. The schizophrenia and Toxoplasma gondii connection: infectious, immune or both? Adv Ther. 2008;25:703–709.

23. Horacek, J, Flegr J, Tintera J, Verebova K, Spaniel F.; Novak T. et al. Toxoplasmose latente reduz a densidade da substância cinzenta na esquizofrenia, mas não em controles: estudo de morfometria baseada em voxel (VBM). *World J. Biol. Psychiatry* 2012, *13*, 501–509.

24. Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR, Yolken RH. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em pacientes com esquizofrenia: Uma meta-análise. *Schizophr Bull.* 2007, *33*, 729–736.

25. Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* e outros fatores de risco para esquizofrenia: Uma atualização. *Schizophr Bull.* 2012, *38*, 642–647

Palavras-chave: Toxoplasmose; transtornos psiquiátricos; predisposição.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

QUANTIFICAÇÃO DE RNAS Y EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (*PBMCS*) DE PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Guilherme Castellani[1]; Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka [2]; Julyane Schavaren[3]; Larissa Danielle Bahls Pinto[4]; Quirino Alves de Lima Neto[5].

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

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

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

[4]Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[5]Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: guicasttt@outlook.com

1. INTRODUÇÃO

As espondiloartrites (EpAs) compreendem um grupo de doenças que compartilham manifestações clínicas, cuja classificação baseia-se nos sintomas, com predomínio axial ou periférico. As formas axiais são marcadas pela inflamação das articulações sacroilíacas e/ou da coluna vertebral, enquanto as periféricas envolvem artrite, entesite e dactilite (1). Embora sejam semelhantes, as EpAs subdividem-se em Espondilite Anquilosante (EA), Artrite Psoriásica, Artrite associada à colite ulcerativa ou doença de Crohn, Artrite reativa e Espondiloartrite indiferenciada (1,2).

A EA é a mais prevalente entre as EpAs, com maior incidência a partir da terceira década de vida (1,3) com predominância em homens caucasianos (4). A doença é caracterizada pela inflamação articular, acometimento ósseo, envolvimento das articulações periféricas, principalmente dos membros inferiores e comprometimento da coluna vertebral e sacroilíacas na região lombar. Em casos mais graves, a doença pode progredir para rigidez do esqueleto axial, resultando em limitação funcional (4).

A associação entre o alelo HLA-B27 e a espondilite anquilosante (EA) é bem estabelecida, com aproximadamente 90 a 95% dos indivíduos caucasianos com EA apresentando HLA-B27 positivo, já no Brasil, estudos mostram uma prevalência significativamente menor de HLA-B27 em pacientes com espondilite anquilosante, variando entre 46 e 48%, o que sugere diferenças genéticas importantes entre as populações (5, 6). Contudo, apenas a presença do HLA-B27 não é suficiente para determinar o desenvolvimento da EA (6–8). Embora essa relação seja clara, ainda não se compreende completamente a patogênese da EA, e várias teorias têm sido propostas para explicar os mecanismos subjacentes à doença.

Recentemente, o papel dos RNAs não codificantes (ncRNAs) na patogênese de várias doenças, incluindo a EA (9–11) vem sendo estudadas. Entre eles, os RNAs Y e seus fragmentos destacam-se não apenas como produtos de degradação aleatória, mas como moléculas bioativas, com potencial para serem utilizados como biomarcadores em algumas doenças, como em alguns tipos de cânceres (12–16).

Os RNAs Y são transcritos nos núcleos celulares pela RNA polimerase III, e em humanos, há quatro tipos conhecidos: hY1, hY3, hY4 e hY5, com 113, 102, 96 e 84 nucleotídeos (nt), respectivamente. Esses RNAs Y maduros adotam estruturas com *hairpins* característicos, formados pelo emparelhamento de suas extremidades 3' e 5'. Cada RNA Y possui duas hastes principais separadas por um *loop* de cadeias pirimidínicas simples, mas com diferenças em suas estruturas secundárias (13).

Na extremidade 3', há uma repetição oligo-uridinilada (Oligo-U), que possibilita a interação com a proteína La. Essa característica confere proteção contra a degradação pela exonuclease 3' -5', além de promover a retenção nuclear dos RNAs Y (13). Além da ligação com a proteína La, os RNAs Y associam-se a ribonucleoproteínas Ro, formando o complexo Ro-RNP (13,17,18). Apesar disso, atualmente, não se sabe

se o RNA Y permanece associado à proteína La durante a exportação celular ou se a ligação ocorre após a translocação (13).

No que diz respeito às funções dos RNAs Y, estudos indicam que eles desempenham papéis essenciais na duplicação do DNA, regulação da estabilidade de RNAs e respostas ao estresse celular (13,19,20). Diante disso, hipotetiza-se que os RNAs Y possam estar relacionados à patogênese da EA, influenciando a resposta imunológica devidos aos diferentes subtipos e quantidades de RNAs Y. No entanto, até o momento, existem limitados estudos que explorem essa relação entre os RNAs Y e a EA.

A quantificação dos RNAs Y em pacientes com EA pode revelar seu papel específico na patogênese da EA, além de sugerir marcadores moleculares úteis para diagnóstico e monitoramento da doença. Considerando que os RNAs Y têm sido propostos como biomarcadores para várias doenças, sua quantificação pode ter relevância clínica significativa. A análise dos níveis de expressão dos RNAs Y em pacientes com EA pode ainda identificar correlações entre sua expressão e a severidade da doença.

Portanto, o objetivo desse estudo foi quantificar o RNA Y5 em pacientes com EA e controles sem a doença por qPCR . Os achados podem auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares da doença e contribuir para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e de monitoramento mais precisas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Casuística

Foram avaliados pacientes diagnosticados com EA (N=10), residentes nas regiões norte e noroeste do Estado do Paraná e indivíduos sem a doença (grupo controle; N=18), de mesma origem geográfica, faixa etária e não aparentados. Os pacientes foram triados da Clínica de Reumatismo Rocha Loures, que atende pacientes da região de Maringá. O grupo controle foi composto por indivíduos sem qualquer histórico de doenças reumatológicas ou autoimunes, coletados no Laboratório de Ensino e Pesquisa e Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá, de funcionários que realizavam avaliação de saúde periódica.

Os pacientes foram diagnosticados com EA por um reumatologista qualificado, de acordo com os critérios de avaliação da *Spondyloarthritis International Society (ASAS)* de 2009 para espondiloartrite axial (21) e os critérios *ASAS* de 2011 para espondiloartrite periférica (22). Além disso, critérios como grupo étnico, sexo, idade, uso de medicação para tratamento da doença, responsividade ao tratamento, histórico familiar de EA e outras doenças autoimunes, prática regular de exercícios, consumo de álcool ou tabaco foram avaliados por meio de entrevistas individuais.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê Permanente de Ética da Universidade Estadual de Maringá (CAAE: 27723114.0.0000.0104) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2. Coleta de amostras de sangue e separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

As amostras de pacientes foram coletadas à domicilio, após, pelo menos, 12 horas da última utilização de imunossupressores, para minimizar os efeitos das drogas (23). O sangue periférico dos indivíduos foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA e processados para separação de PBMCs em até 2 horas.

Após a coleta do sangue, as PBMCs foram isoladas dentro de duas horas, para evitar a degradação dos RNAs. Para isso, o método de centrifugação em gradiente de densidade com *Ficoll-Hypaque* (Histopaque -1077, Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, EUA) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante.

2.3. Extração de RNAs totais e dosagem

A extração de RNAs totais foi realizada a partir das células obtidas na etapa anterior, utilizando o reagente TRIzol® LS (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), adaptado e composto por uma etapa de precipitação com isopropanol e lavagem com álcool 80%. As amostras obtidas foram ressuspendidas em água livre de RNAse e armazenadas a -80 °C para testes futuros com 10% de sulfato de amônio 10M.

A concentração dos RNAs totais foi analisada pela medição da densidade ótica em espectrofotômetro, utilizando comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento NanoDrop 2000® (Thermo Scientific).

Para avaliar a qualidade do RNA extraído, uma alíquota foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. Após a corrida eletroforética, foi possível observar um arraste característico de amostras de RNA, além de duas bandas nítidas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S.

2.4. Tratamento com DNase I, RNase-free

Após a extração, as amostras passaram pelo tratamento com DNase I, RNase-free (Thermo Scientific), para que ocorresse a digestão de fitas simples ou duplas de DNA, procedimento padrão antes da realização da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa (RT-qPCR), uma vez que DNA é considerado um contaminante nessa situação.

2.5. Obtenção de biblioteca de cDNA

O RNA total purificado obtido na etapa anterior foi utilizado como *template* para a síntese do cDNA. Para isso foram utilizados *random primers* junto a enzima Transcriptase Reversa (Thermo Scientific). Como o nome sugere, os *random primers* são iniciadores gerados de forma aleatória e sem especificidade. Os primers podem conter 6-9 pares de bases e são capazes de se anelar em vários pontos aleatórios de RNAs, como miRNA, mRNA, tRNA, rRNA, etc. Após isso, produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% com corante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) para garantir a viabilidade do cDNA construído, antes de se iniciar a próxima etapa.

2.6. Quantificação de cDNA com PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

A quantificação de cDNA foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), também conhecido como PCR em tempo real usando o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Scientific) para os genes *GAPDH* e *Y5*. Por meio do monitoramento da emissão de fluorescência a cada ciclo é possível determinar a quantidade inicial da amostra. O Ct (*threshold cycle*) é a intersecção entre a curva de amplificação e o *threshold*, ou seja, é o ciclo em que há o primeiro sinal de detecção de fluorescência, sendo que a quantidade de ciclos é inversamente proporcional a concentração da amostra inicial. Assim, quanto maior a quantidade de amostra inicial, menor o valor de Ct.

As sequências dos primers para *GAPDH* foram: senso 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' e antissenso 5'-CCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG-3', já para o *Y5* foram: senso 5'-AGTTGGTCCGAGTGTTGTGG-3' e antissenso 5'-AAAACAGCAAGCTAGTCAAG-3'. A amplificação por qPCR foi realizada em um volume total de 10 µL, em triplicata, contendo 5 ng de cDNA, 600 mM de cada *primer*, 1X PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™ Foster City, CA, EUA). Os ciclos foram realizados no Sistema StepOnePlus™ (Thermo Scientific): ciclo de dois minutos a 50°C; ciclo de dois minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C. A curva de fusão foi realizada com 25 segundos a 95°C, um minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C.

2.7. Análise da quantificação de cDNA com SYBR® Select Master Mix

A análise de expressão foi realizada comparando cDNA com um gene *housekeeping* para normalizar os dados do experimento. Os genes *housekeeping* são expressos de forma constitutiva, estável ao longo do tempo em diferentes tecidos e até mesmo em diferentes modelos de intervenção. Foram utilizados *primers* que amplificam o gene o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) como controle interno de reação. Para garantir que apenas fitas de RNA estavam presentes na amostra, os *primers*, foram construídos para flanquear regiões de éxons alternados.

A diferença de expressão entre pacientes com EAs e controles sem a doença foi realizada em triplicata e as médias obtidas foram usadas para as analises, utilizando o método de quantificação relativa, $2^{-\Delta\Delta C_t}$, o qual se faz a comparação entre um grupo de amostras tratadas e ou outro sem (24), e nesse caso, o grupo de pacientes com EA *versus* os controles sem a doença.

Os testes e a construção do gráfico de quantificação relativa foram realizados automaticamente utilizando o software de análise de qPCR, Relative Quantification (RQ) Application Module, disponível na plataforma Thermo Fisher Cloud Powered by Thermo Fisher.

3. RESULTADOS

A expressão relativa do RNA Y5 foi quantificada em amostras de sangue periférico de pacientes com EA e controles saudáveis, utilizando a técnica de qPCR. A comparação foi realizada com base no método de quantificação relativa, $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerando como calibrador os controles saudáveis (RQ = 1,0).

Entre os controles, observou-se uma variação moderada, com valores de RQ entre 0,130 e 7,181, enquanto entre os pacientes os valores de RQ variaram entre 0,081 e 21,619. A variabilidade entre os pacientes foi consideravelmente maior em comparação com os controles, conforme representado pela amplitude dos valores de RQ.

A comparação dos valores de RQ em pacientes e controles revelaram uma expressão aumentada do RNA Y5 nos pacientes com EA em comparação com controles (RQ= 2,064 vs 1,0), como pode ser visualizado na Figura 1. Essa diferença pode indicar um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão relativa de RNA Y5 nos pacientes, embora não seja estatisticamente diferente (p= 0,462). Apesar disso, o potencial papel deste RNA não codificante na fisiopatologia da doença, pode apontar para a necessidade de investigações adicionais para explorar essa relação.

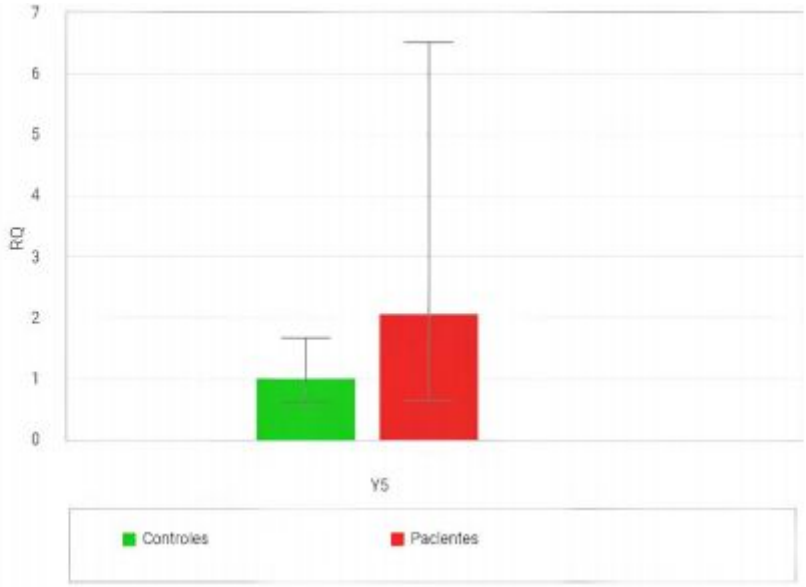


Figura 1: Comparação da expressão relativa de RNA Y5 nos grupos biológicos: Controles e Pacientes.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam um aumento na expressão do RNA Y5 em pacientes com espondilite anquilosante, refletido em um valor médio de RQ de 2,064 em comparação com o controle saudável (RQ = 1,000). Este achado é consistente com estudos anteriores que sugerem um papel relevante de RNAs não codificantes na regulação de processos inflamatórios e autoimunes, como a espondilite anquilosante (26, 27).

A variabilidade observada na expressão do RNA Y5 entre os pacientes (RQ entre 0,081 e 21,619) sugere uma heterogeneidade considerável na resposta gênica, um fenômeno frequentemente observado em doenças complexas como a espondilite anquilosante. Estudos demonstraram que a expressão diferencial de RNAs não codificantes pode estar relacionada a variantes genéticas, fatores ambientais e diferenças individuais na resposta imunológica (28, 29). Por exemplo, o paciente EA08, que apresentou um RQ de 21,619, pode estar associado a um perfil inflamatório mais ativo, o que reforça a ideia de que a regulação da expressão gênica pode variar significativamente entre indivíduos com a mesma condição clínica.

Embora a análise estatística não tenha revelado diferenças significativas entre os grupos, com um valor de p= 0,462, o observado nos pacientes sugere que esse RNA não codificante pode desempenhar um papel na fisiopatologia da EA. Isso é corroborado por pesquisas que destacam o envolvimento de RNAs não codificantes em mecanismos de sinalização inflamatória, como a modulação de citocinas e a regulação de células T, que são cruciais para o desenvolvimento da doença (30, 31).

Adicionalmente, a expressividade variável do RNA Y5 pode apontar para a necessidade de uma abordagem mais personalizada na avaliação da espondilite anquilosante, onde marcadores moleculares, como a expressão de RNAs não codificantes, podem ajudar a predizer a gravidade da doença e a resposta ao tratamento (32). A investigação adicional sobre os mecanismos moleculares que regem a expressão do RNA Y5 poderá contribuir para o entendimento das interações entre o sistema imunológico e a fisiopatologia da EA.

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o RNA Y5 pode ter um papel potencial na regulação da resposta inflamatória em pacientes com espondilite anquilosante, apesar da falta de significância estatística nos testes aplicados. Futuras pesquisas devem focar em elucidar o papel funcional deste RNA na patogênese da doença, além de investigar as variações individuais na sua expressão.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Rudwaleit M. New approaches to diagnosis and classification of axial and peripheral spondyloarthritis. Vol. 22, Current Opinion in Rheumatology. 2010. p. 375–80.
2. Nancy Z, Yan L, Hui S, Paul B, Liye C. From the Genetics of Ankylosing Spondylitis to New Biology and Drug Target Discovery. Vol. 12, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2021.
3. Feldtkeller E, Khan MA, Van Der Heijde D, Van Der Linden S, Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. Rheumatol Int. 2003;23(2):61–6.
4. Lipton S, Deodhar A. The new ASAS classification criteria for axial and peripheral spondyloarthritis: Promises and pitfalls. Vol. 7, International Journal of Clinical Rheumatology. 2012. p. 675–82.
5. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. Lancet. 2007 Apr 21;369(9570):1379-90. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60635-7.
6. Skare TL, Silva TR, Perazzio SF, Nascimento JA, Gonçalves CR. Ankylosing spondylitis in Brazilian patients: review of 156 cases. Rev Bras Reumatol. 2012 Nov-Dec;52(6):771-80. doi: 10.1590/S0482-50042012000600007.
7. Khan MA. Update on Spondyloarthropathies [Internet]. 2002. Available from: www.annals.org.
8. Khan MA, Ball EJ. Genetic aspects of ankylosing spondylitis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2002 Sep;16(4):675–90.
9. Reveille JD. Epidemiology of spondyloarthritis in North America. In: American Journal of the Medical Sciences. 2011. p. 284–6.
10. Pedersen SJ, Maksymowych WP. The Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis: an Update. Vol. 21, Current Rheumatology Reports. Current Medicine Group LLC 1; 2019.
11. Lai NS, Yu HC, Chen HC, Yu CL, Huang HB, Lu MC. Aberrant expression of microRNAs in T cells from patients with ankylosing spondylitis contributes to the immunopathogenesis. Clin Exp Immunol. 2013 Jul;173(1):47–57.
12. Sun R, Wang X, Sun X, Zhao B, Zhang X, Gong X, et al. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs in Ankylosing Spondylitis. Vol. 13, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2022.
13. Chen C, Rong T, Li Z, Shen J. Noncoding RNAs Involved in the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis. Vol. 2019, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2019.
14. Rutjes SA, Van Der Heijden A, Utz PJ, Van Venrooij WJ, Pruijn GJM. Rapid nucleolytic degradation of the small cytoplasmic Y RNAs during apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 1999 Aug 27;274(35):24799–807.
15. Valkov N, Das S. Y RNAs: Biogenesis, Function and Implications for the Cardiovascular System. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer; 2020. p. 327–42.
16. Verhagen APM, Pruijn GJM. Are the Ro RNP-associated Y RNAs concealing microRNAs? Y RNA-derived miRNAs may be involved in autoimmunity. Vol. 33, BioEssays. 2011. p. 674–82.
17. Christov CP, Trivier E, Krude T. Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. Br J Cancer. 2008 Mar 11;98(5):981–8.

18. Driedonks TAP, Nolte-T'Hoen ENM. Circulating Y-RNAs in extracellular vesicles and ribonucleoprotein complexes; Implications for the immune system. Vol. 10, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2019.
19. Langley AR, Chambers H, Christov CP, Krude T. Ribonucleoprotein particles containing non-coding Y RNAs, Ro60, la and nucleolin are not required for Y RNA function in DNA replication. PLoS One. 2010;5(10).
20. Krude T, Christov CP, Hyrien O, Marheineke K. Y RNA functions at the initiation step of mammalian chromosomal DNA replication. J Cell Sci. 2009 Aug 15;122(16):2836–45.
21. Christov CP, Gardiner TJ, Szüts D, Krude T. Functional Requirement of Noncoding Y RNAs for Human Chromosomal DNA Replication. Mol Cell Biol. 2006 Sep 1;26(18):6993–7004.
22. 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. Ann Rheum Dis. 2009;68(6):777–83.
23. 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 Jan;70(1):25–31.
24. Lai EC. microRNAs: Runts of the Genome Assert Themselves. Vol. 13, Current Biology. Cell Press; 2003.
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001;25(4):402–8.Verhagen APM, Pruijn GJM. Are the Ro RNP-associated Y RNAs concealing microRNAs? Y RNA-derived miRNAs may be involved in autoimmunity. Vol. 33, BioEssays. 2011. p. 674–82.
26. Liu Y, et al. Long non-coding RNAs in autoimmune diseases: from mechanisms to therapeutic potential. Autoimmun Rev. 2016;15(1):36-46.
27. Wang Y, et al. Emerging roles of long noncoding RNAs in autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2018;17(5):541-549.
28. Xu Y, et al. The role of long noncoding RNA in immune system regulation and autoimmune diseases. Front Immunol. 2020;11:202.
29. Liu Y, et al. Non-coding RNAs in autoimmune diseases. J Autoimmun. 2019;104:102309.
30. Wu Y, et al. Long non-coding RNAs in the regulation of immunity and inflammation. Cytokine Growth Factor Rev. 2018;41:51-60.
31. Cech TR, et al. The noncoding RNA revolution—trends and prospects in RNA biology. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016;17(1):12-17.
32. Tzeng YS, et al. Personalized medicine in ankylosing spondylitis: can we tailor treatment to individual patient characteristics? BMC Musculoskelet Disord. 2017;18(1):1-10.
33.

Palavras-chave: Quantificação relativa; Espondilite anquilosante; RNAs Y.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

LMM2: POTENTIAL ANTIFUNGAL AGENT IN THE TREATMENT OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS.

Juliana Nakamura[1]; Gabriel de Moraes Borges[2]; Isis Regina Grenier Capoci [3]; Patrícia de Souza Bonfim de Medonça[3]; Maria Sueli Soares Felipe[4]; Érika Seki Kioshima[3];

[1] Master's Student, Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá/PR, Brazil.
[2] PhD Student, Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá/PR, Brazil.
[3]Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá/PR, Brazil.
[4]Professor, Program in Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Brasília/DF, Brazil
e-mail: juliananaka@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal infection that is endemic in Latin America. Brazil has the highest number of PCM cases, accounting for about 80% of all cases in Latin America, followed by Colombia and Venezuela, with an estimated 3360 to 5600 cases annually in Brazil (1). PCM is caused by fungi of the genus *Paracoccidioides sp.* and was first described by Adolpho Lutz in 1908 (2, 3). Today, more than a century after its discovery, PCM is considered a Neglected Tropical Disease (NTDs)and include in the World Health Organization fungal priority pathogens list (4, 5).

Paracoccidioides is a thermally dimorphic fungus, meaning it can alter its form depending on the temperature. At lower temperatures, such as 25°C, the fungus takes on the mycelial form, which is considered the infectious form because it is in this phase that the infectious propagules are released. These propagules, when inhaled, can lodge in the lungs, upper airways, or in skin lesions of the host. At higher temperatures, such as the body temperature (37°C), the fungus differentiates into yeast, which is the pathogenic form (6). Generally, with 25°C temperatures prevalent in forested areas and the fact that the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*), a land mammal, is considered a natural reservoir of *Paracoccidioides sp.*, PCM represents an occupational concern for rural workers (7).

In Brazil, the *Paracoccidioides brasiliensis* species is the most common, and the disease manifests in two clinical forms: the acute form and the chronic form. The acute form occurs predominantly in children with an inadequate immune response, and is commonly associated with lymphadenomegaly, hepatosplenomegaly, or lesions on the skin or mucous membranes. The chronic form is responsible for approximately 80 to 95% of all cases of PCM, primarily affecting male patients over 30 years old. In the chronic form, lesions are more limited to the lungs with the formation of granulomas, mucosa and skin lesions. Given the similarity of symptoms to those of other upper respiratory tract diseases, a late diagnosis or misdiagnosis is a common occurrence (1, 8).

The treatment of fungal infections is limited to three main classes of antifungals: Polyenes, azoles and echinocandins. In severe PCM cases, amphotericin B is recommended, which, although effective, presents risks of nephrotoxicity and requires hospitalization due to need for slow infusion. For non-hospitalized cases, itraconazole is indicated, although it is prolonged treatment period of 9 to 18 months. Both drugs are associated with side effects, such as gastrointestinal disorders, headaches, dizziness, and in more severe cases, hepatotoxicity and nephrotoxicity (9). Amphotericin B binds to ergosterol, forming pores in the membrane, while itraconazole inhibits the enzyme 14-alpha-demethylase (ERG11), crucial for ergosterol biosynthesis. However, there is a structural similarity between ergosterol and cholesterol, which performs an analogous function in mammalian cells. This has contributed to the adverse effects of these antifungals (10).

The cholesterol and ergosterol biosynthetic pathways share common steps up to zymosterol, at which point the pathway separates into two distinct pathways. In the case of ergosterol, the enzyme ERG6 catalyzing

the addition of a methyl group at carbon 24, converting zymosterol into fecosterol and subsequently into ergosterol. On the other hand, the action of delta-24-sterol-reductase converts zymosterol into cholesta-8-en-3β-ol for the final synthesis of cholesterol (11). Thus, ERG6 is one of the specific enzymes that is not present in humans, making it a promising candidate for treatment.

In silico tools have been used to reduce the costs and time associated with drug discovery (8, 12). Based on virtual screening, it was possible to select molecules as inhibitors of the ERG6 enzyme. Of the ten compounds selected, one molecule, named LMM2, demonstrated antifungal activity against *Paracoccidioides sp.* This study aims to evaluate the antifungal activity of LMM2 in a paracoccidioidomycosis model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Isolates.

The reference strain of *P.brasiliensis* (Pb18) and a clinical isolate with morphological characteristics compatible with *P.brasiliensis* species (HUMPb02), both isolates and were stored at the Medical Mycology Laboratory at the State University of Maringá. The two isolates were maintained by sucessive subcultures in the modified yeast extract peptone dextrose agar (YPDA) culture medium and incubated at 35°C (13).

2.2. Inoculum.

The yeast inoculum was prepared from a 5 to 7-day subculture in RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, document M27-A3), with modifications described by Rodrigues-Vendramini et al. (2019). The inoculum was adjusted to 2-4 x 10^4 cells/mL (14).

2.3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The determination of MIC was performed using the microdilution broth method in a 96-well plate with RPMI 1640, following the standard CLSI methodology. The concentration range of LMM2 varied from 0.5 to 256 µg/mL by serial dilutions. The inoculum was diluted 1:2 in the plate, resulting in a final concentration of 1-2 x 10^4 cells/mL. The incubation time was 7 days at 35°C. On the sixth day of incubation, resazurin (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted in phosphate buffered saline (PBS) was added, and the reading was performed after 24 hours. Controls with amphotericin B were also conducted and tested against *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) (8, 14, 15).

2.4. Minimum Fungicidal Concentration (MFC).

The determination of MFC was performed after homogenizing the MIC plate with a syringe 1mL, followed by transferring aliquots of 5 µl from each well of the plate to modified YPDmod agar plates. The incubation period was for 7 days at 35°C. Fungicidal activity was defined as the lowest drug concentrations at which no colonies growth was observed (8, 15).

2.5. Checkerboard.

The synergistic effects of LMM2 with itraconazole (ITZ) and amphotericin B (AmB) by the checkerboard method, using both strains in 96-well plates. The conventional drugs were distributed horizontally (x-axis), and LMM2 was distributed vertically (y-axis). The concentration range for itraconazole was from 0.00005 to 0.06 µg/mL, for amphotericin B from 0.001 to 2 µg/mL, and for LMM2 from 2 to 128 µg/mL. The final inoculum concentration followed the same procedure as the MIC assay. The plates were incubated for 7 days at 35°C. The reading was performed by visual inspection, and inhibition was confirmed by viability using the XTT assay (Invitrogen, Eugene, OR, USA) (490nm). The frational inhibitory concentration index (FIC) was determined by ΣFIC = FIC A + FIC B, where FIC A is the MIC of the combination/ MIC of drug A alone, and FIC B is the MIC of the combination/ MIC of drug B alone. Thus, it was classified as strong synergy (FIC < 0.5), synergy (FIC < 1), additive effect (FIC = 1), no effect (1 < FIC < 2), or antagonism (FIC > 2) (8, 16). Data were analyzed using the free software Combenefit.

2.6. Time Kill Curve.

This experiment was conducted only with the reference strain for *P.brasiliensis* (Pb18), cultured in McVeigh Morton broth medium for 7-10 days, under agitation (150 RPM) at 35°C. The inoculum was adjusted to 2 x 10^4 cells/mL, and the untreated yeast were used as the control group. The treatment with LMM2 was applied only once at the beginning of the experiment. The LMM2 concentrations were 16 µg/mL (SubMIC), 32 µg/mL (MIC) and 64 µg/mL (2xMIC), and amphotericin B at 0.25 µg/mL. At intervals of 0, 3, 6, 9, 12 ad 15 days, one aliquot of each group was diluted in PBS, and plated on YPDmod agar supplemented with 4% fetal bovine serum and 5% Pb18 culture filtrate. The colony-forming units (CFU) were determinate after 15 days (8). Graph analysis was performed using GraphPrism 8.0.1.

3. RESULTS

The new molecule (LMM2) showed promising antifungal activity with the MIC values ranging from 16 µg/mL to 32 µg/mL and MFC value of 32 µg/mL. For AmB, the MIC/MFC values ranging from 0.125 to 0.25 µg/mL. The assay was performed in duplicate. LMM2 showed strong synergism with AmB. The combinatory effect (LMM2 and AmB) was able to reduce the MIC of AmB from 0.125 µg/mL to 0.01 µg/mL. Similary, the synergistic effect on LMM2 was capable of reducing the MIC for the reference strain (Pb18) by 3-fold and 4-fold when combined with AmB and ITZ, respectively. Similar results were observed for the clinical isolate, but can be better visualized in Table 1. The ∑FIC index showed a strongly synergistic interaction between AmB and LMM2 and a synergistic effect between ITZ and LMM2 for both isolates. The Bliss plot analysis performed using the Combenefit software showed blue areas, in accordance with the FIC analysis (Figure 1). However, the combination of ITZ and LMM2 for the HUMPb02 isolates did not present statistically significant difference.

Table 1. Combined effects of amphotericin B (AmB) or itraconazole (ITZ) with LMM2 on *Paracoccidioides sp.*

Strains	Compound	MIC Alone (µg/mL)	MIC Comb (µg/mL)	∑FIC	Interpretation
Pb18	LMM2	32	4*	0.20	Strong Synergistic
	AmB	0.125	0.01*		
	LMM2	32	2*	0.53	Synergistic
	ITZ	0.015	0.007*		
HUMPb02	LMM2	32	8*	0.48	Strong Synergistic
	AmB	0.03	0.007*		
	LMM2	32	16	0.97	Synergistic
	ITZ	0.015	0.007		

MIC Alone: Minimum inhibitory concentration alone; MIC Comb: Minimum inhibitory concentration in combination; ΣFIC: FIC A + FIC B; Pb18: reference strain; HUMPb02: clinical isolate strain. **Values of p<0.05 were considered statistically significant compared to MIC Alone.*

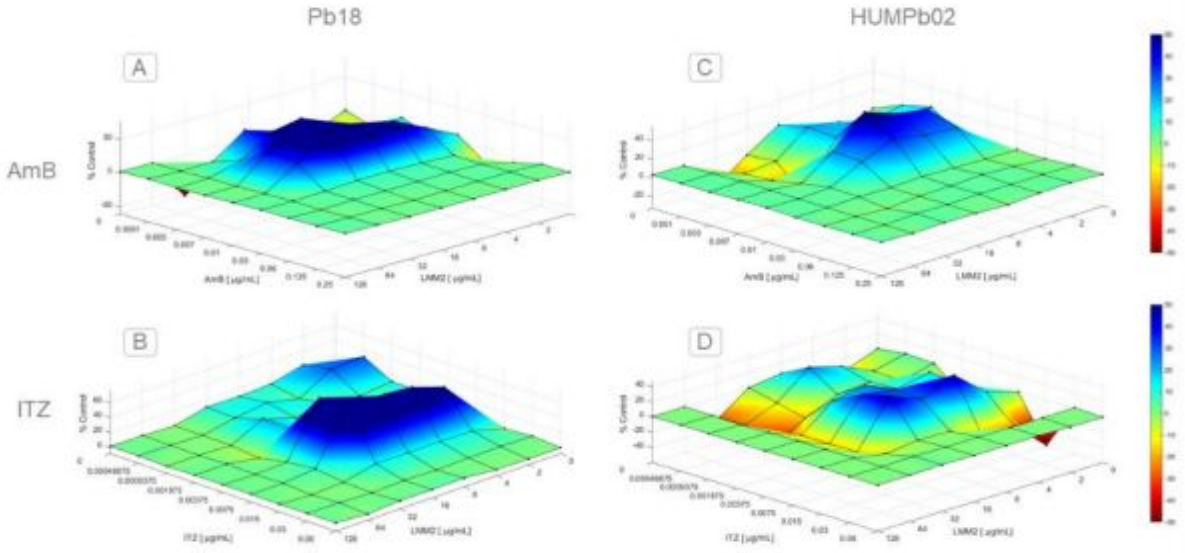


Figure 1. Bliss plot evaluation of amphotericin B (AmB) or itraconazole (ITZ) combined with LMM2 against *Paracoccidioides sp.*

(A) Strong synergistic effect between AmB and LMM2 against the reference strain (Pb18) (B) Synergistic effect between ITZ and LMM2 against Pb18 (C) Strong synergistic effect between AmB and LMM2 against a clinical isolate (HUMPb02) (D) Synergistic effect between ITZ and LMM2 against HUMPb02. The x and y axes represent the efficacies of AmB/ITZ and LMM2, respectively. The z axis is the percent of synergism or antagonism (% Control) and when positive statistically significant synergistic interactions. The results were obtained from the arithmetic mean of two or three independent assays, and the analysis was performed using the Combenefit software.

To evaluate the antifungal activity profile of LMM2, a time-kill curve was performed, which corroborated the MFC results. The LMM2 showed fungicidal profile with 32 µg/mL (MIC) and 64 µg/mL (2xMIC) since the sixth day of treatment. Despite the SubMIC concentration remaining unable to completely inhibit the fungal cells after 15 days of treatment, a partial inhibition was observed, with a reduction of 1 log. The treatment with a conventional fungicidal drug (AmB) resulted in the absence of colony growth from the third day onwards. The untreated control showed an increase of more than one log (Figure 2).

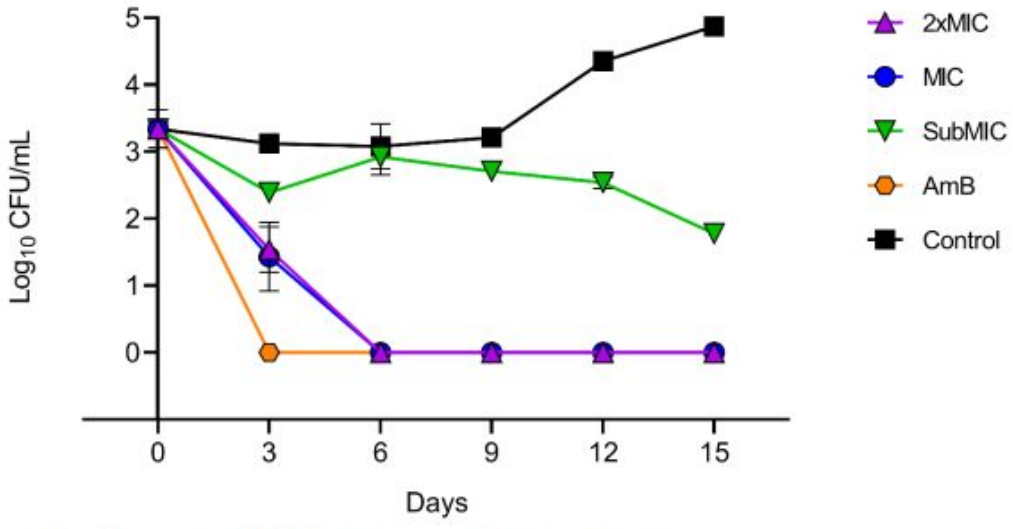


Figure 2. Time-Kill Curve of LMM2 treatment on *Paracoccidioides sp.*

The logarithmic reduction in colony-forming units (CFU/mL) was calculated at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 days.The concentrations of LMM2 were 16 µg/mL (SubMIC), 32 µg/mL (MIC) and 64 µg/mL (2xMIC), indicating the fungicidal profile of the new compound. The treatment was applied only once at the start of the assay. The conventional control was Amphotericin B (AmB; MIC: 0.25 µg/mL), and the positive control consisted of untreated yeast. The data were analyzed using GraphPad Prism 8.0.1.

4. DISCUSSION

Paracoccidioidomycosis presents therapeutic challenges due to late diagnosis, granuloma formation, prolonged treatment, and its prevalence in developing countries, mainly affecting rural workers. In this context, it is important to consider how difficult it is for the rural workers to adhere to treatment, which often requires hospitalization in urban centers for amphotericin B infusions, or adherence to prolonged treatments that can last months. As mentioned previously, the WHO classifies PCM as a neglected tropical disease due to its impact on vulnerable populations, lack of global visibility, and the absence of compulsory reporting, which underestimates the real number of cases (1, 4). This reinforces the urgent need for to develop new antifungals drugs not only against *Paracoccidioides,* but also to expand the spectrum of action against other systemic mycoses.

In silico tools have proven essential in the development of new antifungal agents, allowing for the identification of molecular targets, virtual screening, protein modeling, and other applications that supported previous studies by this group (8, 15-17). By comparative genomic of major pathogenic fungi, Abadio et al. (2011) highlighted the ERG6 enzyme as an interesting target in ergosterol biosynthesis pathway, due to its essentiality, specificity, and easy cellular localization (12). Ergosterol is an important sterol for the stability and integrity of the fungal cell membrane and is the target for most antifungal drugs currently on the market. Its interference can disrupt cellular homeostasis, which explains its central role in antifungal treatments.

Abadio and colleagues (data not shown) employed virtual screening to identify Erg6 inhibitors, resulting in the discovery of novel antifungal candidates. Of these, LMM2 demonstrated the highest activity against fungi of the *Paracoccidioides* genus. Given that LMM2 is a hit molecule, it did not exhibit a superior profile to that of the available drugs. Nevertheless, the conventional therapies present significant challenges, including side effects, limited therapeutic options, prolonged treatments, and high costs. Additionally, fungal resistance to azoles has been reported in *Candida* and *Aspergillus* species, are explained by *ERG11* mutations, upregulation of the target enzyme and the development of alternative pathways (18, 19).

In addition, high doses of azoles and amphotericin B can, respectively, block cholesterol synthesis by inhibition of ERG11, an enzyme sharing the same biosynthetic pathway as sterols, or cause non-selective rupture of mammalian cells, resulting in intrinsic toxicity in the host (10, 20). The synergistic effect observed between LMM2 and amphotericin B or itraconazole suggests that, despite the absence of enzymatic assays, LMM2 may acts on the cell membrane, increasing fungal susceptibility to conventional antifungals. This combination allows for lower concentrations of these drugs, which can significantly reduce side effects for patients. Oliveira et al. (2020) also observed that a mutant strain of *Cryptococcus neoformans* with ERG6 deletion exhibited increased antifungal susceptibility, corroborating with the synergistic results found in this study (11).

The fungicidal profile, in contrast to the fungistatic activity, reflects the ability to effectively eliminate fungal cells rather than just inhibiting their growth. Time-kill curve assays and minimum fungicidal concentration (MFC) tests are crucial to characterize this activity of the proposed new compound (8). In this study, LMM2 demonstrated a fungicidal profile. Compared to AmB, which showed complete cell death on the third day after treatment, LMM2 showed a similar profile, eliminating the cells on the sixth day after a single dose. These findings reinforce the potential of LMM2 as an antifungal agent, capable of acting effectively in a short period, comparable to widely used drugs like amphotericin B. However, more studies are needed to fully elucidate LMM2's mechanism of action, cytotoxicity profile, *in vivo* toxicity studies. Furthermore, a hit-to-lead process should be conducted to potentially improve its antifungal spectrum.

5. CONCLUSION

The new compound proposed, LMM2, has fungicidal activity against *Paracoccidioides brasiliensis*, showing similar efficacy to amphotericin B in time-kill curve assays. Its synergistic action with conventional antifungals, such as amphotericin B and itraconazole, allows for a reduction in the required doses of these drugs, consequently reduce side effects for patients. Despite these promising results, more studies are needed to validate its mechanism of action and assess its toxicity.

FUNDING AGENCIES

CAPES e CNPq.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all the team and infrastructure of the Medical Mycology Laboratory at the State University of Maringá.

REFERENCES

1. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. J Fungi (Basel). 2017;3(1).
2. Seki Kioshima E, de Souza Bonfim de Mendonça P, de Melo Teixeira M, Grenier Capoci IR, Amaral A, Vilugron Rodrigues-Vendramini FA, et al. One Century of Study: What We Learned about Paracoccidioides and How This Pathogen Contributed to Advances in Antifungal Therapy. J Fungi (Basel). 2021;7(2).
3. Lacaz CdS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidioidomicose. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico1991. p. 248-97.
4. World Health O. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals : A road map for neglected tropical diseases 2021–2030 2021.
5. World Health O. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action: World Health Organization; 2022.
6. Chaves AFA, Navarro MV, de Barros YN, Silva RS, Xander P, Batista WL. Updates in Paracoccidioides biology and genetic advances in fungus manipulation. Journal of Fungi. 2021;7(2):116.
7. Hrycyk MF, Garcia Garces H, Bosco SdMG, de Oliveira SL, Marques SA, Bagagli E. Ecology of Paracoccidioides brasiliensis, P. lutzii and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. Medical Mycology. 2018;56(8):950-62.
8. 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 Negl Trop Dis. 2019;13(6):e0007441.
9. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Telles FQ, Kono A, Paniago AMM, et al. [Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis]. Epidemiol Serv Saude. 2018;27(spe):e0500001.
10. Ghannoum Mahmoud A, Rice Louis B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. Clinical Microbiology Reviews. 1999;12(4):501-17.
11. Oliveira FFM, Paes HC, Peconick LDF, Fonseca FL, Marina CLF, Bocca AL, et al. Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen Cryptococcus neoformans. Fungal Genet Biol. 2020;140:103368.
12. Abadio AK, Kioshima ES, Teixeira MM, Martins NF, Maigret B, Felipe MS. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. BMC Genomics. 2011;12:75.
13. Chaves AFA, Navarro MV, Castilho DG, Calado JCP, Conceição PM, Batista WL. A conserved dimorphism-regulating histidine kinase controls the dimorphic switching in Paracoccidioides brasiliensis. FEMS Yeast Research. 2016;16(5):fow047.
14. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard CLSI M27-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
15. Rodrigues-Vendramini FAV, Marschalk C, Toplak M, Macheroux P, Bonfim-Mendonça PS, Svidzinski TIE, et al. Promising New Antifungal Treatment Targeting Chorismate Synthase from Paracoccidioides brasiliensis. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(1).
16. Bagatin MC, Pimentel AL, Biavatti DC, Basso EA, Kioshima ES, Seixas FAV, et al. Targeting the Homoserine Dehydrogenase of Paracoccidioides Species for Treatment of Systemic Fungal Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(9).
17. Faria DR, Melo RC, Arita GS, Sakita KM, Rodrigues-Vendramini FA, Capoci IR, et al. Fungicidal Activity of a Safe 1,3,4-Oxadiazole Derivative Against Candida albicans. Pathogens [Internet]. 2021; 10(3).
18. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. Clinical Infectious Diseases. 2008;46(1):120-8.
19. Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. Front Med (Lausanne). 2016;3:11.
20. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. J Fungi (Basel). 2020;6(4).

Keywords: *Paracoccidioides;* methyltransferase; antifungal agents.

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
2024
23 A 25 DE OUTUBRO
PBF-UEM

EFEITO CITOTÓXICO DA COMBINAÇÃO DE TAMOXIFENO E CRISINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HORMÔNIO POSITIVO

Lais Maria Barazzetti Pereira da Silva[1,3]; Lucimara Rodrigues Carobeli[2,3]; Natália Lourenço Mari[3]; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles[3,4]; Marcia Edilaine Lopes Consolaro[3,4]; Vânia Ramos Sela da Silva[3,4].

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

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

[3]Laboratório de Citologia Clínica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[4]Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: laisbarazzetti@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com exceção dos tumores de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres no Brasil, com estimativa de 66,54 novos casos a cada 100 mil mulheres, correspondendo a mais de 70 mil novos casos no triênio 2023-2025. Também, é a malignidade feminina mais comum em todo o mundo com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos estimados globalmente em 2022 (1). Em relação a mortalidade, cerca de 17 mil mulheres morreram no Brasil no ano de 2020 e mais de 600 mil no mundo no ano de 2022 (2, 3).

É uma doença multifatorial, sendo a idade acima de 50 anos o fator de risco com maior destaque, seguido de outros fatores como histórico familiar, uso de álcool e tabaco, além de condições hormonais e/ou reprodutivas (3).

O câncer de mama é dividido em subtipos que orientam o prognóstico e tratamento, sendo classificado de acordo com a presença (+) ou ausência (-) de três marcadores: a proteína promotora de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), e os receptores hormonais de progesterona (PR) e estrogênio (ER). Assim, os tumores de mama podem ser classificados como Luminal A (ER/PR+ e HER2-), Luminal B (ER/PR+ e expressão HER2 variável), HER2+ super expresso (ER/PR normalmente - e HER2+) e Triplo-negativo (ER/PR- e HER2-) (4). O subtipo hormonal positivo (ER/PR+) é considerado o de melhor prognóstico, no entanto, compreende ao tipo mais comum, correspondendo a mais de 70% de todos os casos (4, 5).

Os tratamentos utilizados para o câncer de mama podem ser locais, como a cirurgia e radioterapia, e/ou sistêmicos, envolvendo imunoterapia, terapia hormonal e a quimioterapia (6), e em muitos casos, podem incluir a combinação entre eles. O tamoxifeno é um dos principais agentes endócrinos utilizados na clínica médica e age na modulação do receptor de estrogênio. É amplamente utilizado para pacientes com câncer de mama hormônio positivo, seja nos estágios iniciais ou para complementar outros tratamentos prévios (7). Porém, apesar da existência das opções terapêuticas atuais, os efeitos colaterais presentes nestas podem afetar a qualidade de vida das pacientes, bem como muitas podem apresentar resistência (8).

Neste contexto, buscam-se formas de ampliar as opções de tratamento para o câncer de mama, visando a redução de toxicidade e maior efetividade para as pacientes. Uma alternativa que vem sendo explorada é a utilização da combinação de drogas convencionais da prática clínica com compostos naturais (9), a fim de se reduzir a concentração destas com uma melhora de eficácia e redução de potenciais efeitos adversos. A crisina, encontrada naturalmente na própolis e em algumas plantas medicinais é um flavonoide, da classe dos polifenóis, que tem demonstrado bons resultados antiproliferativos e antitumorais em estudos utilizando várias linhagens celulares, especialmente por induzir nas células tumorais, apoptose, autofagia, angiogênese, e inibir o crescimento tumoral (10).

Alguns estudos demonstraram atividade antitumoral da crisina em células de câncer de mama (11), mas os efeitos do seu tratamento combinado ao tamoxifeno, ainda não foram amplamente explorados. Assim,

o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do tratamento combinado de tamoxifeno e crisina em células de câncer de mama hormônio positivo, MCF-7, por meio de ensaio de viabilidade celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagem celular e condições de cultivo

As células de linhagem tumoral de mama, MCF-7 (derivada de carcinoma ductal invasivo e ER+ e PR+; do Banco de Células do Rio de Janeiro), foram mantidas em estufa umidificada a 37ºC com 5% de CO_2 em frascos contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B.

2.2. Obtenção das drogas

A crisina e o tamoxifeno foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich) e diluídos nas concentrações estoque de 40 mM e 10 mM em dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente, e mantidos a -20ºC.

2.3. Ensaio de citotoxicidade

Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade isolada de ambos os compostos estudados. Assim, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL e foram tratadas 24 horas depois. Para o ensaio da crisina, as células foram tratadas com 200 µL desta nas concentrações de 1,56 a 400 µM. Para o tamoxifeno, as células foram tratadas com 200 µL deste nas concentrações de 0,625 a 80 µM. Para controle negativo (CN), as células foram tratadas apenas com meio de cultura DMEM. Após 48 e 72 horas de ambos os tratamentos foi realizado o ensaio do MTT, baseado na redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) à formazan, no qual retrata o funcionamento normal da mitocôndria e, portanto, a viabilidade celular (12). A leitura das absorbâncias foi realizada no comprimento de onda de 570 nm, para o cálculo da viabilidade celular. Os resultados obtidos foram utilizados para determinar as concentrações que demonstram a inibição celular de 30 e 50%, quando comparado ao controle negativo, IC_{30} e IC_{50}, respectivamente

2.4. Ensaio de citotoxicidade da combinação de drogas

Para o ensaio de citotoxicidade da combinação das drogas, foram utilizadas as mesmas concentrações de tamoxifeno (0,625-80 µM) e a sub dose efetiva (IC_{30}) da crisina, no melhor tempo para ambos os compostos (72 horas). Assim, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL. Após 24 horas, as células foram expostas com as combinações dos compostos e as viabilidades celulares foram avaliadas 72 horas após os tratamentos por meio do ensaio do MTT (12). Para controle negativo (CN), as células foram tratadas apenas com meio de cultura DMEM.

2.5. Análise estatística

A análise dos dados foi feita utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). A distribuição t de Student foi usada nos testes de citotoxicidade. Os valores do IC_{30} e IC_{50} foram obtidos por análise de regressão não linear dos dados quando comparado ao controle negativo. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p< 0,05$.

3. RESULTADOS

Nesse estudo, foi avaliado o efeito citotóxico do tamoxifeno e da crisina em células de câncer de mama MCF-7, de forma isolada e em combinação de ambos. Os valores das viabilidades celulares dos compostos isolados encontram-se na Figura 1, onde foi verificado que estes mostraram ação citotóxica de forma dose-tempo-dependente e não houve efeito significativo para o DMSO.

Os valores de IC_{30} e IC_{50} encontrados para as células MCF-7 expostas ao tamoxifeno e crisina isolados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores das concentrações inibitórias (IC) do tamoxifeno e crisina isolados nos tempos de 48 e 72 horas.

	48 horas		72 horas	
	IC_{30} (µM)	IC_{50} (µM)	IC_{30} (µM)	IC_{50} (µM)
Tamoxifeno	44,7	80,3	12,8	59,4
Crisina	165,6	326,3	123	277,5

IC_{30}: Inibição de 30% da viabilidade celular; IC_{50}: Inibição de 50% da viabilidade celular

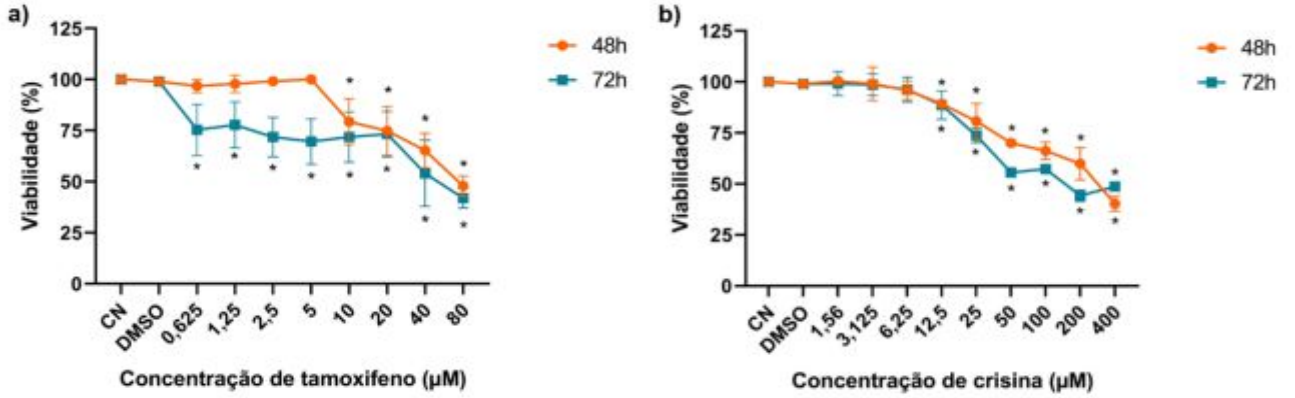


Figura 1. Curvas de dose-resposta do tamoxifeno (a) e crisina (b), indicando a viabilidade celular nas células de câncer de mama MCF-7 nos tempos de 48 e 72 horas.
(*) = significância de p<0,05, quando comparado ao controle negativo (CN).

Em seguida, as células tumorais de mama MCF-7 foram expostas ao tratamento combinado de tamoxifeno nas mesmas concentrações (0,625 a 80 μM) e a dose sub efetiva (IC_{30}) de 72 horas da crisina (123 μM) e a viabilidade celular foi avaliada após 72 horas, tempo que apresentou os melhores valores de IC para ambos os compostos isolados. Assim, foi observada uma diminuição significativa na viabilidade celular para o tratamento combinado para as doses de 0,625 a 20 μM do tamoxifeno, quando comparado as mesmas doses deste composto isolado, mostrando que a crisina melhorou a eficácia deste, uma vez que passou a apresentar um IC_{50} de 9,9 μM, redução de aproximadamente 83% na concentração da droga (Figura 2).

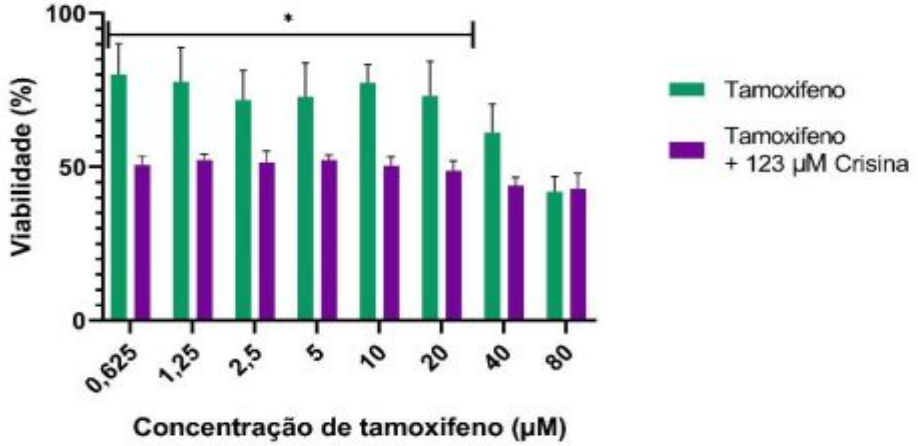


Figura 2. Gráfico da viabilidade celular do tamoxifeno isolado e em combinação com a dose sub efetiva (IC_{30}) da crisina após 72h.
(*) = significância de p<0,05, quando comparado a viabilidade do tamoxifeno isolado e em combinação com a crisina

4. DISCUSSÃO

O tamoxifeno é um modulador seletivo de ER e o agente mais amplamente prescrito usado para mulheres na pré e pós-menopausa, e embora sua descoberta tenha sido um grande avanço terapêutico com melhoria na sobrevivência da população feminina com câncer de mama, aproximadamente 25% das pacientes não respondem ao seu tratamento, e cerca de 40% daquelas que inicialmente são beneficiadas, desenvolvem resistência com o passar do tempo. Também, o uso desta medicação pode causar efeitos adversos importantes como sintomas de menopausa em pacientes jovens, doenças hematológicas e até câncer endometrial (13). Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas, que podem aumentar a eficácia do tamoxifeno, reduzindo sua toxicidade, tem sido alvo de pesquisas recentes (14).

Neste contexto, a combinação de drogas tem sido muito utilizada para alcançar maiores chances de cura e evitar a resistência ao tratamento (14). Nos últimos anos, o estudo da combinação utilizando compostos naturais tem se destacado por apresentar bons resultados *in vitro*, com a possibilidade de reverter resistência e reduzir efeitos adversos sem alterar sua eficácia (15). Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar

o efeito citotóxico do tratamento combinado de tamoxifeno e crisina em células de câncer de mama hormônio positivo.

A crisina é um composto de origem natural da classe dos polifenóis e que tem demonstrado importantes atividades biológicas, no qual testes *in vitro* têm mostrado resultados de grande potencial para o tratamento de células tumorais, com efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, inibição do ciclo celular, entre outros (16). Ainda, alguns estudos têm associado a crisina a outros tipos de tratamento já utilizados para o câncer, tais como quimioterápicos (17), e a radioterapia (18), em linhagens de células cancerígenas de fígado e de mama humanas, respectivamente.

Nossos resultados mostraram que tanto o tamoxifeno quanto a crisina, quando administrados de forma isolada apresentaram efeito citotóxico dose-tempo-dependente, e estes estão de acordo com trabalhos da literatura que já mostraram resultados preliminares de ação do tamoxifeno (13) e crisina (11) em células de câncer de mama. No entanto, quando as células MCF-7 foram expostas à combinação de ambos os compostos utilizando as mesmas concentrações do tamoxifeno e a dose sub efetiva da crisina, o efeito citotóxico do tamoxifeno foi significativamente maior, com uma importante redução no valor de IC_{50}, mostrando que a crisina pode facilitar a ação citotóxica do tamoxifeno, permitindo que o uso de menores concentrações já alcance ótimos resultados. Wang et al (15) em um estudo semelhante mostrou que a combinação de tamoxifeno com uma substancia isolada de uma planta, o celastrol, também resultou em uma redução da concentração (de 7,87 µM para 4,79 µM) do agente endócrino, em células de câncer de mama MCF-7, demonstrando o potencial da associação de substancias de origem natural como adjuvante no tratamento com tamoxifeno, no câncer de mama hormonal positivo.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o tamoxifeno e a crisina apresentaram efeito citotóxico em células de câncer de mama hormônio positivo, MCF-7. Ainda, que o tratamento combinado de ambos os compostos mostrou uma redução significativa da concentração inibitória para o tamoxifeno, sugerindo que a associação com a crisina aumentou a efetividade do agente endócrino. Assim, é possível concluir que a associação deste composto natural poderia ser uma opção promissora a ser utilizado como adjuvante na terapia do câncer de mama hormonal positivo, para mulheres que demonstram resistência ao uso do tamoxifeno ou apresentam efeitos adversos importantes com altas doses deste.

FINANCIADORES

Fundação araucária, CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. IARC [Internet]. Cancer Today 2022 [Acesso em 2 set 2024]. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/en.
2. INCA INdC- [Internet]. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA2022. [Acesso em 2 set 2024]. Disponível em: https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil.
3. Organization WH [Internet]. Breast Cancer 2024 [Acesso em 2 set 2024]. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=Overview,producing%20lobules%20of%20the%20breast.
4. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. Clinical Medicine Insights: Pathology. 2015;8:CPath.S31563.
5. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World J Clin Oncol. 2014;5(3):412-24.
6. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. Lancet. 2017;389(10074):1134-50.

7. Breastcancer.org [Internet]. Tamoxifen: What to Expect, Side Effects, and More 2024 [Acesso em 2 set 2024]. Disponível em: https://www.breastcancer.org/treatment/hormonal-therapy/tamoxifen.
8. Anderson MK, Matey L. Overview of cancer and cancer treatment. Chemotherapy and Immunotherapy Guidelines and Recommendations for Practice Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society. 2019:25-50.
9. Jung T, Cheon C. Synergistic and Additive Effects of Herbal Medicines in Combination with Chemotherapeutics: A Scoping Review. Integr Cancer Ther. 2024;23:15347354241259416.
10. Sood A, Mehrotra A, Sharma U, Aggarwal D, Singh T, Shahwan M, et al. Advancements and recent explorations of anti-cancer activity of chrysin: from molecular targets to therapeutic perspective. Explor Target Antitumor Ther. 2024;5(3):477-94.
11. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Borji A, Hasanzadeh M, Jabbari F, Farkhondeh T, et al. Inhibitory and Cytotoxic Activities of Chrysin on Human Breast Adenocarcinoma Cells by Induction of Apoptosis. Pharmacogn Mag. 2016;12(Suppl 4):S436-s40.
12. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. Journal of Immunological Methods. 1989;119(2):203-10.
13. Li W, Shi X, Xu Y, Wan J, Wei S, Zhu R. Tamoxifen promotes apoptosis and inhibits invasion in estrogen-positive breast cancer MCF-7 cells. Mol Med Rep. 2017;16(1):478-84.
14. Henidi HA, Al-Abbasi FA, El-Moselhy MA, El-Bassossy HM, Al-Abd AM. Despite Blocking Doxorubicin-Induced Vascular Damage, Quercetin Ameliorates Its Antibreast Cancer Activity. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:8157640.
15. Wang L, Tang L, Yao C, Liu C, Shu Y. The Synergistic Effects of Celastrol in combination with Tamoxifen on Apoptosis and Autophagy in MCF-7 Cells. Journal of Immunology Research. 2021;2021(1):5532269.
16. Stompor-Gorący M, Bajek-Bil A, Machaczka M. Chrysin: Perspectives on Contemporary Status and Future Possibilities as Pro-Health Agent. Nutrients [Internet]. 2021; 13(6).
17. Li X, Huang J-M, Wang J-N, Xiong X-K, Yang X-F, Zou F. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53. Chemico-Biological Interactions. 2015;232:12-20.
18. Jafari S, Dabiri S, Mehdizadeh Aghdam E, Fathi E, Saeedi N, Montazersaheb S, et al. Synergistic effect of chrysin and radiotherapy against triple-negative breast cancer (TNBC) cell lines. Clinical and Translational Oncology. 2023;25(8):2559-68.

Palavras-chave: câncer de mama; técnicas de cultura celular; combinação de drogas.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE DO COMPÓSITO PVDF-HAP OBTIDO POR IMPRESSÃO 3D

Lediane Pedroso Silva[1]; Tais da Silva[1]; Henrique Lança Fuzeti[2]; Isadora Yumi Yokoyama Kaminata[3]; Antonio Marcos Reissureição Galindo[3]; Luzmarina Hernandes[4];

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

[2]Acadêmico de Graduação em Odontologia, Laboratório de Histotécnica Animal, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[3]Academico de Graduação em Medicina, Laboratório de Histotécnica Animal, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[4]Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: lediane.silva06@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O avanço da medicina moderna permitiu o aumento da expectativa de vida e, portanto, são necessárias cada vez mais soluções para problemas relacionados à substituição e reconstrução de órgãos e tecidos que foram perdidos ou lesionados devido a idade e/ou por traumas, uma vez que, a perda de parte do corpo pode acarretar em perda de função e distúrbios psicológicos e sociais. Dessa forma, o campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa vem ganhando um aumento exponencial de estudos e interesse médico (1,2).

A terminologia biomaterial é bem estabelecida na literatura, e de acordo com o Instituto Nacional Americano de Saúde trata-se de materiais de origem natural ou sintética, capazes de interagir com o sistema biológico com o objetivo de substituição, tratamento e/ou reparo de tecidos danificados ou perdidos. Diante disso, o uso de biomateriais tem uma rica história de evolução, pois inicialmente eram inertes e evoluíram para substâncias interativas, complexas e que se comunicam com o meio em que foram implantados, modulando a resposta das células para promover regeneração e até cura de tecidos e, portanto, são cruciais para melhoria na qualidade de vida e saúde (2,3).

Os biomateriais podem ser classificados em: metais, polímeros, cerâmicas e compósitos (2) sendo o último, foco do presente trabalho. Esses materiais correspondem a uma área de pesquisa interdisciplinar, pois requerem conhecimento em diversas áreas de estudos, dado que, faz-se necessário compreender o processamento do material, composição e propriedades e como ele se comporta no ambiente biológico (2,4).

Os biomateriais de quarta geração podem ser produzidos por impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva (AM) e tem demonstrado grande impacto na medicina regenerativa e engenharia de tecidos, pois permite a produção de estruturas camada por camada e adaptada para o paciente. Diversos autores reconhecem a impressão tridimensional como uma ferramenta potente e revolucionária, capaz de sintetizar os chamados "sistemas biomédicos inteligentes". A impressão 3D exibe muitas vantagens, como a personalização (é possível produzir um design de acordo com a anatomia e necessidade do paciente), a automação (permite que o processo de síntese de materiais tridimensionais seja moldado de forma mais rápida e eficaz), sustentabilidade (a taxa de desperdício é muito menor comparado com os processos convencionais, visto que, a manufatura aditiva permite recuperar os materiais em casos de falha) (5–7).

O polifluoreto de vinilideno (PVDF) é um polímero que pode ser moldado por impressão 3D e ser usado em diversos dispositivos biomédicos, como peles inteligentes, músculos artificiais, tecido ósseo e sensores de monitoramento de saúde. (8) O PVDF possui uma grande resistência química e mecânica. É um material leve, de processamento flexível e durável. À sua composição podem ser incorporados outros materiais para a formação de compósitos, como hidroxiapatita, cujo papel na regeneração óssea é conhecida (9). O objetivo de misturar materiais com características físicas e químicas distintas tem o intuito de produzir um material melhorado. Esses resultados notáveis atraem grande atenção da comunidade científica. Apesar disso, para seu uso na prática precisam ser testados quanto à sua biocompatibilidade, bioatividade e possíveis efeitos nocivos (1,10–12).

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade do PVDF puro e associado com a hidroxiapatita (PVDF-HAp) manufaturados por impressão 3D.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº 1207310723). Foram utilizadas para o estudo 30 ratos *Wistar* provenientes do biotério central da UEM. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, em um ambiente ideal com temperatura entre 20-24ºC, ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas com ração e água *ad libitum* e um período de ambientação de 7 dias, após o qual foram realizados os implantes subcutâneos.

2.2. Implante subcutâneo

O modelo de implante subcutâneo é preconizado pela norma ISO 10993-6:2016. Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina 2% (20 mg/kg de peso do animal) (Anasedan®, Ceva,Paulínia, São Paulo, Brasil) e cetamina 10% (100 mg/kg de peso do animal) (Dopalen®, Ceva,Paulínia, São Paulo, Brasil) na proporção de 1:1, administrada por via intramuscular. Após epilação e antissepsia da região dorsal superior, em cada animal foram realizadas 2 incisões transversais para acesso subcutâneo e produção de 2 bolsas por divulsão do tecido. A bolsa à direita recebeu um implante de PVDF puro ou PVDF-HAp em formato de bastão com 1,5 a 2,0 mm de diâmetro, e 5 mm a 10 mm de comprimento. Na bolsa esquerda não foi implantado nenhum material sendo apenas divulsionada e suturada, representando o controle negativo.

Os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (associação de cloridrato de xilazina 2% e cetamina 10%) aos 7 e 15 dias após o implante. As amostras de pele contendo o implante foram removidas e pré-fixadas em paraformaldeído 4% e na sequência o implante foi retirado cuidadosamente, para facilitar a microtomia. Imediatamente após a retirada do implante, as amostras retornaram ao fixador para completaram o tempo de fixação (24h no total) e posteriormente foram processadas para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 6 µm em micrótomo semiautomático. Todas as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

2.3. Avaliação morfológica e da biocompatibilidade

A determinação da biocompatibilidade está sendo realizada por sistema de *score*, de acordo com os Quadros 1 e 2, preconizados pela norma ISO 10993-6:2016 (12). O objetivo do método testado é caracterizar a história e evolução da resposta tecidual após a implantação de um material médico, incluindo a integração ou absorção/degradação final do material. A análise das lâminas foi feita às cegas, sem a identificação do animal/grupo. As análises estão em curso.

Quadro 1. Sistema de avaliação histológica - Tipo de célula/resposta

	Score				
Tipos de células	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Polimorfonucleares	0	Raros, 1 a 5/phf	5 a 10/phf	Infiltrado pesado	Embalado
Linfócitos	0				
Células plasmáticas	0				
Macrófagos	0				
Células gigantes	0	Raros, 1 a 2/phf	3 a 5/phf		Empacotado
Necrose	0	Mínimo	Leve	Moderado	Forte

phf = por campo de alta potência (400x) - (phf = *per high-powered field*)

Quadro 2. Sistema de avaliação histológica – Resposta tecidual

	Score				
Resposta	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Neovascularização	0	Proliferações capilares mínimas focais, 1 a 3 botões	Grupos de 4 a 7 capilares com estruturas fibroblásticas de suporte	Banda larga de capilares com estruturas fibroblásticas de suporte	Extensa faixa de capilares com estruturas fibroblásticas de suporte
Fibrose	0	Banda estreita	Banda moderadamente espessa	Banda grossa	Banda extensa

Infiltrado gorduroso	0	Quantidade mínima de gordura associada à fibrose	Várias camadas de gordura e fibrose	Acúmulo alongado e amplo de células de gordura ao redor do local do implante	Extensa gordura envolvendo completamente o implante

A análise morfológica foi realizada em microscópio óptico Nikon® (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplado a uma câmera de alta resolução (Nikon® DSFi1c, Shimjuku, Japão). Foi utilizado programa para aquisição de imagem específico para a marca Nikon® (NIS-Elements versão 4.0, Praga, República Checa) e os principais resultados estão representados na Figura 1.

3. RESULTADOS

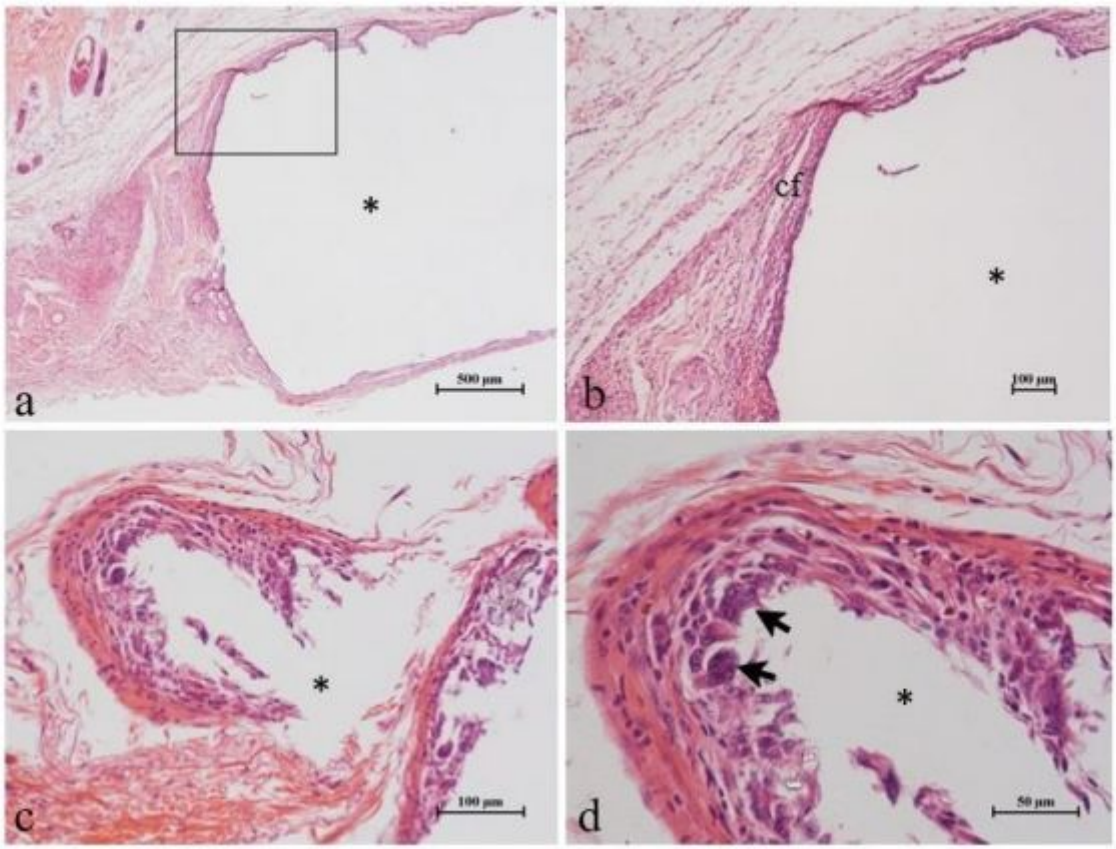
Na observação clínica, a pele implantada com os biomateriais se mostrou um pouco edemaciada e com uma leve coloração avermelhada, aos 7 e 15 dias.

Na observação microscópica, observou-se que o tecido onde ambos os materiais foram implantados apresentaram aumento da celularidade no local implantado (células não inflamatórias) e uma leve resposta inflamatória, com presença de células gigantes multinucleadas. Esta característica esteve mais presente nas extremidades dos bastões.

Foi observado, ao redor dos bastões, um aumento de vascularização (neovascularização), um início de desenvolvimento de cápsula, com formação de banda estreita, principalmente nos ângulos dos bastões e uma quantidade mínima de gordura associada à fibrose.

Não foi possível, por meio da análise histológica encontrar diferenças expressivas no tecido envolvendo as amostras implantadas, seja com PDVF puro ou PVDF-HAp.

Em nenhum dos tempos foi possível observar sinais de necrose.



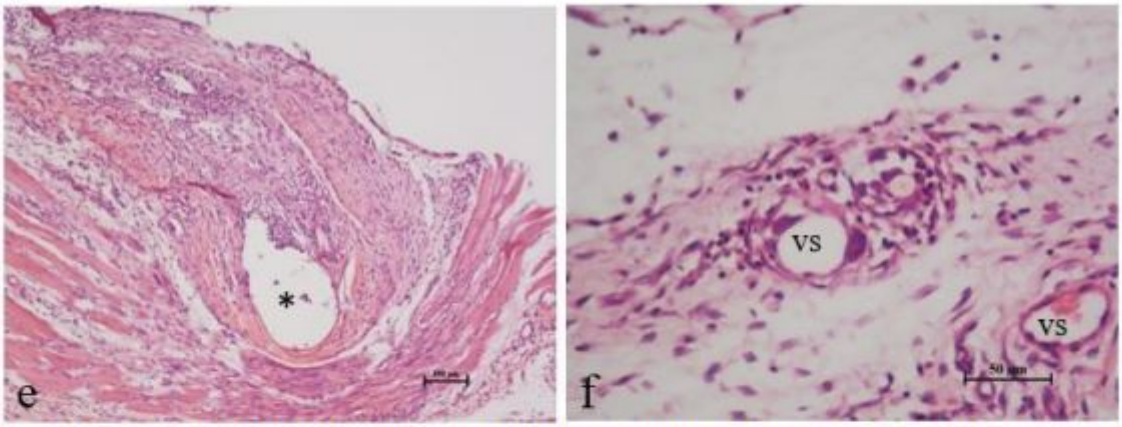


Figura 1. Fotomicrografia de pele pós implante subcutâneo de PVDF (7 dias = a, b; 15 dias = c, d) e PVDF HAp (e, f). Observe em (a) a localização do implante (·) do PVDF puro, na forma de bastão, 7 dias após o implante. Em (b) o detalhe indicado em (a), destacando o início de formação de cápsula fibrosa (cf) no ângulo do bastão. Em (c), em menor aumento, e em (d) mostrando o aumento de celularidade com maior presença de fibroblastos e células gigantes de corpo estranho (setas). Em (e, f) implante de bastão composto por PVDF-HAp, aos 15 dias após implante, apresentando celularidade moderada ao redor do implante (e), com presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos (vs) em (f). Coloração: hematoxilina e eosina.

4. DISCUSSÃO

O uso do PVDF como alternativa na medicina regenerativa tem sido considerada uma opção promissora. Os diversos benefícios que permeiam este biomaterial têm alavancado estudos e interesse médico. A redução de custos, desperdício e tempo para fabricação do PVDF são aspectos favoráveis para que seja cada vez mais utilizado no mercado biomédico (11).

A formação de cápsula e a presença de células gigantes visualizados neste estudo, apontam para uma resposta imune típica frente a corpos estranhos, e representa um mecanismo natural do corpo (13). No entanto, a síntese de cápsula fibrosa é indicativa de que o corpo está tentando isolar o implante, podendo comprometer sua integração. Enquanto as células gigantes podem estar participando do processo de fagocitose, tentando englobar e degradar substâncias desconhecidas (14). Quanto a essa resposta do sistema imune, apesar de presente, demonstrou-se leve a moderada. Esses achados estão de acordo com o esperado, uma vez que o corpo naturalmente inicia o processo de resposta inflamatória ao reconhecer um material estranho. Considerando a atividade celular ao redor do material, Anderson, *et al.* (2008) afirma que a reação das células, como células gigantes e macrófagos, frente a um corpo estranho trata-se do estágio final da resposta inflamatória.

Vale ressaltar a importância dos testes de biocompatibilidade para avaliar novos materiais e como interagem com o ambiente biológico. Embora o PVDF seja uma classe de polímeros com forte potencial, há um longo caminho a percorrer, necessitando de demais análises (8).

Os resultados desse estudo foram compatíveis com os scores 1 e 2 (serão analisados estatisticamente) revelando uma resposta de leve a moderada ao final de 15 dias de estudos. É importante avaliar a evolução desta resposta num maior prazo de tempo para determinar se o material será tolerado pelo organismo. O presente estudo, num período de 15 dias de avaliação mostrou que o PVDF, seja puro ou associado com a HAp não foi completamente inerte ao organismo, e, portanto, mostrou-se biotolerável, por esta razão é necessário a realização de estudos de biocompatibilidade em tempos maiores (15).

Corroborando com nosso estudo Augustine, *et al* (2017) confirma a capacidade de angiogênese do PVDF e ressalta ser um dos eventos mais importantes para o sucesso do implante.

A ausência de necrose não foi observado em qualquer dos tempos de análise, indicando que o biomaterial não induziu rejeição ou danos teciduais severos. Diversos outros estudos validam a capacidade biocompatível do PVDF.

5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostraram que implantes subcutâneos de PVDF puro e o PVDF-HAp induziram uma resposta tecidual de leve a moderada ao longo de 15 dias de avaliação. Essa resposta tecidual é típica frente a um corpo estranho e, portanto, já esperada. Diante disso, conclui-se que tanto o PVDF puro e associado com a hidroxiapatita (PVDF-HAp) manufaturados por impressão 3D se mostraram biocompatíveis nos períodos testados de modelo *in vivo*.

FINANCIADORES

Fundação Araucária, FINEP e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Histotécnica Animal da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Patel D, Shah R, Dalwadi H. Application of Polymer and Biomaterials for 3d Printing Technology: Review. Available from: www.ijraset.com
2. Zavaglia CAC, Prado da Silva MH. Feature Article: Biomaterials. In: Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Elsevier; 2016.
3. Agrawal R, Kumar A, Mohammed MKA, Singh S. Biomaterial types, properties, medical applications, and other factors: a recent review. Vol. 24, Journal of Zhejiang University: Science A. Zhejiang University; 2023. p. 1027–42.
4. Bernardo MP, Paschoalin RT, Dos Santos DM, Bilatto S, Farinas CS, Correa DS, et al. Processing and application of polymeric biomaterials: recent advances and perspectives. Vol. 44, Quimica Nova. Sociedade Brasileira de Quimica; 2021. p. 1311–27.
5. Yang H, Fang H, Wang C, Wang Y, Qi C, Zhang Y, et al. 3D printing of customized functional devices for smart biomedical systems. SmartMat. John Wiley & Sons Inc; 2023.
6. Mirzaali MJ, Moosabeiki V, Rajaai SM, Zhou J, Zadpoor AA. Additive Manufacturing of Biomaterials—Design Principles and Their Implementation. Vol. 15, Materials. MDPI; 2022.
7. Zhang H, Wu C. 3D printing of biomaterials for vascularized and innervated tissue regeneration. Vol. 9, International Journal of Bioprinting. Whioce Publishing Pte. Ltd.; 2023.
8. Concha VOC, Timóteo L, Duarte LAN, Bahú JO, Munoz FL, Silva AP, et al. Properties, characterization and biomedical applications of polyvinylidene fluoride (PVDF): a review. Journal of Materials Science. Springer; 2024.
9. Wüster J, Neckel N, Sterzik F, Xiang-Tischhauser L, Barnewitz D, Genzel A, et al. Effect of a synthetic hydroxyapatite-based bone grafting material compared to established bone substitute materials on regeneration of critical-size bone defects in the ovine scapula. Regen Biomater. 2024;11.
10. Li N, Khan SB, Chen S, Aiyiti W, Zhou J, Lu B. Promising New Horizons in Medicine: Medical Advancements with Nanocomposite Manufacturing via 3D Printing. Vol. 15, Polymers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

11. Farooq S, Ranjan N. Piezoelectricity and electrochemical effect of PVDF thermoplastic-based composites. Advances in Materials and Processing Technologies. Taylor and Francis Ltd.; 2023.

12. Biological evaluation of medical devices BS EN ISO 10993-6:2016 [Internet]. 2016 [cited 2024 Sep 24]. Available from: https://www.iso.org/standard/61089.html

13. Radu D, Viorel-Puiu P, Dan P, Alexandru M. A fractal model of blood Vessel formation In porous polymer implants [Internet]. 2009. Available from: https://www.researchgate.net/publication/289436064_A_fractal_model_of_blood_Vessel_formation_In_porous_polymer_implants

14. James M. A, Analiz R, David TC. Foreign body reaction to biomaterials [Internet]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2327202/

15. Augustine R, Dan P, Sosnik A, Kalarikkal N, Tran N, Vincent B, et al. Electrospun poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/zinc oxide nanocomposite tissue engineering scaffolds with enhanced cell adhesion and blood vessel formation. Nano Res. 2017 Oct 1;10(10):3358–76.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis; impressão tridimensional; biomateriais.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ASSOCIATION BETWEEN THE PRESENCE OF ANTI-TOXOPLASM ANTIBODIES AND SOCIO-EPIDEMIOLOGICAL AND LEARNING DATA IN CHILDREN AGED 6 TO 11 YEARS

Maria Carolina Gobbi dos Santos Lolli[1]; Maria José Pastre[2]; Henrique Cazanti Sona[3]; Luiz Fernando Lolli[4]; Débora de Mello Gonçales Sant´Ana[5]

[1] Postgraduate Student (Doctorate), Biosciences and Pathophysiology Program, UEM, Maringá, PR.

[2] Postgraduate Student (Post-Doctorate), Biosciences and Pathophysiology Program, UEM, Maringá, PR.

[3]Postgraduate Academic (Specialization), Specialization in Anatomy and Physiology, UEM, Maringá, PR

[4]Professor of the Department of Dentistry, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[5]Professor of the Morphological Sciences department, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: profcarolinasantos@gmail.com

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is a neurotropic apicomplexan protozoan that infects a third of the world's human population and shows affinity for organs such as the brain, eyes, and testicles in warm-blooded mammals. Infection occurs mainly through the consumption of raw or undercooked meat containing tissue cysts or through food or drinking water contaminated with oocysts shed by cats. In addition, organ transplantation, blood transfusion, and vertical transmission from mother to fetus during pregnancy are forms of transmission of *T. gondii* (1). Toxoplasmosis is generally asymptomatic in immunocompetent individuals and is referred to as latent toxoplasmosis. However, studies cast doubt on this concept, as exposure to the parasite has been associated with a range of acute and chronic symptoms, particularly an increased rate of neurological, behavioral, and psychiatric disorders linked to serological evidence of *T. gondii* exposure (2,3).

In the brain, *T. gondii* tachyzoites can invade microglia, astrocytes, and neurons, forming cysts within these cells. This parasite can alter the structure and function of neurons, leading to specific behavioral changes in the host (3). There is evidence that *T. gondii* infection is a significant risk factor for neuropsychiatric disorders, as it can impair dopaminergic systems and neurotransmitter production, mainly dopamine and serotonin (4,5). Furthermore, studies have observed an association between seropositivity for *T. gondii* and cognitive deficits, particularly decreased visual acuity, memory deficits, attentional capacity, concentration ability, impulsivity, learning difficulties, as well as neuropsychiatric conditions such as bipolar disorder and mania (6,7).

This epidemiological study aimed to analyze the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in elementary school students, aged 6 to 11 years, from a state school in the interior of Paraná, and its possible association with socio-economic, epidemiological, and learning factors.

2. MATERIAL AND METHODS

This research was carried out with 196 children aged 6 to 11 years, regularly enrolled at the Pedagogical Application College (CAP-UEM) of the State University of Maringá, Paraná, along with their respective legal guardians. Consent forms for guardians and assent forms for children were produced and duly signed. The research project was approved by the Human Research Ethics Committee (COPEP) of UEM and received a favorable opinion under the CAAE number 70683423.6.0000.0104.

Data were collected by CAP-UEM. A structured form was used, which was filled out by the guardians of the participating children in their respective homes. The form consisted of socio-epidemiological questions reflecting housing conditions and habits, as well as questions related to school learning.

A 10 µL capillary blood sample was collected from the children at CAP-UEM on previously defined and appropriate dates and times, in accordance with the institution's schedule. The presence of Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies was verified using the OnSite® Toxo IgG/IgM rapid test (Ref: R0234C, Lot F0413U11F00D), a lateral flow immunoassay for the simultaneous detection and differentiation of *Toxoplasma gondii* IgG and IgM antibodies in whole blood.

The socio-demographic variables considered included gender, age, backyard presence, presence of animals, presence of sand in the backyard, and habits of playing in the sand. Additionally, meat consumption,

meat origin, milk consumption, type of drinking water, and routines for washing food and the water used were also analyzed.

Guardians were also asked if the child had difficulty at school, if they were monitored by a multidisciplinary team, if they were taking psychoactive medication, and if the parents considered their child to be agitated or inattentive. Additionally, the exam results were included as a dichotomous variable, classified as either positive or negative.

The data obtained from the forms and test results were organized into Microsoft Excel spreadsheets. These were presented in association tables showing the relationships between socio-epidemiological variables and seropositivity for *T. gondii*. Additionally, the association between learning difficulties and seropositivity for *T. gondii* was also analyzed. Association analyses were performed using Fisher's Exact test, with the significance level set at 5%.

3. RESULTS

Of the 196 participating students, 42 tested positive for IgG Anti-*T. gondii* antibodies, and none showed IgM Anti-*T. gondii* antibodies. Table 1 presents the distribution of the sample according to age and sex. A statistically significant association was observed between seropositivity for *T. gondii* and male students aged 8 and 11 years.

Table 1: Presence of anti-*T. gondii* antibodies in children aged 6 to 11 years living in Maringá, Paraná, 2024.

age	Male		Female		p value	Total
	Negative n(%)	Positive n(%)	Negative n(%)	Positive n(%)		
6	0 (0)	3 (3.2)	4 (3.9)	1 (1)	1	8
7	5 (5.4)	4 (4.3)	14 (13.6)	5 (4.9)	0.4	28
8	2 (2.1)	4 (4.3)	12 (11.7)	1 (1)	0.01*	19
9	10 (10.8)	4 (4.3)	15 (14.4)	2 (1.9)	0.36	31
10	50 (53.8)	6 (6.5)	32 (31.1)	9 (8.7)	0.16	97
11	2 (2.1)	3 (3.2)	8 (7.8)	0 (0)	0.03*	13
Total	**69 (74.2)**	**24 (25.8)**	**85 (82.5)**	**18 (17.5)**		**196**

Source: The authors. p>0.05 by Fisher's Exact Test.

Table 2 demonstrates the association between housing data and lifestyle habits and *T. gondii* seropositivity.

A statistically significant association was observed between the presence of animals at home and anti-*T. gondii* antibodies. Regarding family health history, none of the participants reported a history of toxoplasmosis. Similarly, no previous diagnosis of toxoplasmosis was reported in the children's health history.

Table 3 demonstrates the association between *T. gondii* seropositivity and school-related issues, including the use of psychoactive medication. The results showed a high level of statistical significance, indicating that seropositive children experience greater difficulties at school, undergo more multidisciplinary monitoring, and use more psychoactive medications.

Table 2: Association between data related to housing and lifestyle habits and anti-T. gondii seropositivity in children aged 6 to 11 years living in Maringá, State of Paraná, 2024.

Features	Toxo IgG negative	Toxo IgG positive	*p value*
Do you have a backyard at home?			
no	25	10	
yes	129	32	0.26
Do you have a pet at home?			
no	43	5	
yes	111	37	0.04*
What kind of water does the family use for drinking?			
other water	87	24	
tap water	67	18	1
What kind of water do you use to wash fruits, vegetables and greens?			
filtered or boiled water	6	5	
Tap water	148	37	0.06

Source: The authors. p>0.05 by Fisher's Exact Test.

Table 3: Association between anti-*T. gondii* seropositivity and issues related to learning in children aged 6 to 11 years living in Maringá, State of Paraná, 2024.

	Toxo IgG negative	Toxo IgG positive	*p value*
Does your child have difficulties at school?			
no	94	9	
yes	60	33	< 0.0001*
Does your child use psychoactive medication?			
no	140	25	
yes	14	17	< 0.0001*
Is your child restless or inattentive?			
no	55	11	
yes	99	31	0.27
Does your child receive multidisciplinary support?			
no	107	20	
yes	47	22	0.01*

Source: The authors. p>0.05 by Fisher's Exact Test.

4. DISCUSSION

Brazil has a very high rate of *T. gondii* infection in humans (8,9). However, there are few epidemiological studies with asymptomatic children (9,10). Anti-*T. gondii* antibodies are usually detected in cases of congenital infection or ocular manifestations. Since 2022, the toxoplasmosis test has been included in the heel prick examination in Brazil, screening for IgM antibodies in newborns and providing treatment for congenital toxoplasmosis if necessary. Congenital toxoplasmosis has been subject to compulsory notification in Brazil since 2018 (9). The children in this study were born before the toxoplasmosis test was included in neonatal screening.

In Kenya, an estimated 50% of primary school children had prior contact with the parasite, with prevalence increasing with age due to poor hygiene and living conditions (11). In Pakistan, the prevalence of IgG anti-*T. gondii* among suburban school adolescents was 17.4%, with no difference between sexes (12). In this study, 21.4% of the children had detectable IgG anti-*T. gondii* antibodies, and no differences were observed between ages 6 to 11 years. The comparison between sexes was significant only at ages 8 and 11.

No IgM anti-*T. gondii* antibodies were detected in this study, indicating that the infected children did not have recent contact with the parasite, as IgG antibodies indicate an infection of at least 12 months (8). Most data on toxoplasmosis prevalence in the literature come from studies on adults, particularly pregnant women (12). These studies show that seroprevalence varies greatly, being higher in rural areas due to climatic and cultural factors (9,10,13,14). It is estimated that most human toxoplasmosis cases are foodborne, primarily through ingestion of *T. gondii* oocysts in contaminated soil, water, or food, or through consumption of tissue cysts in infected meat (13,14,15).

In this study, no association was found between general lifestyle habits and food consumption and the presence of anti-*T. gondii* antibodies. However, an association was observed between pet ownership and *Toxoplasma* seropositivity, particularly among families with cats, as also reported in other studies (16).

No previous studies have examined the relationship between *T. gondii* seropositivity and school performance, as found in this study, highlighting the need for further research in this area since many school-age children face academic challenges (15). Although *T. gondii* infection is not yet considered in the management of patients with behavioral or psychiatric disorders (6,12), studies have shown that latent toxoplasmosis can cause behavioral and psychomotor changes, as well as symptoms associated with ADHD (17), OCD, and anxiety (4,5,17,18,19). An association was observed between anti-*T. gondii* seropositivity and the use of psychoactive medications, suggesting a potential link between the infection and neurobiological changes leading to the prescription of these medications. HIV-positive children were more likely to receive multidisciplinary support to address school difficulties.

This research demonstrates a link between *T. gondii* infection and learning difficulties, suggesting that the parasite may cause morphological or functional brain changes that impair learning. Previous studies indicate that *T. gondii* infection may affect neurotransmitters, particularly the dopaminergic system, which could explain the resulting cognitive and motor deficits, reduced concentration, impaired inhibitory control, and executive dysfunction, all of which are crucial for learning (4,5,12,18,19).

5. CONCLUSION

In this study, the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies was 21.4% among the children, with a significantly higher prevalence among boys aged 8 and 11 years. A positive association was found between pet ownership and seropositivity in children. Seropositivity was also linked to school difficulties, use of psychoactive medications, and multidisciplinary monitoring.

FUNDIND SUPPORT

Capes and FocoEnsina Pharmatelier®

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the pedagogical team at the CAP-UEM, the children and their respective parents who participated in the study.

REFERENCES

1. Montoya JGLO.Toxoplasmosis. Lancet. 2004;12(363):1965–76.
2. Severance EG, Xiao J, Jones-Brando L, Sabunciyan S, Li Y, Pletnikov M, Prandovszky E, Yolken R. *Toxoplasma gondii*-A Gastrointestinal Pathogen Associated with Human Brain Diseases. Int Rev Neurobiol. 2016;131:143-163.
3. Mendoza-Larios LA, García-Dolores F, Sánchez-Anguiano LF, Antuna-Salcido EI, Hernández-Tinoco J, Rocha-Salais A, Segoviano-Mendoza MA, Sifuentes-Álvarez A, Alvarado-Esquivel C. *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system and suicide: A case-control study of decedents. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2023 Nov 20;13(3):77-82.
4. Alvarado-Esquivel C, Sanchez-Anguiano LF, Hernandez-Tinoco J, Berumen-Segovia LO, TorresPrieto YE, Estrada-Martinez S, et al. *Toxoplasma gondii* infection and mixed anxiety and depressive disorder: a case-control seroprevalence study in Durango, Mexico. J Clin Med Res. 2016; 8(7):519.
5. DeBarros JLVM, Barbosal G, Salem H, Rocha NP, Kummer A, Okusama OOI. Is there any association between *Toxoplasma gondii* infection and bipolar disorder? A systematic review and meta-analysis. J Affect Disord. 2017; 209:59–65.
6. Kazemi Arababadi M, Abdollahi SH, Ramezani M, Zare-Bidaki M. A Review of Immunological and Neuropsychobehavioral Effects of Latent Toxoplasmosis on Humans. Parasite Immunol. 2024 Jul;46(7):e13060.
7. Ene L, Marcotte TD, Umlauf A, Grancea C, Temereanca A, Bharti A, Achim CL, Letendre S, Ruta SM. Latent toxoplasmosis is associated with neurocognitive impairment in young adults with and without chronic HIV infection. J Neuroimmunol. 2016; Oct 15;299:1-7.
8. McAuley, James B. MD, MPH .Toxoplasmose em crianças. The Pediatric Infectious Disease Journal 27(2):p 161-162, fevereiro de 2008.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Toxoplasmose Adquirida na Gestação e Toxoplasmose Congênita. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-deconteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigilancia/guia-de-vigilancia-emsaude_5ed_21nov21_isbn5.pdf/view
10. 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. *Parasitology* . 2012;139(11):1375-1424.
11. TR Bowry, Mario E. Camargo, M. Kinyanjui, Sero-epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in young children in Nairobi, Kenya. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 1986;80(3):439–441
12. Sadaruddin A, Agha F, Anwar F, Ghafoor A. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in young school children in Islamabad. J Pak Med Assoc. 1991 Jun;41(6):131-4.
13. Bartolomé Del Pino LE, Zanón-Moreno V. Systematic Review on the Relationship between Toxoplasmosis and Mental Disorders. Actas Esp Psiquiatr. 2024 Apr;52(2):149-160.
14. Rensch P, Postolache TT, Dalkner N, Stross T, Constantine N, Dagdag A, Wadhawan A, Mohyuddin F, Lowry CA, Joseph J, Birner A, Fellendorf FT, Finner A, Lenger M, Maget A, Painold A, Queissner R, Schmiedhofer F, Smolle S, Tmava-Berisha A, Reininghaus EZ. *Toxoplasma gondii* IgG serointensity and cognitive function in bipolar disorder. Int J Bipolar Disord. 2024. Aug 23;12(1):31.
15. L. CP Assoni , F. Nakashima , VP de Sousa , et al., " Soroepidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue em uma população da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil ," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 118 (agosto de 2023): 102 – 109.
16. Cong W, Dong W, Bai L, Wang XY, Ni XT, Qian AD, Zhu XQ. Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric patients: a case-control study in eastern China. Epidemiol Infect. 2015 Oct;143(14):3103-9.

18. Flegr J. Effects of *Toxoplasma* on human behavior. Schizophr Bull. 2007;33:757–760. doi: 10.1093/schbul/sbl074
19. Akaltun İ, Kara T, Ayaydın H, Alyanak B, Beka H, Ağaçfidan A. The relation between serum *Toxoplasma gondii* IgG antibody in children and ADHD and its severity. Psychiatry and Clinical Psychopharmacology, 2018. 29 (3), 326–331. https://doi.org/10.1080/24750573.2018.1449184.
20. Akaltun İ, Kara SS, Kara T. . Akaltun, İ., Kara, S. S., & Kara, T. (2017). The relationship between *Toxoplasma gondii* IgG antibodies and generalized anxiety disorder and obsessive-compulsive disorder in children and adolescents: a new approach. Nordic Journal of Psychiatry. 2017. 72 (1), 57–62.

KEY WORDS: *Toxoplasma gondii*; neurocognitive impairment; seroepidemiology.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ASSOCIATION BETWEEN THE POLYMORPHISM (RS1758566) OF *IFNA1* GENE AND CRITICAL CASES OF COVID-19

Matheus Braga[1]; Mariana Akemi Sonoda Shiga[2]; Sergio Grava[1]; Joana Maira Valentini Zacarias[3]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[4]

[1]Postgraduate Student(Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[2]Biomedicine Undergraduate Student, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[3]Professor, Faculdade de Medicina de Marília, Marília, SP

[4]Professor, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: matheus.bragga@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is a novel coronavirus that is responsible for the 2019–2020 pandemic of Coronavirus disease 2019 (Covid-19)(1).The pathogenesis of Covid-19 occurs when SARS-CoV-2 binds to airway epithelial cells, begins to replicate, and invades the alveolar epithelial cells of the lungs (2). Rapid replication of SARS-CoV-2 in the lungs triggers a strong immune response, leading to hypoxemia and bilateral pulmonary edema due to alveolar capillary hyperpermeability, a condition known as acute respiratory distress syndrome (ARDS) (3).

Although most patients experience mild to moderate disease, 5 to 10% progress to severe or critical disease, including pneumonia and acute respiratory failure (2). Exacerbations of Covid-19 were primarily due to severely impaired type I interferon (IFN-I) responses, accompanied by persistent viral loads and increased levels of inflammation in the blood (4).The IFN-I is essential for effective protection against viral infection. IFN-I-induced signaling converges on transcription factors that rapidly induce the expression of hundreds of genes, termed interferon-stimulated genes (ISGs) that have diverse functions ranging from direct inhibition of viral replication to recruitment and activation of various immune cells (5)

Reported rates of hospitalization, mechanical ventilation, and mortality vary significantly due to several variables including patient age, cardiovascular disease, diabetes and obesity (6,7), however clinical outcomes of Covid-19 have shown huge inter-individual and inter-population differences, possibly due to host genetic differences (8). Genetic defects in loci involved in TLR3- and IRF7-dependent type I interferon induction and amplification were found in at least 3.5% of patients with life-threatening Covid-19 pneumonia. This finding demonstrates the essential role of the double-stranded RNA sensor TLR3 and type I interferons in controlling cell-intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection (9).

Among the genes that code for IFN-I, *IFNA1* stands out as one of the most extensively researched. Like other type I interferons, interferon-alpha1 binds to a plasma membrane receptor composed of IFNAR1 and IFNAR2, which is expressed throughout the body, allowing it to influence nearly all cell types (10). To explore the effects of a variation in the *IFNA1* gene, our aim was to examine the potential link between a single nucleotide polymorphism (SNP) in this gene, specifically located in the 5' Prime untranslated region (rs1758566), where thymine is substituted by cytosine (T>C), and the severity of Covid-19 in Southern Brazil.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study population

A cross-sectional study was conducted in patients diagnosed with Covid-19 using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). A total of 237 unvaccinated patients were selected for the study from the University Hospital (HU) of Londrina State University (UEL) and the Paraná Hospital in Maringá, including 117 severe patients and 120 critical patients in the period from March 2020 to April 2021.

Severe Covid-19 was defined as: room air oxygen saturation < 90% or signs of pneumonia or severe respiratory distress syndrome, while critical Covid-19 was defined as: acute respiratory distress syndrome (ARDS) and other conditions that often require life-supportive treatment, such as the need for mechanical ventilation (invasive or non-invasive), according to the World Health Organization (WHO) (11).

This study was approved by the Standing Ethics Committee of the State University of Maringá, approval number CAAE 38095420.5.0000.0104, and by the Standing Ethics Committee of the State University of Londrina, approval number CAAE 31656420.0.0000.5231. All participants signed a free informed consent form (TCLE).

2.2. Sample collection and DNA extraction

After admission of the patients, peripheral blood samples were collected inethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulated tubes and sent to the Laboratório de Imunogenética - UEM (LIG-UEM). Genomic DNA was extracted from whole blood cells using the BIOPUR® DNA extraction kit (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brazil) according to the manufacturer's recommendations and the concentration of the obtained material was determined by optical density using a Nanodrop 2000® device (Wilmington, USA).

2.3. Determination of rs1800795 polymorphism

The extracted genomic DNA was used to determine the genotype by real-time polymerase chain reaction (qPCR) using predesigned TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) containing primers and fluorescently labeled (VIC and FAM) MGBTM probes for allele detection and TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) containing Dual-Lock™ Taq DNA polymerase, thermolabile uracil DNA glycosylase (UNG), dNTPs containing dUTP, passive reference dye (ROX™), and optimized buffer components.

The protocol was to a final volume of 5µL of the reaction mixture containing around 20 ηg of template DNA, 1X TaqManGenotyping Assays and 1X TaqPath™ ProAmp™ Master Mix. The conditions for the reaction were as follows: 30 s of pre-read at 60°C, 10 min of initial denaturation at 95°C, 50 cycles of 15 s of denaturation at 92°C, 50 cycles of 1 min of primer hybridization and elongation at 60°C as well as 30s of final elongation at 60°C. StepOne™ Software v2.3 was used to visualize and analyze the amplified products.

2.4. Statistical analysis

Genetic statistical analysis and Hardy-Weinberg equilibrium (HW) were assessed using the software SNPStats (available at: https://www.snpstats.net/start.htm) (12), which was also used to determine odds ratio balance by χ2 test and logistic regression with 95% confidence intervals (CI). Statistical analysis of patient characteristics was performed by χ2 test and t test using R software with Stats package.

3. RESULTS

The patient characteristics are shown in Table 1. There was a statistical difference in the mean age of the patients, which was higher in the critically ill patients, and there was also a difference between the sexes, with a higher proportion of males in the critically ill group. Among the comorbidities, obesity showed an association trend (P = 0.06) and was more common in the critically ill cases. Therefore, it was included in the logistic regression along with sex and age to avoid possible confounding factors.

Table 1. Characteristics of patients with severe and critical Covid-19

Characteristics	Severe – N = 117	Critical – N = 120	P value
Age	56.86±16.03[a]	61.20±17.33[a]	**0.04**[c]
Sex - Fem/Masc	62(0.53)/55(0.47)	44(0.37)/76(0.63)	**0.01**[b]
Smoking	16 (0.14)	23 (0.19)	0.33[b]
CVDs	49 (0.42)	61 (0.51)	0.21[b]
Diabetes	23 (0.20)	32 (0.27)	0.26[b]
Obesity	41 (0.35)	57 (0.48)	**0.06**[b]
ARDS	-	109 (0.91)	-
Death	-	46 (0.38)	-

N: number of patients; CVDs: cardiovascular disease; ARDS;acute respiratory distress syndrome; ( ): frequency in percentage; [a]Mean ± standard deviation, [b]Statistical analysis was performed byχ2- test, [c]Statistical analysis was performed by T test.

The frequency distribution of rs1758566 genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium (P> 0.05). In the Dominate model, there was an association between *IFNA1* polymorphism and Covid-19 severity, with the T/C+C/C genotype having a twofold risk of critical cases, regardless of sex, age, and obesity. The dominant model was also shown to be the best genetic model according to the Akaike criterion (AIC) (codominant = 320.4, dominant = 318.5, recessive = 323.2), as it was the model with the lowest Akaike information value, which corresponds to minimizing the expected entropy. As for the alleles, the C allele also showed a double risk of critical cases, regardless of sex, age, and obesity (Table 2).

Table 2. *IFNA1* association with Critical Covid-19 (adjusted by Sex+Age+Obesity)

Model	Genotype	Severe – N = 117	Critical – N = 120	OR (95% CI)	P value
Codominant	T/T	98 (0.84)	89 (0.74)	1.00	
	T/C	18 (0.15)	30 (0.25)	**2.10 (1.07-4.13)**	0.08[a]
	C/C	1 (0.01)	1 (0.01)	1.97 (0.11-36.77)	
Dominant	T/T	98 (0.84)	89 (0.74)	1.00	**0.02[a]**
	T/C+C/C	19 (0.16)	31 (0.26)	**2.09 (1.08-4.08)**	
Recessive	T/T+T/C	116 (0.99)	119 (0.99)	1.00	0.74[a]
	C/C	1 (0.01)	1 (0.01)	1.63 (0.09-29.98)	
Allele	T	214 (0.91)	208 (0.87)	1.00	**0.03[a]**
	C	20 (0.09)	32 (0.13)	**1.97 (1.05-3.70)**	

N: number of patients;( ): frequency in percentage; OR, odds ratio; CI, confidence interval;[a]Statistical analysis was performed by χ2-test with logistic regression.

4. DISCUSSION

Our results showed an association between the rs1758566 polymorphism of *IFNA1* gene and the severity of Covid-19. The presence of the C allele was shown to be a risk factor for the critical course of Covid-19. These results are consistent with our recently published study, in which the presence of the C allele was also shown to be a risk factor for the critical course of Covid-19 (13). Here, we increased the number of patients in the study and maintained the association, thus confirming the association between the polymorphism and Covid-19 severity.Our study is not the only one to find a link between this polymorphism and Covid-19. A yet-to-be-published Spanish study (available as a preprint on Research Square) also found an association between the C allele and severe cases of Covid-19 (14).To our knowledge, only three other studies have examined the effect of this polymorphism: two studies on lymphoma (15,16) and one study on the response to combined interferon-α and ribavirin therapy in chronic infection with hepatitis C virus (HCV) (17). None of these studies found any association.

Indeed, low INF-α levels appear to correlate with viral persistence and precede clinical deterioration and intensive care unit transfer (4). One study using a single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq) dataset found that patients with severe disease had fewer cells expressing IFNA1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) compared with patients with mild disease (18). Another study found that IFNA1 expression levels in blood samples from the severe/critical disease group were significantly lower than those in the mild/moderate disease group (19).The SNP rs1758566is a 5' Primeuntranslated (UTR) variant where thymine is substituted by cytosine (T>C) in *IFNA1* gene located in chromosome 9p21.3 (20). The 5' UTR refers to the untranslated DNA sequences located upstream of a gene's translation start codon (ATG). While these sequences cannot be translated into amino acids, they play a crucial role as regulatory elements, influencing gene expression levels through either direct or indirect mechanisms (21).Our hypothesis is that the rs1758566 polymorphism could alter the production of INF-α,and thus predict the severity of Covid-19 due to persistent viral load. However, to confirm this hypothesis we need to measure the INF-α levels. Therefore, future studies on cytokine dosing are needed to evaluate the impact of this polymorphism on the immune response to Covid-19.

5. CONCLUSION

We can conclude that the T/C+C/C genotype of *IFNA1* polymorphism (rs1758566) in the dominant model is a risk factor for critical Covid-19, regardless of sex, age and obesity, as well as the C allele.

FUNDING

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Laboratório de Imunogenética [Proc.n.1589/2017-CSD-UEM].

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients for their valuable participation in this study, and the Programa de Pós Graduação em Biociências e Fisiopatologia - Universidade Estadual de Maringá (UEM).

REFERENCES

1. Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Postgrad Med J. 2020;96(1142):753-758.
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [published correction appears in Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):496. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30252-X]. Lancet. 2020;395(10223):497-506.
3. Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome. Lancet. 2021;398(10300):622-637.
4. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N,et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. Science. 2020;369(6504):718-724.
5. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol. 2014;32:513-545.
6. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z,et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [published correction appears in Lancet. 2020 Mar 28;395(10229):1038. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30606-1] [published correction appears in Lancet. 2020 Mar 28;395(10229):1038. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30638-3]. Lancet. 2020;395(10229):1054-1062.
7. Anderson MR, Geleris J, Anderson DR, Zucker J, Nobel YR, Freedberg D,et al. Body Mass Index and Risk for Intubation or Death in SARS-CoV-2 Infection: A Retrospective Cohort Study. Ann Intern Med. 2020;173(10):782-790.
8. Smatti MK, Al-Sarraj YA, Albagha O, Yassine HM. Host Genetic Variants Potentially Associated With SARS-CoV-2: A Multi-Population Analysis. Front Genet. 2020;11:578523.
9. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. Science. 2020;370(6515):eabd4570.
10. IFNA1 interferon alpha 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. www.ncbi.nlm.nih.gov. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3439
11. Agarwal A, Hunt B, Stegemann M, Rochwerg B, Lamontagne F, Siemieniuk RA, et al. A living WHO guideline on drugs for covid-19 [published correction appears in BMJ. 2022 Apr 25;377:o1045. BMJ. 2020;370:m3379.
12. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics. 2006;22(15):1928-1929.
13. Braga M, Shiga MAS, Silva PES, Yamanaka AHU, Souza VH, Grava S,et al. Association between polymorphisms in TLR3, TICAM1 and IFNA1 genes and covid-19 severity in Southern Brazil. Expert Rev Mol Diagn. 2024;24(6):525-531.
14. Zulueta M, Josu Aurrekoetxea, Mendizabal L, Gaztambide S, Maddi Arregi, Ana Belén Hoz, et al. Severe COVID-19 in the Basque Country, Spain: Risk Prediction Model with Genetic and Clinical Factors. Research Square (Research Square). 2022.
15. Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W,Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. Blood. 2007;109(12):5439-5446.
16. Habermann TM, Wang SS, Maurer MJ, Morton LM, Lynch CF, Ansell SM,et al. Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. Blood. 2008;112(7):2694-2702.
17. Welzel TM, Morgan TR, Bonkovsky HL, Naishadham D, Pfeiffer RM, Wright EC,et al. Variants in interferon-alpha pathway genes and response to pegylated interferon-Alpha2a plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus infection in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. Hepatology. 2009;49(6):1847-1858.
18. Wu D, Yang XO. Dysregulation of Pulmonary Responses in Severe COVID-19. Viruses. 2021;13(6):957.
19. Li S, Duan X, Li Y, Li M, Gao Y, Li T, et al. Differentially expressed immune response genes in COVID-19 patients based on disease severity. Aging (Albany NY). 2021;13(7):9265-9276.
20. rs1758566 [Internet]. Nih.gov. 2022 [cited 2024 Sep 11]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1758566
21. Wang GJ, Yang P, Xie HG. Gene variants in noncoding regions and their possible consequences. Pharmacogenomics. 2006;7(2):203-209.

keywords: coronavirus; interferon-alpha; polymorphism.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

DESAFIOS NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

Matheus Cordeiro Marchiotti[1]; Camila Lourenço da Silva;[2] Heloisa Moreira Dias Pereira[3]; Josy Anne Silva[4]; Cecília Saori Mitsugui[5]; Maria Cristina Bronharo Tognim[6]

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

[2] Acadêmica de Graduação em Medicina e farmácia, Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

[4] Servidora do Hospital Universitário de Maringá, Maringá, PR

[5] Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

Email:matheus.c.marchiotti@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii (A. baumannii) é um cocobacilo que possui habilidade de acumular diversos mecanismos de resistência, levando ao surgimento de isolados resistentes a todas as classes de antimicrobianos disponíveis (1). A epidemiologia das infecções por *A. baumannii* é ampla, associada aos trópicos, guerras e desastres naturais. Seu habitat natural é a água e o solo. Outros reservatórios incluem animais de estimação, artrópodes e animais de produção alimentar (2-3). Um estudo global de 2016 reportado no Estados Unidos da América demonstrou que as infecções por *A. baumannii* correspondem a 12,8% das pneumonias associadas à ventilação mecânica, aproximadamente 9% de infecção da corrente sanguínea associado ao cateter central e 1,3% a afecções que acometem o sítio cirúrgico e infecção do trato urinário relacionado a sonda vesical de demora(4). Em humanos essa bactéria coloniza a pele, feridas, trato respiratório inferior e trato gastrointestinal(5). Algumas cepas de *A. baumannii* sobrevivem por semanas no meio ambiente por dessecação. De acordo com um estudo publicado em 2021, cepas de *A. baumannii* sobreviveram mais de 113 dias em fômites, característica importante que promove transmissão intra hospitalar(6-7). *A. baumannii* é um dos patógenos apelidados pelo mnemônico ESCAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Clostridiodes difficile, A. baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobactérias*) de importância clínica associado às infecções relacionadas à saúde(8). Devido a esse fato, *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos é um dos patógenos críticos prioritários designados pela Organização Mundial da Saúde, para o desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas(9).

A crescente resistência global de *A. baumannii* aos carbapenêmicos ao longo dos anos (cerca de 10% das cepas em meados de 2009(10), para 57% entre 2016 e 2018)(11), mostra a grande necessidade de descobrir e/ou padronizar as opções de tratamento mais eficazes. De acordo com um estudo de Vianna et al., de 2011, a evolução de resistência ao *A. baumannii* em um hospital Universitário saltou de 2% no período compreendido entre 1994 e 1996 para 73% entre 2006 e 2007(12).O manejo para tratamento de *Acinetobacter* resistente aos carbapenêmicos (CRAB) é difícil por diversas razões. Geralmente há resistência de diversos antimicrobianos, principalmente aos beta-lactâmicos, através da produção de OXA carbapenemases (OXA-24/40, OXA-23). Algumas cepas produzem metalo-betalactamases em adição às serino-carbapenemases. O mecanismo de resistência ao sulbactan não é totalmente compreendido, mas parece estar ligado à mutação de proteínas ligadoras de penicilina, já a mutação na enzima *16S RNA* confere resistência aos aminoglicosídeos(13). Com o advento da resistência antimicrobiana do *A. baumannii* e poucas drogas novas disponibilizadas como o cefiderecol e o sulbactan associado ao durlobactan com resistência já documentada(14-15), a associação de múltiplos fármacos se tornou necessária(13), aumentando os riscos de efeitos colaterais e os custos do tratamento antimicrobiano.

Os *guidelines* atuais como o *Sanford guide* e o guia da *infectious diseases society of america* (IDSA), recomendam tratamento com múltiplas drogas para *Acinetobacter* resistente à carbapenêmicos. Entre os principais fármacos, estão carbapenêmicos, sendo o seu representante principal o meropenem associado a uma ou duas drogas à partir do teste de sensibilidade antimicrobiano (TSA)(13-14). Geralmente as associações com meropenem são Ampicilina+Sulbactan e/ou Polimixina B. Outra opção terapêutica já descrita nos *guidelines*, mas de alto custo, é a administração de Cefiderocol(15). Esta Droga é utilizada para tratamento de pneumonia ou infecção de trato urinário para bactérias Gram negativas com múltiplos mecanismos de resistência(12).

Verifica-se então que devido dificuldade de tratamento do *A. baumannii,* o uso de drogas altamente tóxicas e a necessidade de múltiplas associações, são necessárias para conseguir o sinergismo e o sucesso na terapêutica. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os diferentes tratamentos utilizados em pacientes acometidos por infecção por *A. baumannii,* detectados em amostras clínicas, no período pandêmico de covid-19, já que este foi o aumento significativo de culturas positivas para *A. baumannii*, a partir de agosto de dois mil e vinte até trinta e um de dezembro de dois mil e vinte e um, totalizando 517 dias, data esta decretada pelo Ministério da Saúde do Brasil como fim da emergência de covid-19.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Estudo transversal retrospectivo, através de análise de prontuário dos pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá, contemplando o período pandêmico de covid-19, de agosto de 2020 a dezembro de 2021, totalizando 512 dias. A pesquisa vigente se baseia na utilização do sistema GSUS no qual utilizou dados dos pacientes que estiveram internados no hospital neste período para análise.

O critério de inclusão foi a presença de infecção pelo *A. baumannii* em amostra clínica (urina, sangue, secreção traqueal e tecidos); os casos foram excluídos se houve outro agente etiológico no período de 7 dias antes ou após a cultura positiva para *A. baumannii*.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética: projeto de pesquisa intitulado "Estratégias para a redução de custos hospitalares e otimização do uso de antimicrobianos: rápida detecção de genes de resistência, sinergismo e análise farmacocinética/farmacodinâmica - fase 2" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, conforme parecer nº 4.808.018. A aprovação foi concedida em 25/06/2021, e o protocolo está registrado sob o número CAAE 47908021.9.0000.0104.

3. RESULTADOS

Foram analisadas 178 amostras, com isolados de *A. baumannii* pan resistente (definido como resitente à todas as classes testadas no antibiograma), de 123 pacientes diferentes. Desses pacientes, 76 eram do sexo masculino e 47 do sexo feminino. Os isolados s amostras eram de sangue (10 hemoculturas) foram positivas para o patógeno estudado (6 em homens e 4 em mulheres), 3 culturas de tecidos (2 em homens e 1 em mulher), 68 de secreções traqueais em homens e 41 em mulheres, e apenas 1 urocultura positiva em uma paciente do sexo feminino.

Quando consideradas apenas as culturas positivas para *A. baumannii* sem outro agente patológico no período de uma semana antes ou depois da positividade para esse patógeno, totalizou-se 36, aproximadamente 79% foi considerada pneumonia associada à ventilação mecânica. A partir dessas culturas, avaliou-se os tratamentos utilizados nos pacientes.

Dos pacientes analisados, 6 pertenciam ao grupo considerado como colonizado e, por isso, não receberam tratamento. Já os outros 30 foram considerados casos de infecção. Desses pacientes, 32,26% (10 dos 31) evoluíram a óbito. O óbito foi associado a presença de *A. baumannii* se o paciente faleceu até o 14º dia após o término do tratamento antimicrobiano. No total, foram avaliadas seis terapias antimicrobianas diferentes. A linha do tempo ilustra o curso do tratamento de infecções por *A. baumannii* em pacientes internados na UTI entre setembro de 2020 e setembro de 2021.

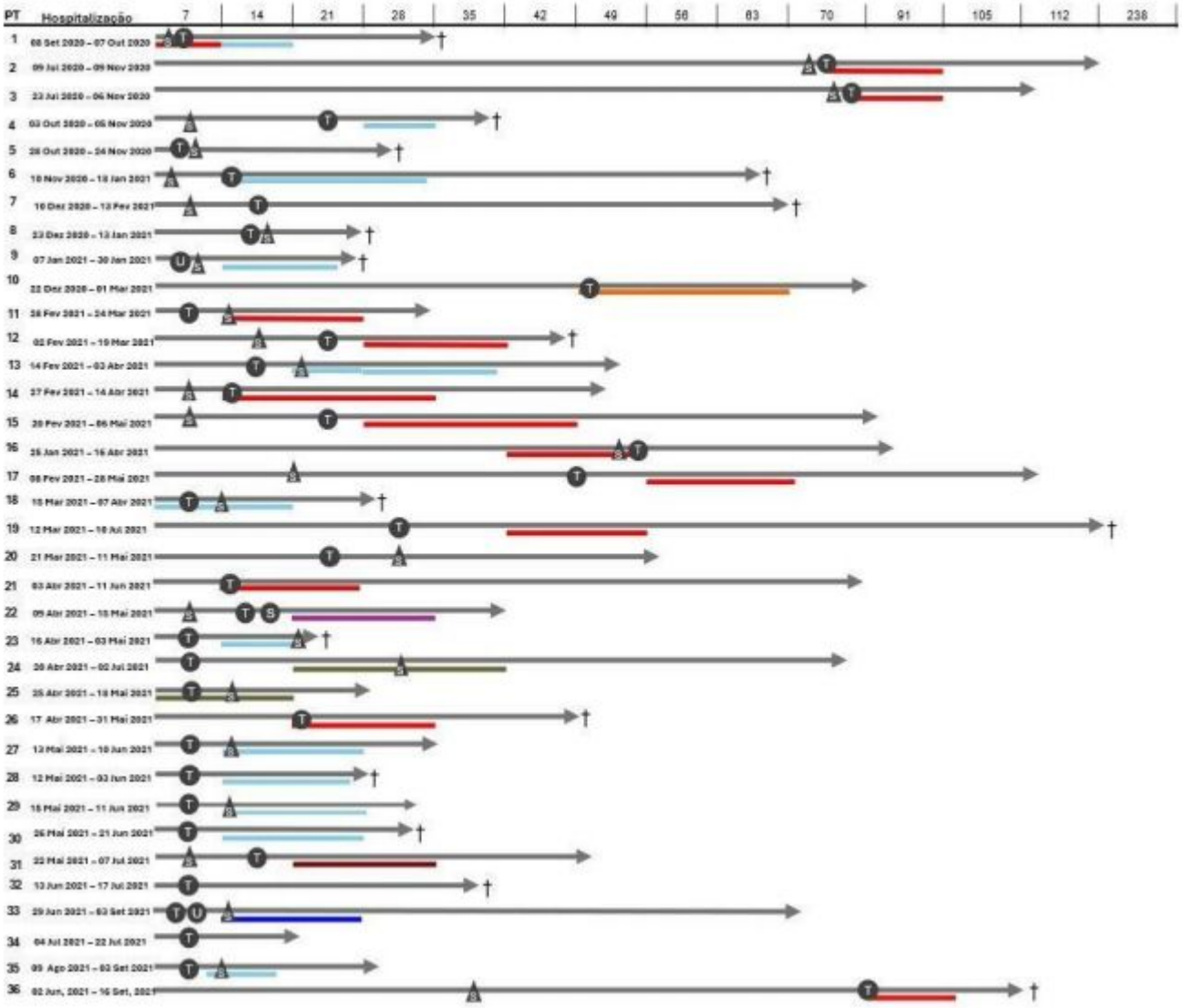


Figura.1 Linha do tempo do tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii* em pacientes críticos na UTI durante a pandemia de SARS-CoV-2 .

Vermelho: Polimixina B; Azul claro: Meropenem + Polimixina B; Laranja: Meropenem + Levofloxacino; Roxo: Polimixina B + Ampicilina/Sulbactam; Verde Musgo: Meropenem + Amicacina; Azul turquesa: Meropenem + Polimixina B + Ampicilina/Sulbactam
colonização pelo *A. baumanni* representada pelo▲triângulo , contem um S que representa coleta de swab
infecção pel●Círculo a letra dentro do círculo representa: U= urina; T = secreção orotraqueal; B= sangue
óbito do paciente pela cruz †

4. DISCUSSÃO

A. baumannii tornou-se um dos principais patógenos em infecções relacionadas à assistência à saúde[16] devido à sua ampla capacidade de desenvolver resistência a múltiplos antibióticos. Esse microrganismo possui vários mecanismos de resistência que incluem a produção de betalactamases, abrangendo todas as classes moleculares da classificação de Ambler[17], como serino-betalactamases, metalo-betalactamases, cefalosporinases e oxacilinases, frequentemente observadas em cepas resistentes a beta-lactâmicos. Outro mecanismo importante são os sistemas de bomba de efluxo, associados à resistência a tigeciclina e imipenem, já a alteração da permeabilidade da membrana dificulta a ação de fármacos como aztreonam e cloranfenicol. Esses mecanismos são amplamente descritos na literatura e reforçam a complexidade do tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes de *A. baumannii*.

Além disso, a modificação dos sítios de ligação antibióticos, responsável pela resistência às quinolonas, destaca a adaptabilidade desse patógeno em diferentes contextos clínicos. Os resultados obtidos em nossa pesquisa complementam esses achados, ao demonstrar que cepas resistentes a carbapenêmicos(18) possuem altas taxas de mortalidade, como já observado em outros estudos(19).

Em relação às terapêuticas analisadas, foram utilizadas seis diferentes terapêuticas, o que demonstra a complexidade do tratamento para o *A. baumanni*. A maior prevalência foi utilizado a polimixina em monoterapia ou a sua associação, sendo essa uma droga chave no tratamento de infecções por *A. baumannii*, a primeira teve uma taxa de sobrevivência em 14 dias pós tratamento de 83,3%, já a segunda a terapia dupla de 45,4%. Esses dados podem ser explicados devido a dificuldade em sinergismo por interação medicamentosa em paciente críticos, o estado clínico relativo desses pacientes, pois os pacientes que utilizaram apenas a polimixina apresentaram um APACHE II médio de 20 pontos e a combinação com meropenem de 24 pontos.

A diferença nas taxas de infecção associada à ventilação mecânica observada em nosso estudo (79,76%) em comparação com o estudo de Bartal et al. (55%) pode ser atribuída ao impacto da pandemia de covid-19, que resultou em um aumento significativo na utilização de ventiladores mecânicos e, consequentemente, nas infecções associadas. A escolha de ampicilina + sulbactam, que atua inibindo as proteína ligadfora de penicilina 1 e 3, foi respaldada por suas propriedades únicas em comparação com outros inibidores de beta-lactâmicos(20). No entanto, a terapia combinada, que inclui polimixina, mostrou-se superior em nossa pesquisa, refletindo a necessidade de estratégias terapêuticas robustas para combater infecções por cepas resistentes aos carbapenêmicos.

Os achados deste estudo sublinham a importância de monitorar a resistência a múltiplos antibióticos e adaptar as estratégias terapêuticas de acordo com a resistência observada. Recomenda-se a continuidade da vigilância rigorosa e a avaliação de novas abordagens terapêuticas, incluindo combinações de antibióticos e novas classes de fármacos, para melhorar o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*.

5. CONCLUSÃO

O trabalho ilustra a complexidade do tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, destacando a importância do uso consciente dos antibióticos.

Dada a gravidade e a diversidade dos mecanismos de resistência, é crucial adotar uma abordagem racional no uso dos antibióticos. É fundamental explorar novas combinações de fármacos e avaliar continuamente a eficácia dessas associações para otimizar o tratamento, reduzir as taxas de mortalidade e melhorar a sobrevida dos pacientes. A pesquisa contínua é essencial para enfrentar os desafios apresentados por *A. baumannii* e aprimorar os resultados clínicos.

REFERÊNCIAS

1.Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, Quinn JP. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2941.

2. Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH, Lo KF, Ho PL. Fulminant community-acquired Acinetobacter baumannii pneumonia as a distinct clinical syndrome. Chest. 2006 Jan;129(1):102-9. doi: 10.1378/chest.129.1.102. PMID: 16424419.

3. Berg DE, Hershow RC, Ramirez CA, Weinstein RA. Control of nosocomial infections in an intensive care unit in Guatemala City. Clin Infect Dis. 1995;21:588.

4. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. Infect Control Hosp Epidemiol. 2016;37(11):1288.

5. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Clin Microbiol. 1997;35:1394.

6.Bernards AT, Harinck HI, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, van den Broek PJ. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004 Nov;25(11):1002-4. doi: 10.1086/502335. PMID: 15566039.

7.Uber AP, Viana GF, Lodi FG, Dos Anjos Szczerepa MM, Carrara-Marroni FE, Gimenes F, Nishiyama SAB, Tognim MCB. Adherence ability and serum resistance of different hospital clusters of Acinetobacter baumannii. Lett Appl Microbiol. 2021 Aug;73(2):132-8. doi: 10.1111/lam.13484. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33844321.

8. De Rosa FG, Corcione S, Pagani N, Di Perri G. From ESKAPE to ESCAPE, from KPC to CCC. Clin Infect Dis. 2015;60:1289.

9 Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018 Mar;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29276051.10. Rhomberg PR, Jones RN. Contemporary activity of meropenem and comparator broad-spectrum agents: MYSTIC program report from the United States component (2005). Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57:207.

11. Seifert H, Blondeau J, Lucaßen K, Utt EA. Global update on the in vitro activity of tigecycline and comparators against isolates of *Acinetobacter baumannii* and rates of resistant phenotypes (2016-2018). J Glob Antimicrob Resist. 2022;31:82.

12. Viana GF, dos Santos Saalfeld SM, Garcia LB, Cardoso CL, Pelisson M, Tognim MC. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. Lett Appl *Microbiol*. 2011;53(3):374-8.

13. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Antimicrobial-Resistant Treatment Guidance: Gram-Negative Bacterial Infections. *Infectious Diseases Society of America*. 2024; Version 3.0. Available at: https://www.idsociety.org/practice-guideline/amr-guidance/. Accessed 08/09/2024.

14. Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA, Willey SH. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy. Dallas, TX: Antimicrobial Therapy, Inc.; 2023.

15. McCreary EK, Heil EL, Tamma PD. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Cefiderocol. Antimicrob Agents Chemother. 2021 Jul 16;65(8):e0217120. doi: 10.1128/AAC.02171-20. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34031052; PMCID: PMC8373209.

16. Kaye KS, Shorr AF, Wunderink RG, Du B, Poirier GE, Rana K, et al. Efficacy and safety of sulbactam-durlobactam versus colistin for the treatment of patients with serious infections caused by *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex: A multicentre, randomised, active-controlled, phase 3, non-inferiority clinical trial (ATTACK). Lancet Infect Dis. 2023;23(9):1072-84.

17. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. World J Clin Cases. 2014;2(12):787-814.

18. Lemos EV, de la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda C, et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: *Systematic* review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2014;20(5):416-23.

19. Nguyen M, Joshi SG. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: A scientific review. J Appl Microbiol. 2021;131(6):2715-38.

20. Bartal C, Rolston KV, Nesher L. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Colonization, infection and current treatment options. Infect Dis Ther. 2022;11(2):507-21.

Palavras-chave: Acinetobacter baumanni; Sars-cov 2; multirresistência.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

A ASSOCIAÇÃO DE CURCUMINA LIVRE OU EM NANOEMULSÃO E METOTREXATO NO JEJUNO DE RATOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE: ANÁLISES MORFOLÓGICAS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

Melissa Cumani Aragão[1]; Karile Cristina da Costa Salomão[2]; Arthur Girardi Francalin Laureano[3]; Luciana Facco Dalmolin[4]; Janette Betzabeth Villaruel Muñoz[4]; Renata Fonseca Vianna Lopez[4]; Roberto Kenji Nakamura Cuman[5]; Nilza Cristina Buttow[6]

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

[2]Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[3]Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[4]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil

[5]Docente, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil

[6]Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil.

e-mail: posmelissacumani@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica que afeta principalmente as articulações, causando dor, inchaço e rigidez. A doença é mais comum em mulheres e afeta cerca de 1% da população mundial (1). A compreensão total da doença é um desafio, visto que o desenvolvimento da artrite é influenciado por uma combinação de diversos fatores genéticos, imunológicos e ambientais (2). Além dos sintomas articulares, a AR também pode provocar manifestações sistêmicas incluindo distúrbios cardiovasculares, pulmonares, psicológicos, cutâneos, esqueléticos e gastrointestinais (1).

Dentre as alterações que ocorrem na AR o estresse oxidativo e a inflamação apresentam papel de destaque. O primeiro ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do corpo de neutralizá-los. Esse desequilíbrio contribui para o dano tecidual nas articulações e agrava a inflamação (3). Pacientes artríticos tendem a apresentar níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), tanto nas articulações quanto no sistema circulatório, sugerindo uma conexão entre o estresse oxidativo, manutenção do processo inflamatório e progressão da doença (4).

Além disso, o intestino tem sido destacado como um órgão fundamental na modulação da AR. Alterações na composição da microbiota intestinal, ou disbiose, podem influenciar a resposta imunológica do corpo, contribuindo para o agravamento da inflamação articular (5). A hipótese da origem mucosa sugere que a AR pode começar em áreas de alteração nas mucosas, desencadeada por uma resposta imune a antígenos bacterianos, virais ou fúngicos (6). O sistema imunológico das mucosas desempenha um papel crucial, protegendo o organismo por meio de uma barreira de muco formada por mucinas, que são secretadas pelas células caliciformes. Essa barreira mantém o equilíbrio do microbioma e protege o corpo contra agentes externos. Quando essa proteção falha, o corpo pode perder a capacidade de tolerar seus próprios antígenos, levando a inflamações como a AR (7).

O metotrexato (MTX) é um dos principais medicamentos para o tratamento da AR devido a sua eficácia e baixo custo (8). Graças ao seu mecanismo, o MTX possui efeitos antiproliferativos, antimetabólicos e anti-inflamatórios e pode reduzir significativamente citocinas pró-inflamatórias por meio da modulação da infiltração de diversas células imunes como neutrófilos, células T auxiliares (Th) e linfócitos na membrana sinovial da AR(9). No entanto mesmo em doses baixas o MTX pode acarretar distúrbios hematológicos, hepáticos e principalmente gastrointestinais que limitam seu uso prolongado (10).

Em vista disso, a curcumina, um composto encontrado no rizoma de *Curcuma longa* (açafrão-da-terra), tem sido amplamente estudada por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (11). Embora seus efeitos sejam promissores, sua baixa biodisponibilidade faz com que a busca de novas tecnologias possa ser utilizada para o seu uso. Uma alternativa que tem sido sugerida é a sua forma como as nanoemulsões, que aumentam sua biodisponibilidade e potencial terapêutico (12).

Neste sentido, este estudo buscou avaliar os efeitos da curcumina em sua forma livre ou em nanoemulsão, isoladamente e em combinação com o MTX, em um modelo experimental de artrite induzida por adjuvante (AIA) em ratos *Holtzman*. Os parâmetros analisados incluíram o estresse oxidativo, a inflamação e a população celular intestinal, visando verificar se juntas ou combinadas poderiam auxiliar no tratamento da AR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais experimentais

Foram utilizados 35 ratos albinos da linhagem *Holtzman* (CEUA nº 2012070222), com 50 dias de idade, mantidos em temperatura de 22 ± 2º C e iluminação controlada com ciclo claro/escuro de 12h. Ração NUVILAB® e água foram fornecidos à vontade para os animais. Eles foram divididos em 7 grupos (n=5): controle (C); artrítico (AIA); artrítico tratado com curcumina livre (CL); artrítico tratado com nanoemulsão de curcumina (CN); artrítico tratado com MTX (M); artrítico tratado com curcumina livre e MTX (CLM) e artrítico tratado com nanoemulsão de curcumina e MTX (CNM).

2.2. Indução da artrite

A artrite foi induzida por uma injeção intradérmica de 0,1 ml de Adjuvante Completo de Freud (CFA), suspensão de 5% de *Mycobacterium tuberculosis* inativada na pata posterior esquerda dos animais.

2.3. Tratamento dos animais e eutanásia

Entre o 7º e o 30º dia, os animais foram tratados por gavagem conforme os grupos experimentais. Os grupos C e AIA receberam veículo (água) diariamente. O grupo CL foi tratado com 30 mg/kg de curcumina livre, enquanto o CN recebeu 30 mg/kg de nanoemulsão de curcumina. As nanoemulsões foram fornecidas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo. O grupo M foi tratado com 1 mg/kg de MTX uma vez por semana. Já os grupos CLM e CNM receberam 30 mg/kg de curcumina (livre ou nanoemulsão, respectivamente) diariamente, combinados com 1 mg/kg de MTX semanalmente. Ao final do experimento, os 35 animais foram eutanasiados com uma dose letal de Ketamina (210 mg/kg) e Xilazina® (30 mg/kg) por via intramuscular.

2.4. Análise dos parâmetros de estresse oxidativo

Para análise do estresse oxidativo, o intestino foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5). Parte do homogenato foi usada para quantificação de glutationa (GSH), enquanto o restante foi centrifugado a 9.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para medir a atividade enzimática de Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-s-transferase (GST) e analisado seguindo protocolos padronizados(13).

2.6. Análises histológicas

O intestino foi coletado, fixado em paraformaldeído a 4% (pH 7,4) e armazenado em etanol a 70%. Os órgãos foram processados para inclusão em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes histológicos semi-seriados com espessura de 5 µm. Para cada animal, foram preparadas três lâminas para cada técnica histológica, visando a contagem de células caliciformes secretoras de mucinas neutras através´s da coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS), sulfomucinas (Alcian Blue pH 1.0) e sialomucinas (Alcian Blue pH 2.5). As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico Olympus CX31, com objetiva de 40x, sob condições de duplo-cego. As células foram contadas manualmente, desde a base das criptas até o ápice das vilosidades, evitando-se a contagem consecutiva entre regiões. Foi calculado o índice percentual das células positivas em relação ao número total de células (2500 células).

2.7. Análises imunohistoquímicas

Secções histológicas do intestino (5 µm de espessura) foram montadas em lâminas para a análise de proliferação celular e células enteroendócrinas que secretam serotonina através da imunomarcação com anticorpo anti-Ki-67 clone: 30-9 Roche®, com diluição de 2µg/mL e anti-serotonina policlonal Sigma-Aldrich®

na diluição de 7 µg/mL respectivamente. O tecido foi submetido ao processo de desparafinização, tratamento de recuperação antigênica, incubação com painel de anticorpos monoclonais e amplificação por polímeros em processo automatizado utilizando equipamento Ventana BenchMark GX®. O kit de detecção utilizado foi UltraView (Ventana®). As contagens foram realizadas da mesma forma como descrito para as células caliciformes.

2.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism v.8.05. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos, foi realizado o teste t de Student e o resultados foram expressos como média ± erro padrão. Para dados não paramétricos, foi realizado o teste de Mann-Whitney e os resultados foram expressos em mediana ± intervalo de confiança, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05.

3. RESULTADOS

Na análise de parâmetros de estresse oxidativo, os níveis de ROS dos ratos artríticos não apresentaram diferença quando comparados com o grupo controle. No entanto, o grupo CNM apresentou aumento em comparação ao CN (p= 0,0003). Quanto aos níveis de GSH, apenas os grupos CN e CLM apresentaram aumento quando comparado ao grupo C (p=0,0069 e 0,0486). Na atividade enzimática da SOD o grupo AIA e CN apresentaram redução em relação ao C (p=0,0079 e p= 0,0006). Ademais, o grupo CN reduziu também em relação aos grupos ao grupo AIA (p=0,0135). No entanto, o grupo CNM apresentou um aumento em comparação aos grupos C, AIA e M e CNM (p=0,0003; p<0,0001; p=0,007, p<0,0001 respectivamente). No que se refere a atividade enzimática da CAT, o grupo AIA (p=0,0045), CL(p=0,0321), CN (p=0,0041) e CLM (p=0,0077) apresentaram aumento significativo quando comparado com o grupo C. Já os grupos M e CLM reduziram em relação ao AIA (p= 0,0321; p= 0,0041) O grupo CNM reduziu em relação ao CN (p= 0,0028). Quanto a atividade enzimática da GST, OS grupos CN, M e CLM tiveram redução comparado ao grupo C (p= 0,038; p=0,0004; p= 0,003, respectivamente). Assim como os grupos M e CLM apresentaram uma redução em relação ao grupo AIA (p=0,0003 e p=0,0086). Na comparação entre as monoterapias e associações, o grupo CLM expressou uma atividade enzimática inferior ao CL (p=0,0051). Contudo, o grupo CNM apresentou aumento da atividade enzimática quando comparado ao CN (p=0,0324) e ao M (p=0,0105).

Tabela 1. Análises bioquímicas de parâmetros de estresse oxidativo no jejuno de ratos submetidos a AIA.

	C	AIA	CL	CN	M	CLM	CNM
GSH*	908,4 ± 39,8	973,9 ± 73,96	956,9 ± 64,77	1096 ± 33,38[a]	958,4 ± 36,02	1094 ± 69,34[a]	923,0 ± 75,51
SOD*	1,127 ± 0,01	1,034 ± 0,01[a]	1,131 ± 0,08	0,9044 ± 0,03[abg]	1,115 ± 0,05	1,170 ± 0,02	1,332 ± 0,02[abe]
CAT*	23,05 ± 2,09	76,91 ± 13,63[a]	76,30 ± 20,46	92,24 ± 17,32	30,52 ± 9,9[b]	40,64 ± 4,52[b]	18,15 ± 1,86[bd]
GST*	27,38 ± 0,87	25,64 ± 0,32[ef]	28,77 ± 1,44	19,15 ± 3,19[a]	21,06 ± 0,67[a]	22,23 ± 0,92[ac]	29,62 ± 2,48[d]
ROS*	1789 ± 155,3	1705 ± 132,4	1843 ± 158,1	1524 ± 68,62	2050 ± 175,6	2047 ± 228,5	1967 ± 18,82[d]

GSH (Glutationa: expressa em µg GSH/g tecido); CAT e GST (Catalase e Glutationa-s-transferase: expressos em mmol/min/mg proteína); SOD (Superóxido dismutase: expressa em U SOD/mg proteína); ROS (Espécies reativas de oxigênio: expresso em intensidade de fluorescência). * *Unpaired* teste T de *Student*: os resultados expressos por média ± erro padrão. N=5. Grupos: C: controle; AIA: artrite induzida por adjuvante; CL: artrite induzida por adjuvante + curcumina livre; CN: artrite induzida por adjuvante + curcumina nanoemulsificada; M: artrite induzida por adjuvante + metotrexato; CLM: artrite induzida por adjuvante + curcumina livre + metotrexato; CNM: artrite induzida por adjuvante + curcumina nanoemulsificada + metotrexato. (a) Grupo com p<0.05 vs C; (b) Grupo com p<0.05 vs AIA; (c) Grupo com p<0.05 vs CL; (d) Grupo com p<0.05 vs CN; (e) Grupo com p<0.05 vs M; (f) Grupo com p<0.05 vs CLM; (g) Grupo com p<0.05 vs CNM.

A quantificação das células caliciformes secretoras de mucinas neutras e ácidas realizadas sob coloração diferencial para PAS, Alcian Blue pH 1.0 e Alcian Blue pH 2.5 revelaram, de acordo com a figura 1, que o índice de células caliciformes secretoras de mucinas neutras (coradas com PAS) apresentou um aumento significativo no grupo CLM em comparação ao grupo CL (p= 0,0116). O índice de células caliciformes secretoras de sialomucinas (ABpH 2.5) teve aumento significativo entre o grupo CLM em comparação com o grupo CL (p=0,0166) enquanto o grupo CNM expressou aumento significativo comparado com o grupo CN (p=0,0074). Entretanto, o índice de células caliciformes secretoras de sulfomucinas (ABpH 1.0) não apresentou alterações significativos.

Na análise imunohistoquímica de proliferação celular, o grupo CNM apresentou um índice superior aos grupos C, AIA e CN (p= 0,0009; p= 0,0001; p= 0,0075, respectivamente). O grupo M também apresentou uma elevação quando comparado ao grupo AIA (p= 0,0104). O índice de células secretoras de serotonina no jejuno apresentou aumento no grupo CLM em relação ao C (p= 0,0159) e AIA (p= 0,0317). Ainda, o grupo CNM também apontou aumento quando comparado ao C (p= 0,0079), AIA (p=0,0079), e CN (p=0,0079).

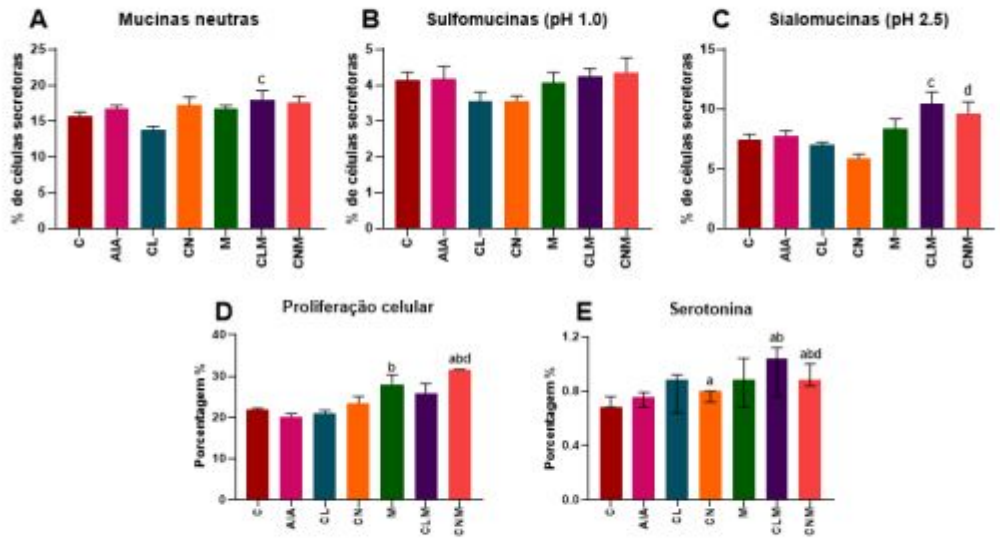


Figura 1 – Análises histológicas e imunohistoquímicas – (A) PAS; secretoras de mucinas neutras (B) Alcian Blue pH 1.0; secretoras de sulfomucinas (C) Alcian Blue pH 2.5; secretoras de sialomucinas. (D) Proliferação celular; Ki-67 (E) Serotonina. Legenda: (a) diferença estatística em relação ao grupo C; (b) diferença estatística em relação ao grupo AIA (c) diferença estatística em relação ao grupo CL; (d) diferença estatística em relação ao grupo CN.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo não houve alteração significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), no entanto os resultados indicam um desequilíbrio redox pois houveram alterações de enzimas antioxidantes endógenas como SOD e CAT. A fim de proteger os tecidos de lesões oxidativas, o corpo possui sistemas enzimáticos antioxidantes endógenos, como as enzimas SOD e CAT (15). A redução da atividade da SOD aconteceu nos grupos AIA e CN. A redução no grupo CN pode ainda ser interpretada como um sinal de que os níveis de radicais superóxidos foram controlados pela curcumina, diminuindo a necessidade dessa enzima. Por outro lado, houve aumento da CAT em todos os grupos em relação ao grupo C. Estes resultados podem indicar que o H_2O_2 pode estar sendo produzido por outras fontes alternativas como as enzimas NADPH oxidases (16). Contudo a redução da CAT nos grupos tratados com MTX podem ser devido a capacidade do MTX de eliminar diretamente os radicais livres, particularmente o superóxido (O_2•-), reduzindo a quantidade de H_2O_2 (17).

A diminuição da atividade da GST também aponta para uma menor demanda de mecanismos de detoxificação, provavelmente devido à redução geral de danos oxidativos (18). Aliado a isso, o aumento dos níveis de GSH nos grupos CN e CLM pode estar relacionado a capacidade da curcumina em estimular enzimas como a glutationa redutase (GR), que regeneram a GSH(19).

Vários fatores podem afetar a barreira protetora de muco produzida pelas células caliciformes epiteliais. Três principais tipos de células caliciformes são encontradas no intestino delgado: As células que produzem mucinas neutras (PAS+), cuja função é a proteção da superficie epitelial, absorção de nutrientes e a eliminação de produtos indesejáveis; células produtoras de Sialomucinas cuja secreção apresenta grupos terminais de ácido siálico responsáveis por sua acidez e baixa viscosidade e células produtoras de sulfomucinas de caráter também ácido com grupos sulfato em sua estrutura oferecendo maior viscosidade. Em nosso estudo as sulfomucinas não apresentaram alteração em nenhum grupo. As mucinas neutras somente o grupo CLM mostrou aumento quando comparado com o grupo CL podendo aumentar a proteção do epitélio. Já as sialomucinas tiveram aumento nos grupos de MTX com associação de Curcumina livre ou nanoemulsão comparados com as monoterapias de curcumina, demonstrando que o MTX em Associação é capaz de aumentar as células que produzem muco mais fluido, podendo deixar a barreira mais susceptível.

A proteína Ki-67 é produzida exclusivamente por células que estão em processo de divisão ativa e se encontra no núcleo, onde fica o DNA da célula(20). Alguns estudos sugerem que baixas doses de MTX (0,5 mg/kg/dia) induzem apoptose significativa nas criptas intestinais, no entanto, resultam em menor hipoproliferação. A dose utilizada em nosso estudo foi de 1 mg/Kg semanalmente, sendo a última dose administrada três dias antes da eutanásia, desta forma podemos inferir que o aumento da proliferação celular pode estar relacionado com um efeito rebote, o qual poderia não ser encontrado em um período maior após a administração do MTX. Já com doses mais altas de MTX (até 50mg/kg) levam a uma apoptose prolongada, redução da proliferação de células das criptas e danos estruturais (21).

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor importante relacionado ao estímulo das contrações peristálticas e secretórias pós-prandial (22). O aumento do índice de células produtoras de serotonina nos grupos CLM e CNM pode estar relacionado com a administração do MTX principalmente associado com a curcumina, visto que o MTX causou hiperplasia das células enteroendócrinas, o que pode afetar a motilidade e a função intestinal(23).

5. CONCLUSÃO

Apesar de não terem sido observadas mudanças expressivas nos níveis de espécies reativas de oxigênio, os dados sugerem desequilíbrio redox no intestino dos ratos com artrite. A combinação da curcumina com metotrexato mostrou alterações nas populações de células epiteliais essenciais para a barreira protetora. Pesquisas futuras serão essenciais para compreender os mecanismos que podem afetar a barreira epitelial tendo em vista seu papel como um dos fatores promotores da AR, para o desenvolvimento de estratégias para o seu tratamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório Histologia e Embriologia e ao Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá pelos recursos e estrutura para a realização desse trabalho. Agradecemos a doutora Carolina Trevisoli Palomo e a docente Rosilene Fressatti Cardoso, do Laboratório de Bacteriologia médica da UEM.

REFERÊNCIAS

1. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med [Internet]. 2011 Dec 8;365(23):2205–19. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1004965
2. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet [Internet]. 2016 Oct;388(10055):2023–38. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616301738
3. Kaur G, Sharma A, Bhatnagar A. Role of oxidative stress in pathophysiology of rheumatoid arthritis: insights into NRF2-KEAP1 signalling. Autoimmunity [Internet]. 2021 Oct 3;54(7):385–97. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08916934.2021.1963959
4. Phull AR, Nasir B, Haq I ul, Kim SJ. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. Chem Biol Interact [Internet]. 2018 Feb;281:121–36. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717305239

5. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. Nat Med [Internet]. 2015 Aug 27;21(8):895–905. Available from: https://www.nature.com/articles/nm.3914
6. Holers VM, Demoruelle MK, Kuhn KA, Buckner JH, Robinson WH, Okamoto Y, et al. Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2018 Sep 15;14(9):542–57. Available from: https://www.nature.com/articles/s41584-018-0070-0
7. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr [Internet]. 2001 Jun;73(6):1131S-1141S. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002916523066443
8. Drosos AA, Pelechas E, Kaltsonoudis E, Voulgari P V. Therapeutic Options and Cost-Effectiveness for Rheumatoid Arthritis Treatment. Curr Rheumatol Rep [Internet]. 2020 Aug 26;22(8):44. Available from: https://link.springer.com/10.1007/s11926-020-00921-8
9. Zhao Z, Hua Z, Luo X, Li Y, Yu L, Li M, et al. Application and pharmacological mechanism of methotrexate in rheumatoid arthritis. Biomed Pharmacother [Internet]. 2022 Jun;150:113074. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332222004632
10. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. Nat Rev Rheumatol [Internet]. 2020 Mar 17;16(3):145–54. Available from: https://www.nature.com/articles/s41584-020-0373-9
11. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. AAPS J [Internet]. 2013 Jan 10;15(1):195–218. Available from: http://link.springer.com/10.1208/s12248-012-9432-8
12. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]. 2015 Jan;11(1):195–206. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963414005279
13. Fabiano LC, Silva MC da, Costa KC da, Freitas PLZ de, Neves CQ, Borges SC, et al. A administração de 5-fluorouracil usando protocolo de tratamento clínico causa mucosite no íleo de ratos Wistar. Res Soc Dev [Internet]. 2020 Nov 8;9(11):e1529119661. Available from: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9661
14. McGarry T, Biniecka M, Veale DJ, Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. Free Radic Biol Med [Internet]. 2018 Sep;125:15–24. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158491830145X
15. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. Rev Bras Reumatol [Internet]. 2008 Feb;48(1). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042008000100005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
16. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. J Biol Chem [Internet]. 2012 Feb;287(7):4403–10. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820480962
17. Zimmerman MC, Clemens DL, Duryee MJ, Sarmiento C, Chiou A, Hunter CD, et al. Direct antioxidant properties of methotrexate: Inhibition of malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation and superoxide scavenging. Redox Biol [Internet]. 2017 Oct;13:588–93. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231717304974

18. Rashidi K, Korani M, Nemati H, Shahraki R, Korani S, Abbasifard M, et al. The Combined Effect of Curcumin and Crocin on the Reduction of Inflammatory Responses in Arthritic Rats. Curr Med Chem [Internet]. 2024 Aug;31(28):4562–77. Available from: https://www.eurekaselect.com/215564/article
19. Sathyabhama M, Priya Dharshini LC, Karthikeyan A, Kalaiselvi S, Min T. The Credible Role of Curcumin in Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction in Mammals. Biomolecules [Internet]. 2022 Oct 1;12(10):1405. Available from: https://www.mdpi.com/2218-273X/12/10/1405
20. Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisis N, Nicolas E, Llères D, et al. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. Elife [Internet]. 2016 Mar 7;5. Available from: https://elifesciences.org/articles/13722
21. Gibson RJ, Bowen JM, Cummins AG, Keefe DMK. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. Clin Exp Med [Internet]. 2005 Mar;4(4):188–95. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10238-004-0055-y
22. Gershon MD, Tack J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. Gastroenterology [Internet]. 2007 Jan;132(1):397–414. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850602436X
23. Machida T, Takano Y, Iizuka K, Machida M, Hirafuji M. Methotrexate causes acute hyperplasia of enterochromaffin cells containing substance P in the intestinal mucosa of rats. J Pharmacol Sci [Internet]. 2017 Mar;133(3):190–3. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1347861317300245

Palavras-chave: antioxidante; fitoterapia; adjuvante completo de Freund.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC DOSES OF PURE AND COMBINED MEROPENEM AND POLYMYXIN B ON TIME KILL AND BIOFILM FORMATION OF *Acinetobacter baumannii* MULTI-RESISTANT

Monica de Souza Ferreira de Mattos[1]; Ana Beatriz dos Santos[2]; Pedro Caua DodoricoMarostica[3]; Mariana de Oliveira Ripol[4]; Nathalie Kira Tamura[5]; Sheila Alexandra Belini Nishiyama[6]; Maria Cristina Bronharo Tognim[6]

[1]Postgraduate Student (Doctorate), Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Maringá, PR

[2]Undergraduate BiomedicineStudent, Laboratory of Medical Microbiology, State University of Maringá, Maringá, PR

[3]Undergraduate Pharmacy Student, Medical Microbiology Laboratory, State University of Maringá, Maringá, PR

[4]Undergraduate Medical Student, Medical Microbiology Laboratory, State University of Maringá, Maringá, PR

[5]Biochemist, Clinical Analysis Laboratory, Maringá Regional University Hospital, State University of Maringá

[6]Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

email: monicamattossf@gmail.com

1. INTRODUCTION

The genus *Acinetobacter* is characterized by coccobacilli short pleomorphic, Gram negative, strictly aerobic, catalase positive, oxidase negative, non-fermenters of glucose (1). Different species of *Acinetobacter* can be found in nature, soil, water, plants, animals, and effluents (2-3). While in humans, they are opportunistic pathogens, present in the microbiota of the skin, mucosa, and respiratory secretions, causing infections mainly in immunocompromised individuals (4).

Acinetobacter baumannii is the most important species, especially in the hospital environment, where it stands out for its high resistance to antimicrobials, includingcarbapenems. Carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAb) has been responsible for about 20% of cases of infections in intensive care units (ICU) and 7% of infections in patients using medical equipment. Infections include skin and soft tissue infections, urinary tract infections, meningitis, bacteremia, and pneumonia (5). CRAb can persist in the hospital environment, spread due to its tolerant to desiccation, and have the ability to resist long-term resistance on abiotic surfaces and form biofilms (6).

The ability to form biofilms has been associated with genes that promote adhesion to surfaces, as well as resistance to desiccation, increasing their persistence in the environment and, consequently, increasing the risk of infections (6-7). In biofilm, bacteria are highly organized and developing mutualism relationship, thus developing a high resistance to the external environment, which also applies to antibacterials (8). The genes*bap,csulocus,adeFGH, ompA, abal*of *A. baumannii* have been associated not only with biofilm formation, but also some appear to influence antibacterial defense, further increasing the resistance of its sessile form. Thus, this characteristic suggests a link between biofilm formation and reduced antibacterial effectiveness (9).

In addition to the virulence factors,CRAb is part of ESKAPE (Enterococcus *faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*,and *Enterobacter species*), a group of microorganisms that pose a global threat to human health and is a therapeutic challenge (10). Since 2018, before the COVID-19 pandemic until today (2024), the World Health Organization (WHO) has classified CRAb as a priority for research into new antimicrobials, as it carries resistance to several antibiotic classes (11-12). Due to the multdrug-reistant (MDR) strains of *A. baumannii,* treatment has been compromised, since antimicrobial options have been restricted. Polymyxin has become one of the drugs of choice, but it has high toxicity, in addition to the emergence of strains resistant to polymyxins and tigecyclines called XDL (Extensive Antimicrobial Resistance) (13).

In 2019,the Food and Drug Administration(FDA) approved a new cephalosporin,cefiderocol, for the treatment of urinary tract infectionsand in 2020 for pneumonia acquired in the hospital environment and through mechanical ventilation, caused by metallo -β- lactamase - producing *P. aeruginosa* as well as in CRAb (14). Furthermore, in 2023 the FDA also approved the use of Sulbactam-Durlobactamto treat the same infections as cefiderocol, but caused by antimicrobial-sensitive *A. baumannii* (15). However, The Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA), for use in Brazil, has approved none of these drugs. Therefore, an alternative would be the combination of antibacterial drugs that can be synergistic and thus enable therapeutic success.

Given the role of *A. baumannii* in severe ICU infections, it is crucial to evaluate the synergism between different therapeutic doses of meropenem (MEM) and polymyxin B (PB), as well as the impact on biofilm formation in CRAb isolates resistant to PB (CRAb-PBR).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Bacterial samples

CRAb-PMBR isolates were selected from clinical samples collected from patients admitted to the Regional University Hospital of Maringá(HUM) and characterized into different clusters through molecular typing. The identification of hospital isolates and the antimicrobial susceptibility profile were performed by automated biochemical methods BD Phoenix® (Becton and Dickinson, Sparks, USA). The study was approved by COPEP-4.808.018.

2.2. Broth microdilution technique

2.2.1. Inoculum preparation

After 18 hours of growth on Tryptic Soy Agar (TSA) plates, 3 to 5 isolated colonies of *A. baumannii* were transferred to tubes containing 3 mL of Müeller-Hinton broth (DIFCO, Becton Dickinson and Company/USA) – CMH. The bacterial suspension was homogenized, and turbidity was adjusted to approximately $1.5x10^8$ colony forming units (CFU/mL corresponding to 0.5 on the McFarland scale).

2.2.2. Test execution

After preparation of the inoculum, a 50µL aliquot was transferred to a tube containing 5 mL of cation-adjusted Müeller-Hinton broth – CMHCA. After homogenization, 50 µL were transferred to a 96-well microdilution plate containing CMHCA with different concentrations of MEM and PB antimicrobials. The plates were incubated aerobically at 35ºC for 16 to 20 hours. After this period, the plates were read to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the results were interpreted according to the sensitivity criteria for *Acinetobacter* spp. established by the Brazilian Committee for Sensitivity Testing (BrCast) (16).

2.3. Molecular typing of samples

TypingwasperformedontheseCRAb-PBR isolatesusingenterobacterialrepetitiveintergenic consensus polymerasechainreaction (ERIC-PCR). Isolateswith a similarityand DICE coefficient ≥0.93 (17) wereconsideredpartofthesame cluster.

2.4.Time-kill curve methodology

The test was performed with tubes containing 10^5 -10^7 CFU/ mL of each isolate that were placed in contact with the pure and combined antimicrobials at peak and valley concentrations of MEM and PB based on the clinical for intravenous regimens: MEM 2 g/day (peak, 40.9 mg/L; valley, 4.3 mg/L) and PB 25,000 U/kg/day (peak - 6.44 mg/L; valley - 2.4 mg/L) in CMHCA medium. At 6 h, 12 h and 24 h of exposure of the isolates to the pure drugsand their combinations,aliquots of the bacterial suspensions were removed, diluted, plated and after 24h the CFU/ mL were determined. The tests were performed in duplicate. The mean CFU count per mL was then determined at each time point and the results converted to log10 were plotted on a graph of time by the CFU/ mL count in log10. Synergism was considered positive when there was a reduction of ≥ 2 log10 of CFU/ mL in the antimicrobial combination in relation to the most active pure bacterial agent.

2.5. Detection of biofilm production with and without antibacterials

The detection of biofilm production was verified in the presence of MEM and PB and without antibiotics, at the same concentrations as the time kill curve test. The test was performed in 96-well polystyrene plates containing bacterial isolates (≅ 10^5CFU/ mL) and nutrient broth that were incubated at 35°C for 24h, 48h, and 72h. At each time point, the absorbance (580 nm) was measured after staining the biofilm with crystal violet, with a mean absorbance (µAbs) ≥ 0.1 being positive (18). The entire experiment was performed in triplicate.

3. RESULTS

CRAb-PBR isolates were recovered and typed by ERIC-PCR, resulting in five distinct clusters. The first isolate from each cluster was chosen to perform the time-kill curve and biofilm formation methodologies. Regarding the sensitivity of the isolates to PB and MEM, they presented MIC of 4, 8, 32 and ≥ 64 mg/L for PB and MIC ≥16 mg/L for MEM in all isolates.

In the biofilm test, the average absorbances at the valley and peak concentrations of the isolates is shown in Figure 1. The majority (4/5) of the isolates demonstrated high biofilm formation capacity with the average absorbance (µ Abs = 2.70 nm), with the highest formation detected in 48 h (µ Abs = 3.25 nm). All isolations except isolated Ac623 formed biofilm even at high doses of antibiotics. In this isolate (Ac623)in which biofilm formation was null in 24 h without and with low concentrations of MEM. The average determined among all times, at the MEM trough concentration, there was a reductionof 15.6% (µ Abs 2.81 to 2.38) in the biofilm formation capacity; while at the peak the reduction was 49.64% (µ Abs 2.58 to 1.30).the valley concentration of MEM, there was a 15.6% reduction (µ Abs 2.81 to 2.38) in the biofilm formation capacity, while at the peak the reduction was 49.64% (µ Abs 2.58 to 1.30). The addition of PB at the trough concentration demonstrated less reduction in biofilm production (µ Abs 2.74) when compared to MEM at the trough. Surprisingly, the higher PB concentration stimulated biofilm formation by 1% (µ Abs 2.57 to 2.58).

The time kill curvetechnique was performed in duplicate and the mean in log10 was calculated, which can be seen in Table 1. The pure valley concentrations in all isolates did not show any effective activity. However, the trough concentrations with the combination of drugs delayed growth without observing synergism. No significant activity was seen in the pure peak concentration. In the antimicrobial combination of the peak concentrations of both antimicrobials, synergism was observed in all isolates, with a reduction ≥ 2 log10 of CFU/ mL, in relation to the most effective pure drug (PB peak), with growth retardation in the first 6 hours and maintaining inactivity in the subsequent hours.

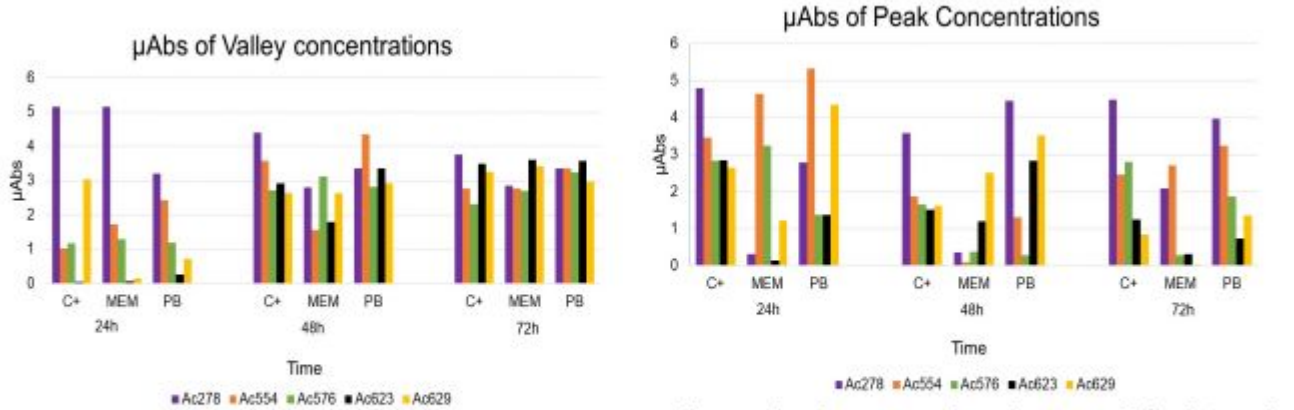


Figure 1. Average absorbance of isolates in trough and peak contraction of antibacterials at 24, 48 and72 hours

C+: Control of biofilm production of the isolate withoutantimicrobials; µAbs: average absorbance.

Table 1. Average log10 concentrations at peak and trough of isolates at times 0, 6, 12, and 24 hours

Microorganism (CRAb -PBR)	Condition From the Test	Time			
		T0h	T6h	T12h	T24h
Ac278	No antibiotics	6.34	7.37	8.09	8.04
	MEM peak	6.34	7.72	8.95	9.30
	MEM valley	6.34	7.74	7.67	9.30
	PB valley	6.34	6.45	7.17	9.20
	PB peak	6.34	6.20	8.20	9.41
	PB valley +MEM valley	6.34	6.42	6.96	9.18
	PB peak +MEM peak	6.34	1.69	1.69	1.69
Ac554	No antibiotics	5.98	7.79	8.42	8.84
	MEM peak	5.98	7.64	8.27	8.42
	MEM valley	5.98	6.76	7.19	8.95
	PB valley	5.98	6.52	6.56	7.54
	PB peak	5.98	7.18	7.28	8.72
	PB valley +MEM valley	5.98	5.99	6.87	7.97
	PB peak +MEM peak	5.98	1.69	1.69	1.69
Ac576	No antibiotics	6.42	8.25	8.88	9.38
	MEM peak	6.42	7.85	8.59	8.76
	MEM valley	6.42	6.53	6.71	9.17
	PB valley	6.42	6.79	7.78	8.66
	PB peak	6.42	7.17	7.49	9.13
	PB valley +MEM valley	6.42	6.97	7.19	8.07
	PB peak +MEM peak	6.42	3.96	1.69	1.69
Ac623	No antibiotics	6.86	8.29	9.38	9.31
	MEM peak	6.86	8.01	8.63	9.29
	MEM valley	6.86	8.90	8.37	8.47
	PB valley	6.86	5.69	6.97	7.67
	PB peak	6.86	6.23	7.10	8.84
	PB valley +MEM valley	6.86	5.95	6.55	7.85
	PB peak +MEM peak	6.86	1.69	1.69	1.69

Ac629	No antibiotics	6.37	7.79	9.18	9.72
	MEM peak	6.37	7.74	9.35	9.84
	MEM valley	6.37	5.56	7.74	9.17
	PB valley	6.37	6.55	6.85	9.04
	PB peak	6.37	6.61	7.39	8.54
	PB valley +MEM valley	6.37	4.67	6.19	8.08
	PB peak +MEM peak	6.37	1.69	1.69	1.69

4. DISCUSSION

A. baumannii is an opportunistic pathogen of extreme importance in the hospital environment, since it is associated with skin and soft tissue infections, urinary tract infections, meningitis, bacteremia, pneumonia, mainly in ICUs, and is associated with a high mortality rate (1-3). Several factors contribute to this, including its ability to survive on surfaces for long periods and form biofilms. We can also highlight its high resistance to antimicrobials, mainly carbapenems, and its difficulty in treatment, making polymyxins and carbapenems the last line of choice, with combination therapy as an alternative (6).

Our study demonstrated that synergism occurred only in the antimicrobial combination between PB and MEM at the highest concentration, that is, at the peak, while lower concentrations, whether in combination or alone, were ineffective in eliminating CRAb-PBR.There are publications in the literature where the combination between these two drugs against CRAbwas evaluated, including a guidelinefrom the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases(ESCMID) (19-20), which even discourages treatment with this combination. The data obtained in this study partially agree with these authors, since we worked with isolates resistant to both antibacterials (MEM and PB) and found that in fact at low doses (valley) there is no possibility of synergism, but at high doses there is. Thus, in view of our results, we can demonstrate that synergism is dependent on the concentration of antimicrobials, since there was only effectiveness in combating the microorganism at the peak serum concentration of the two antibiotics tested in combination.

Furthermore, the virulence factors influencing therapeutic success must also be considered and one of the factors addressed by this study was the formation of biofilm, which all isolates formed biofilm and only one of them did not form it in the first 24h. Thus, in addition to the high resistance of these CRAb-PBR isolates, we saw that they have the ability to form biofilm. The most interesting thing we reported that the different concentrations of MEM and PB did not prevent the formation of biofilm; contrariwise, high doses of PB stimulated its formation, corroborating data from the literature (21).

The data demonstrated that it is important to know which drug and its concentration are responsible for biofilm formation. High doses of them are required for them to be effective against biofilm formation. In addition, there is a need to test more combinations in biofilm formation in order to visualize the behavior of the antimicrobials tested, but mainly of PB.

5. CONCLUSION

Our results suggest that high therapeutic doses of MEM and PB, when combined, may be effective in the treatment of infections caused by CRAb-PBR. Furthermore, we can demonstrate that both MEM and PB do not interfere with biofilm formation and that the second drug, respectively, may stimulate biofilm formation, which is a concern and requires further investigation.

FUNDERS

CAPES and CNPq.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the collaborators of the Medical Microbiology Laboratory of the State University of Maringá and the Regional University Hospital of Maringá.

REFERENCES

1. Moubareck CA, Halat DH. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. Antibiot. 2020 Mar; 12;9(3):119.
2. Queiroz TM, Maciel IA, Santos FS. Resistance mechanism of the bacterium *Acinetobacter Baumannii* and its implications for infection control hospitals. Mag Braz Anal Clin. 2022;54(1):37–43.
3. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance characteristics. Saudi J Biol Sci. 2018 Mar;25(3):586–96.
4. Kornelsen V, Kumar A. Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in Acinetobacter spp. Antimicrob Agents Ch. 2021; 65(7): 10-1128.
5. Nasr P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Hosp Infect. 2020 Oct;104(1):4-11(1).
6. Lodi FG, Viana GF, Uber AP, Fedrigo NH, Farias APM, Szczerepa MMA, et al. Can the resistance profile affect the survival of Acinetobacter baumannii on hospital surfaces?. J Hosp Infect. 2019 Sep 1;103(1):e120–2.
7. Oliveira H, Domingues R, Evans B, Sutton JM, Adriaenssens EM, Turner D. Genomic Diversity of Bacteriophages Infecting the Genus Acinetobacter. Viruses. 2022 Jan; 19;14(2):181.
8. Lin MF, Lin YY, Lan CY. Characterization of biofilm production in different strains of Acinetobacter baumannii and the effects of chemical compounds on biofilm formation. PeerJ. 2020 May; 28;8:e9020.
9. Shenkutie AM, Yao MZ, Siu GK, Wong BKC, Leung PH PH. Biofilm-Induced Antibiotic Resistance in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. Antibioti. 2020 Nov; 17;9(11):817.
10. Mea HJ, Yong PVC, Wong EH EH. An overview of Acinetobacter baumannii pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. Microbiol Res. 2021 Jun;247:126722.
11. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2017. Available from: https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently -needed.
12. World Health Organization, editor. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461
13. Zheng W, Huang Y, Wu W, Zhu J, Zhang T. Analysis of Efflux Pump System and Other Drug Resistance Related Gene Mutations in Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Comput Math Method M. 2023 Feb; 17:1–12.
14. McCreary EK, Heil EL, Tamma PD. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Cefiderocol. Antimicrob Agents Chemother. 2021 May; 24(8):65.
15. Karruli A, Migliaccio A, Pournaras S, Durante- Mangoni E, Zarrilli R. Cefiderocol and Sulbactam-Durlobactam against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antibiot. 2023 Apr; 15;12(12):1729–9
16. BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Cut-off point tables, instructions and other documents.2024. [Accessed on 24 Sep 2024]. Available at: https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/
17. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of Three Molecular Typing Techniques for Nonfermentation Gram-Negative Bacilli. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004 Oct;25(10):847–51.

18. Hu Y, He L, Tao X, Meng F, Zhang J. Biofilm may not be Necessary for the Epidemic Spread of *Acinetobacter baumannii*.Sci Rep. 2016. Aug; 25(1);6.
19. Reina R, León-Moya C, Garnacho-Montero J. Treatment of *Acinetobacter baumannii* severe infections. Intensive Care Medicine. 2022 Jun;22;46(12):700–10.
20. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infected caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). Clinical Microbiology and Infection. 2022 Apr;28(4):521–47.
21. Monem S, Furmanek-Blaszk B, Łupkowska A, Kuczyńska-Wiśnik D, Stojowska-Swędrzyńska K, Laskowska E. Mechanisms Protecting *Acinetobacter baumannii* against Multiple Stresses Triggered by the Host Immune Response, Antibiotics and Outside-Host Environment. Int J Mol Sci. 2020 Jul; 31;21(15):5498.

Keywords:*Acinetobacter baumannii*; synergism; biofilm.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF IRON OXIDE NANOTUBES FOR CELLULAR APPLICATIONS

Ruan Rompato Vieira[1]; Gabriel Tolardo[2]; Fernando Rodrigues[3]; Gustavo Sanguino Dias[3]; Ivair Aparecido dos Santos[3]; Luiz Fernando Cótica[3]; Márcia Edilaine Lopes Consolaro[4]

[1]Graduate Student, Graduate Program in Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá PR
[2]Master's degree Student, Graduate Program in Physics, Maringá PR
[3]Department of Physics, State University of Maringá, Maringá PR
[4]Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá,
e-mail: rompatoruan@gmail.com

1. INTRODUCTION

Cervical cancer is an extremely deadly disease, with its incidence increasing every year. It ranks 4th in incidence among women and, sadly, is also the 4th most common cancer causing deaths1). Treatment is challenging and offers low chances of success because interventions are limited to chemotherapy and radiotherapy, both of which are extremely aggressive to the patient, and, in some cases, surgery is an option when possible. (2–7).

In response to this scenario, the search for more efficient treatments with fewer adverse effects has emerged, with the use of nanotechnology, particularly magnetic nanoparticles, as a strategy in recent years. These particles can be used as drug nanocarriers, reducing the negative and systemic effects of traditional medications. (8–12).

A strategy that has gained traction is the use of magnetic nanoparticle-induced hyperthermia. This option could become viable because tumor cells tolerate lower temperatures than non-tumor cells, and working within this range has shown promising results in some studies. (13–16).

The present study aims to evaluate the synthesis and characterize the formation of magnetic iron oxide nanotubes, as well as assess the cytotoxicity of these nanoparticles on HeLa tumor cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Synthesis of the nanotubes

The synthesis was performed hydrothermally, following the protocol by Dias, C, et al. (3), using a reactor made of stainless steel on the outside shell and Polytetrafluoroethylene (PTFE) as the inside reaction medium, a polymer capable of withstanding high temperatures and pressure. 80 mL of distilled water was added to the reactor. For the solid reagents, 0.006 g of Monobasic Sodium Phosphate (NaH_2PO_4), Sinth, 0.004 g of Anhydrous Sodium Sulfate (Na_2SO_4), Sinth, and 0.440 g of Ferric Chloride Hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), Êxodo Cientifica, was added to the reactor. The reactor containing the solution was sealed and placed in an oven, maintained at 220°C for 48 hours. After completion and cooling to room temperature, a red powder precipitated at the bottom of the reactor was obtained, which was collected and dried in an oven at 100°C.

2.2. Characterization

The morphology of the samples was evaluated using TEM (Transmission Electron Microscopy) – JEOL JEM 1400, Research Support Central Complex, COMCAP – UEM, Maringá, PR. The samples were deposited on grids containing a thin film of formvar (EMCN).

2.3. Vibrating sample magnetometer (VSM)

Magnetization measurements were carried out using a homemade Vibrating Sample Magnetometer (VSM). Using the VSM, magnetization measurements were taken as a function of the applied magnetic field

at room temperature (~300 K), which allowed us to identify the magnetic behavior of the structures. The samples (in powder form) were deposited on a support and analyzed at room temperature.

2.4. X-ray diffraction (XRD)

The XRD measurements were performed on the synthesized samples to identify the crystallinity of the structures obtained and the presence of hematite phases in the materials. The measurements were taken using a Shimadzu – XRD7000 equipment, with a copper target (Cu-Kα). The samples were dispersed on a sample holder with isopropyl alcohol, and after drying, the analyses were conducted at room temperature.

2.5. Cellular viability in tumor cell line

To evaluate cytotoxicity, a cell viability assay was performed using the MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) on HeLa cell lines. HeLa cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, then trypsinized and placed in a 96-well plate with a cell concentration of 2.5 x 10^5 cells per well. After 24 hours, the treatment was added, containing 1000 µM, 500 µM, 100 µM, 50 µM, and 10 µM of NTs, and the control group received no treatment. All treatments were repeated in triplicate. The treatment lasted for 48 hours, with the plate incubated at 37°C. After this, the wells were washed with phosphate buffer (PBS), and 50 µL of MTT was added to each well and incubated for 4 hours. After this time, the MTT was removed, and 150 µL of DMSO was added to each well, and the plate was shaken, followed by absorbance reading at 570 nm.

2.6. Statistical analysis

The statistical analyses of all assays were performed using analysis of variance (one-way ANOVA), with $\alpha = 0.05$, $p < 0.05$, and $n = 3$.

3. RESULTS

The synthesis resulted in a red powder containing iron oxide nanoparticles (hematite), which were observed through TEM analysis. As shown in Figure 1, the nanoparticles resemble tubes with a cylindrical shape, approximately 300 nm in length and 50 nm in diameter, with an observable hollow space inside, demonstrating that the synthesis was successful in forming nanostructures with the expected morphology.

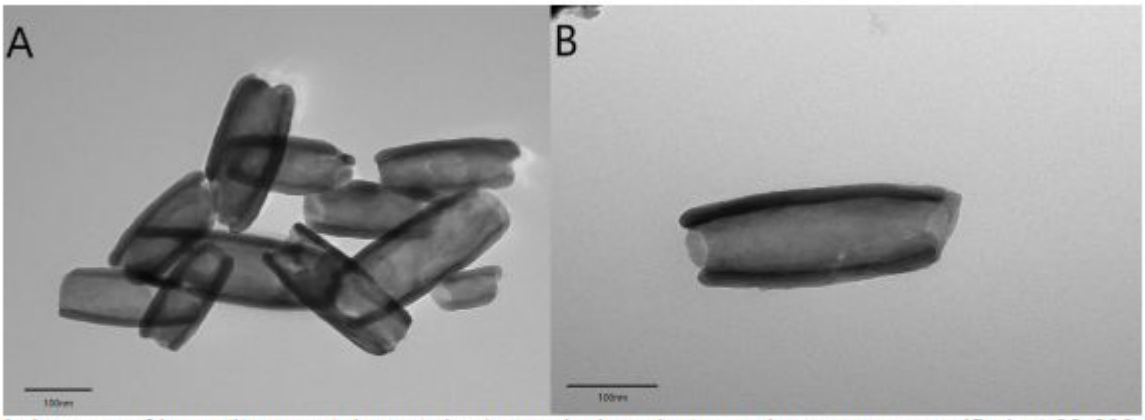


Figure 1. Images of hematite nanotubes under transmission electron microscopy, magnified at 20,000x (A) and 30,000x (B). JEOL JEM 1400, COMCAP – UEM.

The similarity between the experimentally obtained peaks and those provided in the crystallographic data file (JCPDF 00-033-0664) provides strong evidence that the material contains hematite in its structure, as well as the fact that the obtained peak widths indicate that the material's structure is crystalline.

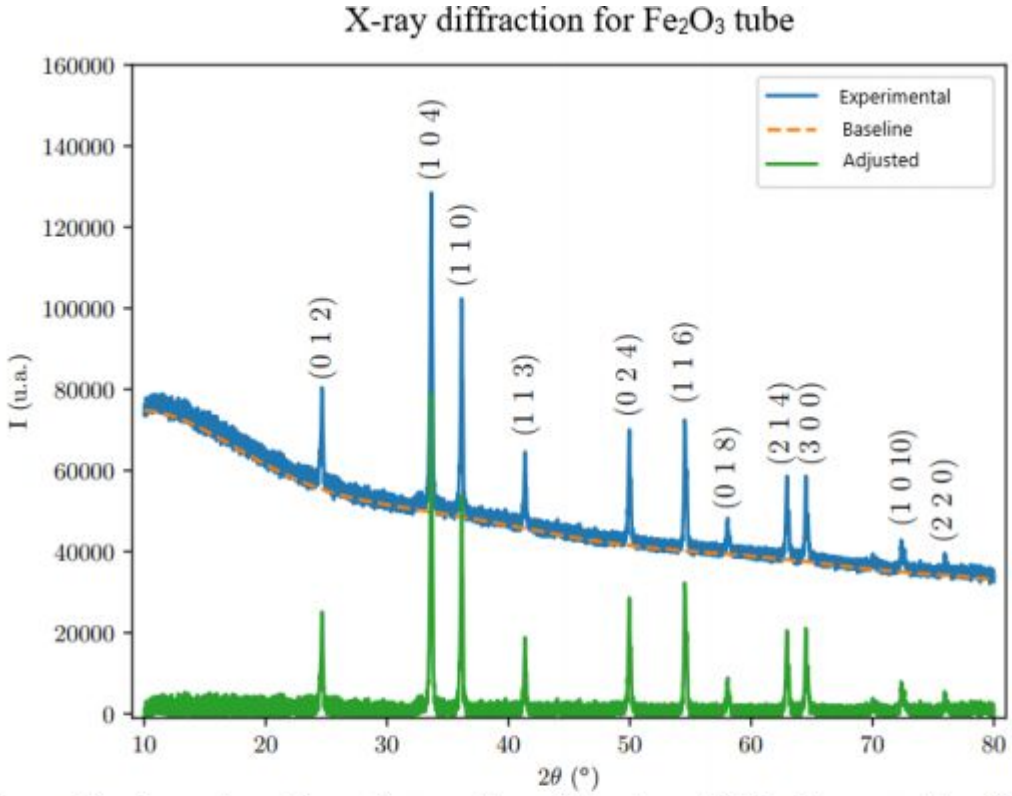


Figure 2. X-ray diffraction pattern of hematite nanotubes, Shimadzu – 7000, with copper tube (Cu-Kα), group for the development and innovation of multifunctional devices – UEM.

The magnetization curve shown in Figure 2, verified at room temperature, reveals the behavior of an antiferromagnetic structure, with a magnetization of 0.75 emu/g for a field applied at an intensity of 14 kOe. The antiferromagnetic nature prevents the achievement of saturation magnetization at 14 kOe at room temperature. Additionally, the existence of a coercive field Hc around 500 Oe and a remanent magnetization of Mr = 0.2 emu/g was observed. These results, along with the verification of a non-zero hysteresis area, reveal the existence of an amount of energy stored in the tube at the end of a hysteresis cycle, due to the small movement of the material's magnetic moments when the field was applied.

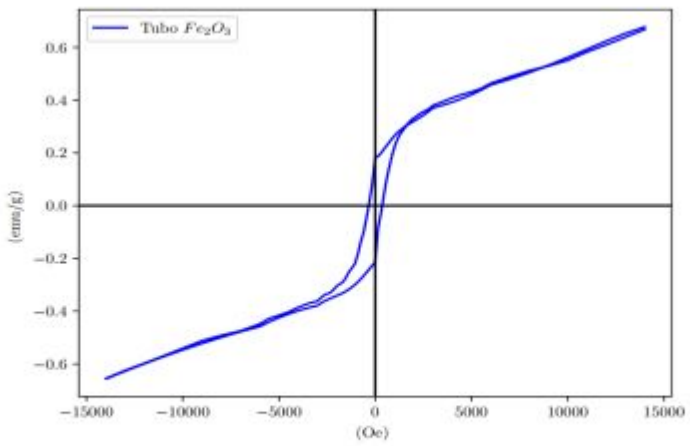


Figure 3. The magnetic hysteresis curve for the nanotubes, showing the magnetization as a function of the intensity of an applied magnetic field.

The MTT assay, conducted on HeLa tumor cells at concentrations of 1000 µM, 500 µM, 100 µM, 50 µM, and 10 µM, after 48 hours of treatment, showed no decrease in cell viability, with no statistical significance or visible reduction observed with the treatment.

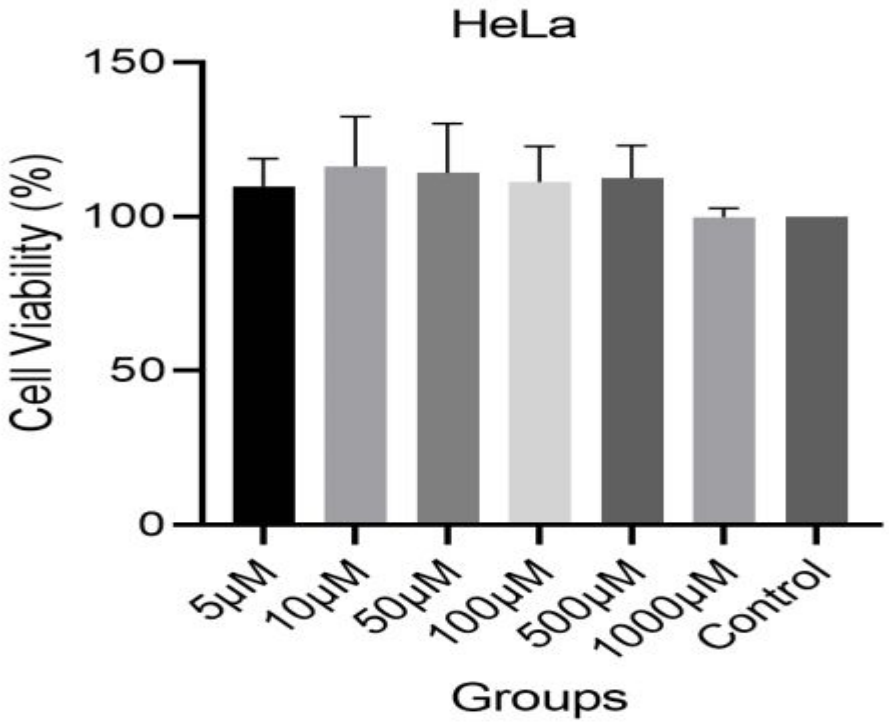


Figure 4. Cell viability of HeLa cells exposed to different concentrations of nanotubes.

4. DISCUSSION

The synthesis performed in this work resulted in the production of hematite nanotubes using the previously mentioned concentrations. However, the morphology of the nanoparticles alone is not sufficient for them to achieve the desired hyperthermic effects. According to a study that developed more than one form of nanoparticle, including nanotubes and nanorings, it was necessary to carry out a second stage in the synthesis of these structures to result in the formation of magnetite nanoparticles. This redox treatment preserves the tubular structures, but the magnetic properties change significantly.

This result can be observed with the hysteresis curve in the VSM analyses, as magnetite nanoparticles, has different magnetization than hematite nanotubes, and possess greater magnetic saturation, as observed in the work of Dias, C. (3), which makes them capable of generating much more heat and potentially more suitable for hyperthermia treatments.

The results from the X-ray diffraction analyses demonstrated consistency with what is expressed in the literature, where it is possible to observe characteristic peaks of small structures, indicating the presence of nanoparticles and iron oxide composition, suggesting the formation of hematite. This information is relevant in demonstrating the success of the synthesis in forming iron oxide nanotubes.

The cell viability analyses, after 48 hours, showed that treatment with the nanoparticles alone did not reduce cell viability, which indicates that the iron oxide nanoparticles themselves do not exhibit cytotoxic effects. This may be explained by the fact that these nanoparticles are made of iron oxide, a component present in the human body.

5. CONCLUSIONS

The hydrothermal synthesis proved to be effective in producing nanotubes, forming structures that can be used as nanocarriers, as they do not exhibit apparent cytotoxicity. However, in order to achieve their magnetic hyperthermic effects, further steps are required to promote the formation of magnetite, along with more studies to evaluate their cytotoxic effects and thermal properties.

FUNDERS

CAPES and Fundação Araucária.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank the collaborators from LabCito - UEM and the collaborators from the GDDM group - UEM. A special thanks to PBF - UEM. Finally, we express our gratitude to the funding agencies CAPES and Fundação Araucária.

REFERENCES

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024 May;74(3):229–63.

2. Talluri S, Malla RR. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for Diagnosis and Treatment of Breast, Ovarian and Cervical Cancers. Curr Drug Metab [Internet]. 2019 Oct 17 [cited 2024 Sep 24];20(12):942–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31622217/

3. Dias CSB, Hanchuk TDM, Wender H, Shigeyosi WT, Kobarg J, Rossi AL, et al. Shape Tailored Magnetic Nanorings for Intracellular Hyperthermia Cancer Therapy. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1).

4. Bortolozo Oliveira AB, de Moraes FR, Candido NM, Sampaio I, Paula AS, de Vasconcellos A, et al. Metabolic Effects of Cobalt Ferrite Nanoparticles on Cervical Carcinoma Cells and Nontumorigenic Keratinocytes. J Proteome Res. 2016 Dec;15(12):4337–48.

5. Shah K, Bhardwaj A, Bhadla D, Parekh Kinnari and Jain N. Cytotoxicity and uptake analysis of Mn-Zn ferrite-based temperature-sensitive ferrofluid on cervical and bone cancer cells. J Magn Magn Mater. 2024 Jan;589.

6. Bhardwaj A, Jain N, Parekh K. Investigating the effect of outer layer of magnetic particles on cervical cancer cells HeLa by magnetic fluid hyperthermia. Cancer Nanotechnol. 2021 Feb;12(1).

7. Fakhimikabir H, Tavakoli MB, Zarrabi A, Amouheidari A, Rahgozar S. The role of folic acid-conjugated polyglycerol coated iron oxide nanoparticles on radiosensitivity with clinical electron beam (6 MeV) on human cervical carcinoma cell line: In vitro study. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY. 2018 May;182:71–6.

8. Zhuang M, Rao L, Chen Y, Xiao S, Xia H, Yang J, et al. Controlled SPION-Exosomes Loaded with Quercetin Preserves Pancreatic Beta Cell Survival and Function in Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Nanomedicine. 2023;18:5733–48.

9. Almaki JH, Nasiri R, Idris A, Majid FAA, Salouti M, Wong TS, et al. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of exquisite targeting SPIONs-PEG-HER in HER2+ human breast cancer cells. Nanotechnology. 2016 Feb 10;27(10).

10. Shevtsov M, Nikolaev B, Marchenko Y, Yakovleva L, Skvortsov N, Mazur A, et al. Targeting experimental orthotopic glioblastoma with chitosan-based superparamagnetic iron oxide nanoparticles (CS-DX-SPIONs). Int J Nanomedicine. 2018;13:1471–82.

11. Alpsoy L, Baykal A, Kurtan U, Ulker Z. Synthesis and Characterization of Carboxylated Luteolin (CL)-Functionalized SPION. J Supercond Nov Magn. 2017 Oct;30(10):2797–804.

12. Kohzadi S, Najmoddin N, Baharifar H, Shabani M. Functionalized SPION immobilized on graphene-oxide: Anticancer and antiviral study. Diam Relat Mater. 2022 Aug;127.

13. Carvalho SM, Leonel AG, Mansur Alexandra A. P. and Carvalho IC, Krambrock K, Mansur HS. Bifunctional magnetopolymersomes of iron oxide nanoparticles and carboxymethylcellulose conjugated with doxorubicin for hyperthermo-chemotherapy of brain cancer cells. Biomater Sci. 2019 May;7(5):2102–22.

14. Dagdelen S, Mackiewicz M, Osial M, Waleka-Bargiel E, Romanski J, Krysinski P, et al. Redox-responsive degradable microgel modified with superparamagnetic nanoparticles exhibiting controlled, hyperthermia-enhanced drug release. J Mater Sci. 2023 Mar;58(9):4094–114.

15. Ting CK, Dhawan U, Tseng CL, Gong CSA, Liu WC, Tsai HD, et al. Hyperthermia-Induced Controlled Local Anesthesia Administration Using Gelatin-Coated Iron-Gold Alloy Nanoparticles. Pharmaceutics. 2020 Nov;12(11).

16. Kobayashi T, Kakimi K, Nakayama E, Jimbow K. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. Nanomedicine (Lond). 2014 Aug;9(11):1715–26.

Keywords: magnetite nanoparticles; hyperthermia; cervical cancer.

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024
PBF-UEM

EFEITO DA INFECÇÃO PELO *Toxoplasma gondii* SOBRE OS OVÁRIOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Vanessa de Brito Pereira[1]; Débora de Mello Gonçales Sant'Ana[2]; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo[2]; Jaqueline de Carvalho Rinaldi[2].

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

[2]Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: debritopereiravanessa@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídeo intracelular causador da toxoplasmose.Este parasito possui a capacidade de infectar peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, impactando a reprodução animal ao aumentar a ocorrência de abortos, resultado de alterações nos gametas ou no processo gestacional. Na população humana, esta zoonose também causa impactos na saúde pública por desencadear alterações neurológicas, reprodutivas e oculares tanto em pacientes imunocompetentes quanto imunocomprometidos (1).

O sistema reprodutor é responsável pela função sexual, e no caso das fêmeas ele também está envolvido na função gestacional e lactacional (2). Em roedores, este sistema constitui-se por vagina, tubas uterinas, útero e ovários (3). Apesar de vários estudos avaliando o impacto da toxoplasmose gestacional, pouco se sabe sobre seus efeitos na morfologia dos órgãos da reprodução.

A literatura menciona que o *T. gondii* pode desencadear falhas reprodutivas tanto nas fases aguda ecrônica da infecção justificando que isso ocorre devido à instabilidade da placenta ou mesmo má formação fetal (4-7). Um estudo descreve que o parasito pode induzir alterações na histologia e organização dos folículos ovarianos em carneiros infectados com taquizoítos da cepa CPG (8). Outro mecanismo associado é a diminuição de atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal favorecendo restrição de crescimento intrauterino, partos prematuros, malformações, abortos ou natimortos (9).

Assim, o objetivo deste trabalho é examinar os efeitos das fases aguda e crônica da toxoplasmose nos ovários, tubas uterinas e úteros de camundongos fêmeas em idade reprodutiva. Analisar essas alterações pode fornecer *insights* sobre os mecanismos envolvidos nas falhas reprodutivas induzidas pelo *T. gondii*, e possibilitar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes. Para garantir a precisão dos resultados, os animais foram eutanasiados na fase de estro do ciclo estral, o que minimiza as variações associadas ao eixo reprodutivo e garante que todos os animais estejam em idade reprodutiva.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Delineamento experimental e obtenção das amostras

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº. 6688181121. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 60 dias de vida. Elas foram aleatoriamente distribuídas em grupo controle ou GC, noqual recebeu salina via gavagem e no grupo infectado ou GI, no qual recebeu 1000 oocistos esporulados de

T. gondii da cepa (ME-49) por gavagem. Após 5 dias da infecção experimental, 8 animais de cada grupo, foram submetidos a eutanásia constituindo os grupos controle (GC5) e infectado (GI5) para avaliação dos impactos da fase aguda da infecção. Após 60 dias de infecção, os outros 8 animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia constituindo os grupos controle (GC60) e infectado (GI60) para avaliação dos impactos da fase crônica da infecção. Todos os animais foram pesados para o cálculo do ganho de peso corpóreo (peso inicial - peso final). A fase do ciclo reprodutivo foi averiguada através da coleta de material para esfregaço vaginal, sendo que neste estudo foram incluídos os animais em estro (21). Após eutanásia, os órgãos da reprodução (ovários, tubas uterinas e útero) foram dissecados, pesados e fixados em methacarn por 24h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Ao menos 4 cortes semi-seriados de 5µm foram obtidos em micrótomo rotativo (LEICA

RM 2145),coletados em lâminas de vidro e reservados para coloração ou imuno-histoquímica. Todas as análises foram realizadas com auxílio de câmera *CoolSNAP* acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX50) e conectada ao sistema de captura de *Image-Pro Plus* versão 4.5.0.29 para posterior interpretação ou quantificação de estruturas.

2.2. Análises Morfológicas e quantitativas

A técnica de coloração por hematoxilina e eosina possibilitou avaliação da histoarquitetura dos órgãos reprodutores, além da quantificação e classificação dos estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos. A quantificação folicular total procedeu-se pela contagem de todos os folículos presentes na região cortical ovariana de cada grupo experimental. A quantificação folicular diferencial, por sua vez, seguiu critérios padronizados na literatura (10). Ambas foram executadas de forma manual.

A citoquímica por *picrosirius-red* foi utilizada para localizar e quantificar as fibras colágenas tipo I e tipo III presentes no tecido conjuntivo. Para esta análise, foi empregada microscopia óptica (objetiva de 20×) associada à um sistema de polarização de imagens. Nesta técnica, utiliza-se das propriedades de birrefringência dos colágenos, no qual os tons de verde indicam fibras colágenas do tipo III, vermelho/amarelo como tipo I. A mensuração foi realizada no ovário com o auxílio do *software* Image-Pro Plus® versão 4.5.0.29. Os resultados estão expressos pela razão: R= (mensuração da área de interesse/mensuração da área total)*100.

A coloração com azul de toluidina foi empregada para avaliação de infiltrado inflamatório e quantificação dos mastócitos. Para esta análise foram quantificados todos os mastócitos presentes em pelo menos 20 campos microscópicos obtidos na objetiva de 40×de amostras do ovário. Os resultados estão expressos em número de mastócitos por mm^2.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental e obtenção de amostras

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº. 6688181121. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 60 dias de vida. Elas foram aleatoriamente distribuídas em grupo controle ou GC, noqual recebeu salina via gavagem e no grupo infectado ou GI, no qual recebeu 1000 oocistos esporulados de

T. gondii da cepa (ME-49) por gavagem. Após 5 dias da infecção experimental, 8 animais de cada grupo, foram submetidos a eutanásia constituindo os grupos controle (GC5) e infectado (GI5) para avaliação dos impactos da fase aguda da infecção. Após 60 dias de infecção, os outros 8 animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia constituindo os grupos controle (GC60) e infectado (GI60) para avaliação dos impactos da fase crônica da infecção. Todos os animais foram pesados para o cálculo do ganho de peso corpóreo (peso inicial - peso final). A fase do ciclo reprodutivo foi averiguada através da coleta de material para esfregaço vaginal, sendo que neste estudo foram incluídos os animais em estro (21). Após eutanásia, os órgãos da reprodução (ovários, tubas uterinas e útero) foram dissecados, pesados e fixados em methacarn por 24h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Ao menos 4 cortes semi-seriados de 5µm foram obtidos em micrótomo rotativo (LEICA

RM 2145),coletados em lâminas de vidro e reservados para coloração ou imuno-histoquímica. Todas as análises foram realizadas com auxílio de câmera *CoolSNAP* acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX50) e conectada ao sistema de captura de *Image-Pro Plus* versão 4.5.0.29 para posterior interpretação ou quantificação de estruturas.

2.2. Análises Morfológicas e quantitativas

A técnica de coloração por hematoxilina e eosina possibilitou avaliação da histoarquitetura dos órgãos reprodutores, além da quantificação e classificação dos estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos. A quantificação folicular total procedeu-se pela contagem de todos os folículos presentes na região cortical ovariana de cada grupo experimental. A quantificação folicular diferencial, por sua vez, seguiucritérios padronizados na literatura (10). Ambas foram executadas de forma manual.

A citoquímica por *picrosirius-red* foi utilizada para localizar e quantificar as fibras colágenas tipo I e tipo III presentes no tecido conjuntivo. Para esta análise, foi empregada microscopia óptica (objetiva de 20×) associada à um sistema de polarização de imagens. Nesta técnica, utiliza-se das propriedades de birrefringência dos colágenos, no qual os tons de verde indicam fibras colágenas do tipo III, vermelho/amarelo como tipo I. A mensuração foi realizada no ovário com o auxílio do *software* Image-Pro Plus® versão 4.5.0.29. Os resultados estão expressos pela razão: R= (mensuração da área de interesse/mensuração da área total)*100.

A coloração com azul de toluidina foi empregada para avaliação de infiltrado inflamatório e quantificação dos mastócitos. Para esta análise foram quantificados todos os mastócitos presentes em pelo menos 20 campos microscópicos obtidos na objetiva de 40×de amostras do ovário. Os resultados estão expressos em número de mastócitos por mm^2.

2.3.Análise Imuno-histoquímica de proliferação celular

Cortes de 5 µm foram submetidos à recuperação antigênica usando tratamento térmico com tampão citrato (pH 6,0). Após a lavagem em tampão fosfato (pH 7,4), houve o bloqueio das ligações inespecíficas com peróxido de hidrogênio a 8% em metanol por 10 min, seguido por 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 1 hora. As lâminas foram então incubadas *overnight* à 4°C com anticorpo primário para proliferação celular (PCNA; PAA591Mi01, 1:100). Após lavagem com tampão fosfato, foi adicionado anticorpo secundário (*polymer conjugate* n#878963, 1:100). A revelação da reação foi realizada com tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina e as lâminas foram contrastadas com hematoxilina. A quantificação do PCNA foi realizada em 10 fotomicrografias por animal (objetiva de 40×) no qual, para obtenção da medida relativa referente às células-positivas para o marcador utilizado, realizou-se a razão: R = (total de núcleos imunomarcados / total de núcleos epiteliais)*100. As contagens foram executadas no ovário com auxílio do software Image-Pro Plus® versão 4.5.0.29.

2.4. 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 versão 5.01. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

A infecção bem como o período experimental transcorreram sem alterações relevantes. Não houve diferença significativa na avaliação comparativa do peso corpóreo bem como o peso dos órgãos reprodutores (dados não mostrados).

Na análise morfológica, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, não houve grandes alterações estruturais na arquitetura das gônadas, útero/ovário entre os grupos. Especificamente o ovário apresentou-se organizado em duas regiões: a) o córtex localizado na porção periférica do órgão constituída por tecido conjuntivo denso e recoberto pelo epitélio germinativo, ou seja, epitélio simples cúbico; e b) a medular localizada no centro da gônada constituída de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. Na região cortical foram observados os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (figura 1A-D).

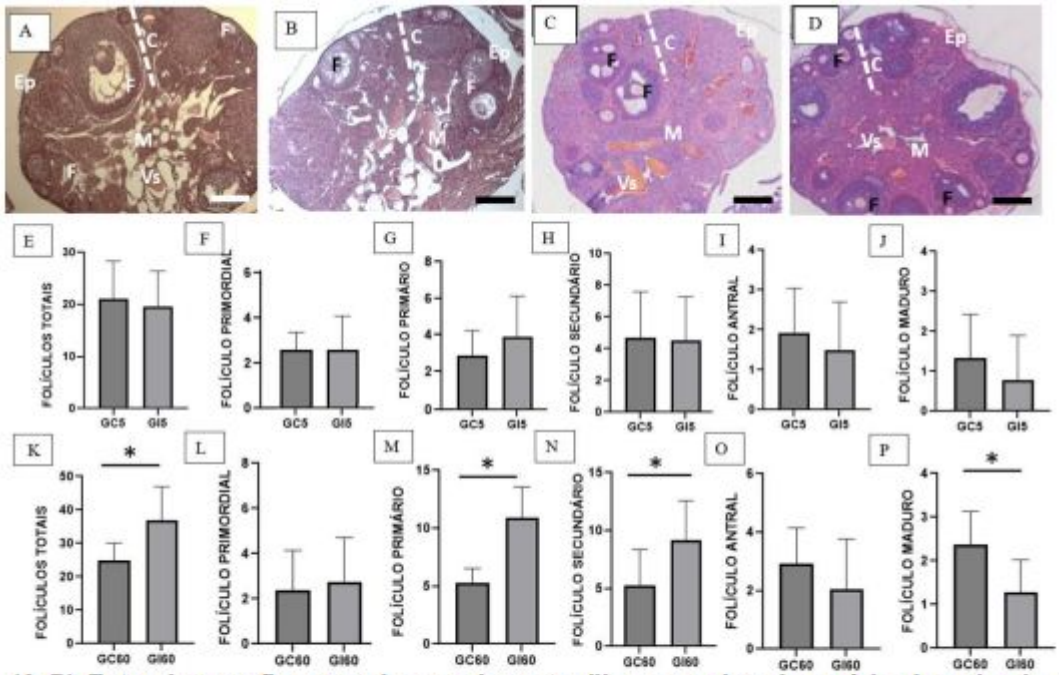


Figura 1. (A-D) Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina do ovário de animais do grupo controle (GC) e infectado (GI) na fase aguda (5 dias) e crônica (60 dias da infecção). (C) região cortical, (M) região medular, (F) folículos ovarianos, (Ep) epitélio de revestimento do ovário, (VS) vasos sanguíneos do estroma ovariano. Aumento de 40x. (E-P) Gráficos representativos da quantificação dos folículos ovarianos. Dados apresentados como média ± SEM; n=4; *p<0,05.

A fase aguda da infecção não alterou a quantidade dos folículos total ou diferencial dos folículos ovarianos. Entretanto, houve um aumento de 32% no número total de folículos nos ovários dos animais do GI60 em comparação ao GC60 (figura 1K). Além disso, houve um aumento no número de folículos em desenvolvimento (primários, secundários), sendo acompanhada por uma redução de 40% nos folículos nos folículos maduros (figura 1M-N e P). Folículos com células da granulosa desorganizadas, ovócitos e zona pelúcida degenerados estiveram presentes nos ovários GI de ambos os períodos experimentais estudados.

Com o intuito de avaliar comparativamente o desenvolvimento folicular, as amostras de ovário foram submetidas à imuno-histoquímica para PCNA para a quantificação da proliferação celular. Notou-se núcleos PCNA-positivos tanto no estroma quanto na região de tecas ou granulosa dos folículos de todos os grupos (figura 2A). Não houve diferença deste parâmetro entre GC5 e GI5, no entanto, na fase crônica da infecção houve um aumento de 35% na taxa de proliferação celular de GI60 em relação a GC60 (figura 2B-C).

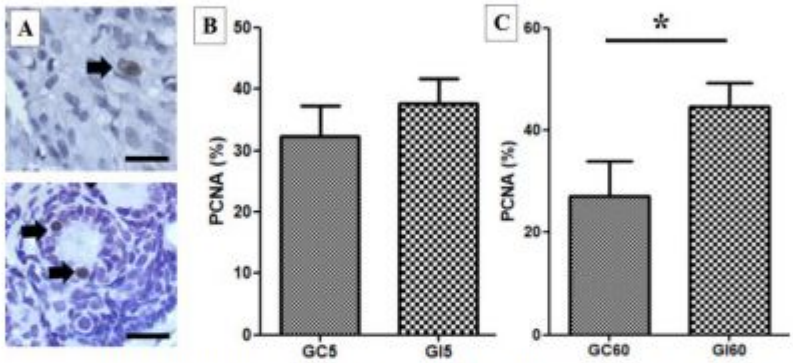


Figura 2. (A) Fotomicrografias ilustrativas da imuno-histoquímica para proliferação celular (PCNA), no qual as setas indicam núcleos imunomarcados. Aumento 400x. (B-C) Gráficos representativos da quantificação dos folículos ovarianos. Dados apresentados como média ± SEM; n=4; *p<0,05.

4.DISCUSSÃO

Neste estudo, a infecção pelo *T. gondii* foi estabelecida pela inoculação via gavagem de oocistos esporulados da cepa ME49 em camundongos fêmeas. Como o parasito não possui características tintoriais próprias que permitam distingui-lo no HE foram empregadas técnicas de detecção de taquizoítos no lavado peritoneal e de cistos no encéfalo dos animais infectados, como já descrito por Dubey (11).

No intuito de minimizar a influência da variação hormonal do ciclo estral, esta pesquisa se concentra na fase estro, cujo interferentes internos/externos potencialmente podem impactar a função gonadal por causa da ovulação e da formação de folículos (3). Estudos prévios sugerem que o *T. gondii* pode causar transtornos reprodutivos (12,13), assim este estudo contribui para melhor compreensão destes impactos no ovário de fêmeas adultas e reprodutivas.

Não houve alteração no peso dos animais ou dos órgãos reprodutivos. Também não foram observadas mudanças na histoarquitetura do ovário, sendo mantido a organização gonadal em cortical e medular. Outros trabalhos descritos na literatura também encontraram resultados semelhantes ao nosso, apesar de utilizarem outros modelos animais (14, 15).

Sabe-se que a presença do *T. gondii* pode influenciar na atividade do eixo reprodutivo, denominado eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, e assim alterar a taxa de síntese/liberação de hormônios esteroides que por sua vez pode impactar no desenvolvimento folicular (9). Neste estudo, a quantificação dos folículos ovarianos demonstrou que o *T gondii* impactou na distribuição folicular pelo córtex ovariano. Também foi observado um aumento no número de folículos recrutados (primários/secundários) acompanhados da redução numérica nos folículos maduros, o que sugere atraso no desenvolvimento folicular no GI60. Pode-se inferir que o *T. gondii* impactou a morfofisiologia ovariana e/ou o eixo reprodutivo, conforme já descrito por outros estudos (15,16). Além disso, a presença de folículos contendo células da granulosa desorganizadas, ovócitos e zona pelúcida degenerados também pode explicar o menor número de folículos maduros nos ovários do GI60. Al-Ghezy et al. (2016) demonstrou que o *T. gondii* é capaz de reduzir significativamente o FSH e o LH além de impactar na fisiologia do eixo reprodutivo. Desta forma, ele pode promover desregulação hormonal e influenciar a maturação folicular ovariana e a ovulação, o que justificaria as alterações foliculares observadas neste estudo.

Embora não tenha sido observado presença significativa de infiltrados inflamatórios, desorganização tecidual ou alteração quantitativa na população de mastócitos, houve alteração do estroma ovariano, evidenciado pela diferença de proporção entre as fibras colágenas entre os grupos. Vale ressaltar que a técnica utilizada para identificar os mastócitos, os caracteriza pela propriedade de metacromasia de seus grânulos. Assim, o resultado desta quantificação deve ser observado com cautela, pois no caso de infecção ativa e os mastócitos estarem degranulados, estes não seriam identificados. Os mastócitos, juntamente com os macrófagos, têm papel importante na resposta inflamatória local. Inclusive a literatura descreve que a toxoplasmose pode induzir ao aumento no número de macrófagos e desta forma também influenciar na organização estromal e nas atividades reprodutivas (17).

O aumento na proporção de fibras colágenas tipo-I e tipo-III no estroma ovariano, evidenciado na fase crônica da infecção pode indicar um processo adaptativo na resposta tecidual à infecção prolongada pelo *T. gondi*. Um dos mecanismos sugerido pela literatura para explicar este aumento é que a liberação de interleucina-1 pelos macrófagos (18) induz proliferação de fibroblastos e assim, aumento de síntese das fibras colágenas. O aumento na taxa de proliferação celular, evidenciado pelo PCNA também reforça esta hipótese. Inicialmente as fibras depositadas são imaturas (do tipo-III), mas gradualmente vão sofrendo remodelações durante a fase de reparo tecidual ou reorganização estromal em fibras maturas ou do tipo-I (19). Outro estudo do nosso grupo também demonstrou que o *T. gondii* impacta a deposição destas fibras, apesar de ser em intestino de ratos e utilizar modelo experimental diferente (20).

5.CONCLUSÃO

A morfologia ovariana e o desenvolvimento folicular dos camundongos fêmeas foram significativamente impactados pela infecção por *T. gondii*, principalmente na fase crônica da infecção. Estas descobertas demonstram que os efeitos do parasito sobre o sistema reprodutor são complexos e que é necessário realizar novos estudos que investiguem os mecanismos interferentes na função ovariana e na fertilidade.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Laboratório de Neurogastroenterologia da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Fehlberg HF. Identificação e diferenciação dos coccídios das espécies *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum* e *Cryptosporidium parvum* através da técnica de high resolution melting (HRM) [dissertação]. Ilhéus, BA: UESC; 2016.
2. Walker WF Jr, Homberger DG. Anatomy and dissection of the rat. 3rd ed. New York: W.H. Freeman and Company; 1997.
3. Andersen ML, Tufik S, Mello LE, Suchecki D. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP; 2004.
4. Lappin MR. Segredos em medicina interna de felinos. Porto Alegre: Artmed; 2004.
5. Arantes TP, Lopes WDZ, Ferreira RM, Pieroni JS, Pinto VM, Sakamoto CA, et al. *Toxoplasma gondii*: evidence for the transmission by semen in dogs. Exp Parasitol. 2009;123(2):190-4.
6. Bresciani KDS, Gennari SM, Serrano ACM, Costa AJ, Marcelino AP, Farias NAR, et al. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. Cienc Rural. 2001;31(6):1039-43.
7. Sakamoto CAM, Lopes WDZ, Pereira V, Carvalho MRS, Costa AJ. Experimental infection of pregnant queens with two major Brazilian clonal lineages of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. 2009;105(5):1311-6.
8. Moraes EPBX, Silva AAF, Pinto LV, Santos DC, Almeida JC, Pinheiro RR. Characterization of reproductive disorders in ewes given an intrauterine dose of *Toxoplasma gondii* tachyzoites during intrauterine insemination. Anim Reprod Sci. 2010;122(1-2):36-41.
9. Al-Ghezy ZS, Al-Abady FA, Al-Snafi AE. Histological effects of toxoplasmosis and its treatments on male and female rats. Am J Pharm Health Res. 2016;4(4):40-52.
10. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological method for morphometric cytology. J Cell Biol. 1966;30:23-38.
11. Dubey JP. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Vet Parasitol. 2006;140:69-75.
12. Bezerra MJG, Santos AB, Almeida JCF, Oliveira FCA, Pinheiro RR, Alves FSF, et al. Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil. Pesq Vet Bras. 2013;33(8):989-91.
13. Eslamirad Z, Bayat PD, Babaei S. Histological changes of the ovary in pregnant mice vaginally exposed to *Toxoplasma gondii*. Iran J Parasitol. 2015;10(2):273-80.
14. Maia RS. Alterações cognitivas em ratos infectados com *Toxoplasma gondii* [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2012.
15. Sousa LACN, Lima RK, Santos JS, Carvalho J, Souza HB. Avaliação do uso terapêutico de extrato do fungo *Trichoderma stromaticum* na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *Toxoplasma gondii*. 2019.
16. Fux B, Lopes WDZ, Rocha MB, Berber MCA, Colli CM, Souza SL, et al. Experimental toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(1):121-6.
17. Buzoni-Gatel D, Lepage AC, Dimier-Poisson I, Bout DT, Kasper LH. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. Cell Microbiol. 2006;8(4):535-44.
18. Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. Infect Immun. 2001;69(1):1-8.
19. Bier O. Imunologia básica e aplicada. São Paulo: Guanabara Koogan; 2008. p. 449.
20. Rosa ACS, Pereira P, Macedo A, Moraes LBC, Motta TM, Silva AV. Infecção aguda por *Toxoplasma gondii* promove mudanças morfoquantitativas nos neurônios nitrérgicos submucosos do íleo de ratos Wistar. 2017.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

CANDIDA INFECTIONS - EPIDEMIOLOGICAL TRENDS AT THE HOSPITAL OF THE NORTHWESTERN PARANÁ

Vitória Monteiro de Araujo Vilela[1]; Mirian Nicea Zarpellon[2]; Bruno Buranello Costa[2]; Josmar Mazucheli[3]; Isis Regina Grenier Capoci[4]; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça[4]; Érika Seki Kioshima[4].

[1] - Graduate student (Master's degree) in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá/PR.

[2] - Pharmaceutical-Biochemistry – Clinical Analysis Laboratory - Regional University Hospital of Maringá.

[3]- Professor – Department of Statistics- State University of Maringá, Maringá/PR

[4] - Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá/PR.

e-mail: vitoriavilela11@gmail.com

1. INTRODUCTION

Fungal infections have emerged as a critical public health concern, gaining the attention of international healthcare organizations. Notably, Candida infections have been prioritized by the WHO among the pathogens listed as a high-priority concern (1). Since, candidemia remains a serious threat to hospitalized patients and increases healthcare costs (2). Despite the continuous efforts to identify new antifungal agents with enhanced spectrum and efficacy, the mortality and morbidity rates for these infections have exceeded 40% (3). In general, invasive candidiasis affects critically ill and immunocompromised patients with prolonged hospitalization and exposure to invasive medical procedures, broad-spectrum antimicrobial use, and immunosuppression (4). Management of these infections is critical, as delays in treatment initiation are strongly associated with increased mortality (3).

Globally, the incidence of fungal infections varies geographically (3, 5), although the increasing incidence of the species known as *Candida* non-*C. albicans* (CNCA) is known to be a global phenomenon (6). The distribution of Candida species involved in candidaemia is changing. Even though *C. albicans* remains the most common, it is responsible for 38% to 54% of these infections in Europe, the USA, and China. Its incidence has exhibited a notable change, resulting in an important clinical scenario. Currently, CNCA are responsible for more than 50% of cases of invasive candidiasis. In this scenario, the most prevalent species are *Nakaseomyces glabratus* (formerly known as *C. glabrata*), *Candida parapsilosis complex* and *Candida tropicalis* (4, 7, 8). In Asia, the most prevalent species were *N. glabratus* and *C. tropicalis* (9), showing from these epidemiological studies an increase in candidemia caused by CNCA. In Europe, *C. parapsilosis* infections are on the increase, while in the USA it is *N. glabratus* infections (2, 5, 9).

The identification of CNCA is essential for the proper management of fungal infections. Emerging species such as *N. glabratus*, *Pichia kudriavzevii* (formely know as *Candida krusei*), and *C. tropicalis* have shown high resistance to commonly used antifungals such as triazoles and echinocandins. This directly impacts the therapeutic choice, because while *C. albicans* generally responds well to fluconazole, other species may be intrinsically resistant or develop resistance during treatment. In addition, these non-albicans species are becoming more prevalent, especially in immunocompromised populations and in hospital settings, which increases the need for accurate diagnoses in order to administer effective and targeted treatments (10).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Epidemiological analysis

The data was collected from the medical reports of clinical samples identified by Hospital Regional Universitario de Maringa (HUM) in the period from May 2018 to May 2023. This study has already been approved by the Standing Committee on Ethics in Research with Human Beings Humans (document No. 2,748,843 of 06/02/2018). The present work was carried out with full confidentiality of information. All reported fungal infection samples were identified and analyzed retrospectively. Information about the patients with fungal infection was collected, namely: age, sex, material collected, co-infection, and fungal species.

2.2. Fungal species identification

The fungal species were previously identified by the microbiology department of the Clinical Analysis Laboratory at the University Hospital (LAC/HUM) using the automated method (PHOENIX/BD). The fungal identification was confirmed by time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

2.3. Statistical Analysis

Data were analyzed with Excel ® and Prism 8.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The analysis was performed by statistical software R ®.

2.4. Budgets and funding sources

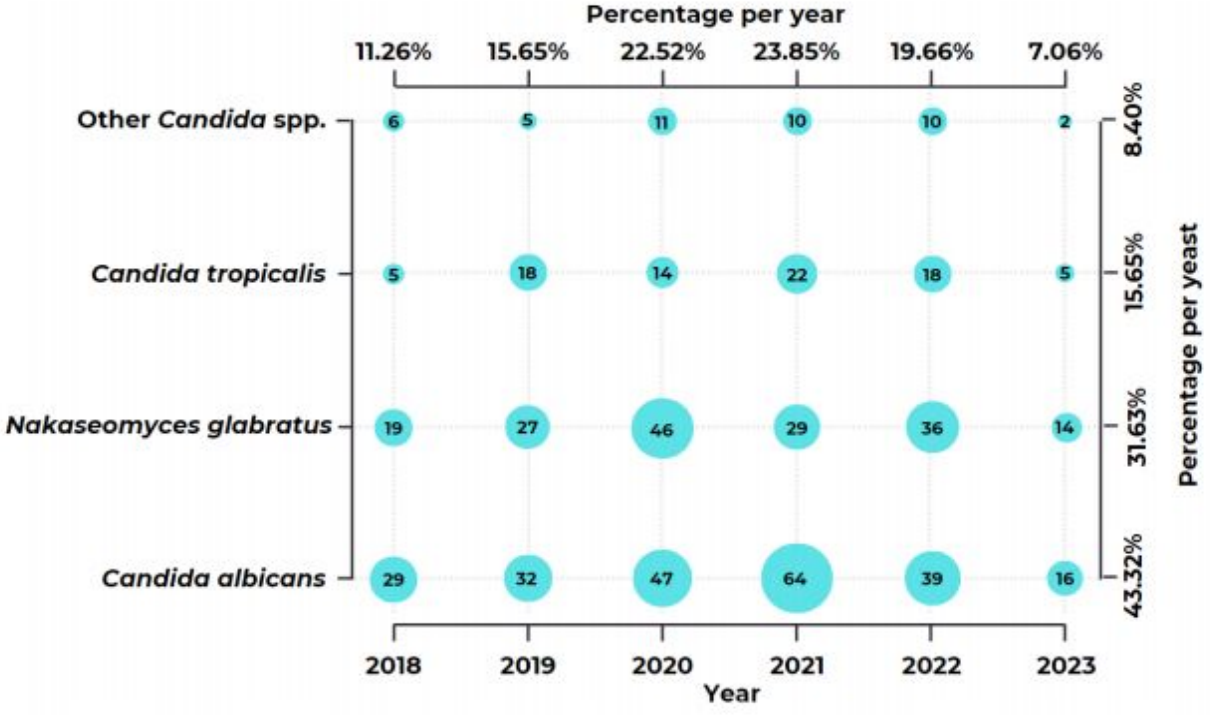
The materials for the tests were provided by the researchers of the Medical Mycology Laboratory of the State University of Maringá by Fundação Araucária – process n. 001/2016 (Application of the MALDI-TOF MS methodology for the diagnosis of fungal infections in SUS patients). Glassware, culture media and plastic materials, were used.

3. RESULTS

3.1. Incidence

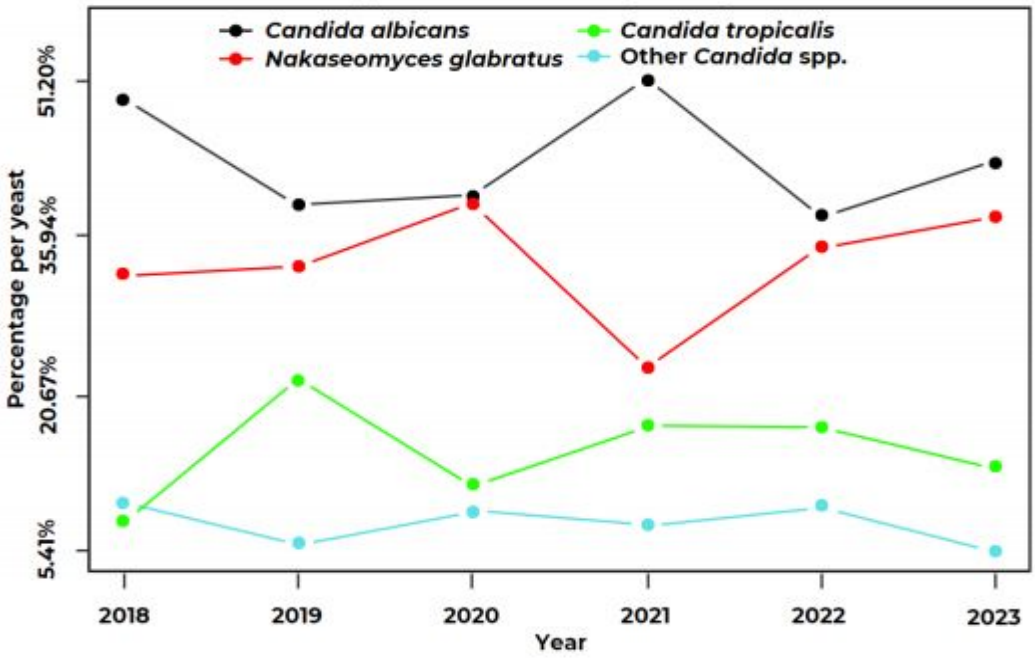
This study aimed to evaluate the distribution of *Candida* species responsible for fungal infections in University Hospital from May 2018 to May 2023. A total of five hundred and twenty-four *Candida* isolates were analyzed, as shown in Figure 1. *C. albicans* (43.32%) was the most frequent species isolated, followed by *N. glabratus* (31.63%), *C. tropicalis* (15.65%), and others *Candida* spp. (8.40%). The distribution of species did not change during the four years analyzed. It is noteworthy that, despite the absence of a statistically significant difference, the number of cases of fungal infections increased during the period of the pandemic.

Figure 1. Percentage distribution of the type of fungus isolated according to the years.



N. glabratus was the second most frequently isolated CNCA (31.63%), higher than *C. tropicalis* (15.65%). And this is a point to highlight because the gradual increase of *N. glabratus* infections over the years was not observed, maybe due to the short period of this study. Punctually, in the year the pandemic started, forty-six cases of *N. glabratus* infection were observed, but this did not remain in the following year. Despite the rising trend of CNCA species over the years, this analysis is not statistically significant individually for each species. The proportions of isolates of each *Candida* species within each year have not changed (Figure 2). It should be noted that the observation period is short and the remark must be done with care.

Figure 2. Distribution of the *Candida* spp. isolated according to the years.



3.2. Patient demographics

The majority of cases of *Candida* infections, regardless of species, have occurred among women (64.69%). However, when we analyze the results considering the species. The percentages might be as high as 71.85% when it involves *N. glabratus* infection. A more sophisticated analysis via multinomial regression can assess whether the chances of observing a particular fungus compared to a reference are higher in women (339) and men (185). Empirically, this information can be extracted from the table above.

Table 1. Distribution of isolates by gender (Female or Male).

Isolates	Female	Male	Total
C. albicans	135 (25.76%)	92 (17.56%)	227 (43.32%)
N. glabratus	127 (24.24%)	44 (8.40%)	171 (32.63%)
C. tropicalis	49 (9.35%)	33 (6.30%)	82 (15.65%)
Other *Candida spp.*	28 (5.34%)	16 (3.05%)	44 (8.40%)
Total	339 (64.69%)	185 (35.31%)	524 (100%)

Regarding the variables type of isolate and age (categorized in [0.47), [47.62), [62.75) and [75.98)) the data do not show an association between type of isolate and age group. The distribution by type of isolate versus age group is shown in the table below. The categorization was made from the percentiles of 25%, 50%, and 75%, whose values are 47, 62, and 75 years, respectively. It is possible to observe that almost 60% of patients were older than 62 years old. It is notable that when analyzed separately by species, the patients affected by *N. glabratus* infections contributed to this percentage since 63.15% of infections caused by *N. glabratus* occurred in patients older than 62 years. For *C. albicans* and *C. tropicalis*, this percentage is 58.15% and 40.24%, respectively. Another point to emphasize is the frequency of *C. tropicalis* patients under 6 years old (6/13 patients, 46.15%). On the other hand, *C. albicans* 30.77% (4/13 patients) of this population group.

Table 2. Distribution of the type of isolate according to age (0 to 47, 47 to 62, 62 to 75, 75 to 98 years).

Isolates	[0 - 47)	[47 - 62)	[62 - 75)	[75 - 98]	Total
C. albicans	51 (9.73%)	44 (8.40%)	72 (13.74%)	60 (11.45%)	227 (43.32%)
N. glabratus	23 (4.39%)	40 (7.63%)	51 (9.73%)	57 (10.88%)	171 (32.63%)
C. tropicalis	22 (4.20%)	17 (3.24%)	19 (3.63%)	24 (4.58%)	82 (15.65%)
Other *Candida spp.*	11 (2.10%)	6 (1.15%)	12 (2.29%)	15 (2.86%)	44 (8.40%)
Total	107 (20.42%)	107 (20.42%)	154 (29.39%)	156 (29.77%)	524 (100%)

3.3. Candidemia

On the bloodstream infections prevalence changes (Table 3). It is possible to observe that even though *C. albicans* continues to be the most prevalent in this infection site (37.74%), it is followed by *C. tropicalis* (26.42%) and *N. glabratus* (20.75%). Despite the number of cases not being elevated, it is important to highlight a difference (~10%) in the prevalence found in 2018 (15.09%), and 2019 (18.87%), and the other years (2020 - 24.53%; 2021 – 28.30%).

Table 3. Distribution of the isolate in blood samples.

Isolates	2018	2019	2020	2021	2022	2023	Total
C. albicans	4 (7.55%)	3 (5.66%)	4 (7.55%)	7 (13.21%)	2 (3.77%)	0 (0.00%)	20 (37.74%)
N. glabratus	3 (5.66%)	2 (3.77%)	4 (7.55%)	2 (3.77%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	11 (20.75%)
C. tropicalis	0 (0.00%)	4 (7.55%)	3 (5.66%)	5 (9.43%)	2 (3.77%)	0 (0.00%)	14 (26.42%)
Other *Candida spp.*	1 (1.89%)	1 (1.89%)	2 (3.77%)	1 (1.89%)	3 (5.66%)	0 (0.00%)	8 (15.09%)
Total	8 (15.09%)	10 (18.87%)	13 (24.53%)	15 (28.30%)	7 (13.21%)	0 (0.00%)	53 (100%)

4. DISCUSSION

In light of the ever-evolving candidemia epidemiology specialty landscape worldwide with vital implications for the management of this infection, continuous observation, especially in previously under-investigated geographic areas, is primordial. An accurate estimate of the global burden of fungal infections caused by *Candida* spp. is difficult to assess because long-term surveillance data are limited and highly heterogeneous (2, 3, 11). A systematic review of the literature described such variations in different patient populations and disease severity, with different local practices and antifungal drug use in Greece (12), and in other European countries (13), to emphasize the importance of constant monitoring and surveillance. Considering the current literature, this is a very important study to work out the fungal infection incidence in Maringá, along with the sensitivity spectrum profiles of *Candida* spp. to fluconazole.

Simultaneously, a progressive increase in the incidence rate of CNCA species is consistent with the current global epidemiological trends (2). The most prevalent CNCA in Lebon is *N. glabratus* (14), similar to Europe (15), India (16), Brazil (17), China (18), and in other parts of the world (19), being associated with the increase of mortality (14). This result is not in line with data from Greece (3) and Latin America (20). The reasons for the variation in the incidence of *N. glabratus* as the etiology have not been determined, but may be related to azole exposure, patient age, underlying condition, geographic location, or other unknown factors (20).

The higher prevalence of this infection in women than men in this study is consistent with *Candida* spp. being the major cause of vaginal infections, with at least 75% of women having at least one case in their lifetime (21). Furthermore, women are more likely to seek medical care, particularly for reproductive and gynecological health, which may increase the diagnosis and treatment of candidiasis. Additionally, older women may be more exposed to risk factors such as prolonged antibiotic use, menopausal hormonal changes, and comorbidities affecting the immune system such as diabetes (22) . In addition, with increasing age, a significant trend towards an increase in the proportion of infections caused by *N. glabratus* have been described (20), which corroborates the result of this work, which more than 55% of patients were older than 62 years old. This increase is not just limited to the incidence, but also the risk of mortality (20). Even though *N. glabratus* is considered the most frequent CNCA in several studies targeting blood samples (23), this study shows a predominance of *C. albicans* , as expected, together *C. tropicalis*, discording from current studies (24).

5. CONCLUSION

Although *C. albicans* remains the most frequent among clinical isolates, the increase of CNCA is a fact the increase in other species is a fact that has been described in several studies, corroborating our study. While *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* remain the two most commonly reported CNCA species in patients with candidemia, there is an emerging trend of *N. glabratus* in specific populations. To better characterize the epidemiology of fungal infections by *Candida* in Brazil, further studies are warranted.

FUNDERS

CAPES e CNPq.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the team at the Medical Mycology Laboratory of the State University of Maringá, the University Hospital of Maringá, all the staff and funding bodies.

REFERENCES

1. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action Geneva: World Health Organization: Antimicrobial Resistance Division; 2022 [Available from: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/9789240060241-eng.pdf?sequence=1.
2. Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild M, Bohlius J, et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2019 Oct;25(10):1200-12. PubMed PMID: 31039444. Epub 20190427. eng.
3. Mamali V, Siopi M, Charpantidis S, Samonis G, Tsakris A, Vrioni G, et al. Increasing Incidence and Shifting Epidemiology of Candidemia in Greece: Results from the First Nationwide 10-Year Survey. J Fungi (Basel). 2022 Jan 26;8(2). PubMed PMID: 35205870. PMCID: PMC8879520. Epub 20220126. eng.
4. Agnelli C, Guimarães T, Sukiennik T, Lima PRP, Salles MJ, Breda GL, et al. Prognostic Trends and Current Challenges in Candidemia: A Comparative Analysis of Two Multicenter Cohorts within the Past Decade. J Fungi (Basel). 2023 Apr 13;9(4). PubMed PMID: 37108922. PMCID: PMC10144195. Epub 20230413. eng.
5. Bays DJ, Jenkins EN, Lyman M, Chiller T, Strong N, Ostrosky-Zeichner L, et al. Epidemiology of Invasive Candidiasis. Clin Epidemiol. 2024;16:549-66. PubMed PMID: 39219747. PMCID: PMC11366240. Epub 20240828. eng.
6. Giacobbe DR, Maraolo AE, Simeon V, Magnè F, Pace MC, Gentile I, et al. Changes in the relative prevalence of candidaemia due to non-albicans Candida species in adult in-patients: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. Mycoses. 2020 Apr;63(4):334-42. PubMed PMID: 31997414. eng.
7. McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2021 Jun;35(2):389-413. PubMed PMID: 34016283. eng.
8. Kajihara T, Yahara K, Nagi M, Kitamura N, Hirabayashi A, Hosaka Y, et al. Distribution, trends, and antifungal susceptibility of Candida species causing candidemia in Japan, 2010-2019: A retrospective observational study based on national surveillance data. Med Mycol. 2022 Sep 29;60(9). PubMed PMID: 36095139. PMCID: PMC9521341. eng.
9. Vannini M, Emery S, Lieutier-Colas F, Legueult K, Mondain V, Retur N, et al. Epidemiology of candidemia in NICE area, France: A five-year study of antifungal susceptibility and mortality. J Mycol Med. 2022 Mar;32(1):101210. PubMed PMID: 34768155. Epub 20211021. eng.
10. Mokaddas EM, Al-Sweih NA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of Candida bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. J Med Microbiol. 2007 Feb;56(Pt 2):255-9. PubMed PMID: 17244809. eng.
11. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. J Fungi (Basel). 2017 Oct 18;3(4). PubMed PMID: 29371573. PMCID: PMC5753159. Epub 20171018. eng.
12. Siopi M, Tarpatzi A, Kalogeropoulou E, Damianidou S, Vasilakopoulou A, Vourli S, et al. Epidemiological Trends of Fungemia in Greece with a Focus on Candidemia during the Recent Financial Crisis: a 10-Year Survey in a Tertiary Care Academic Hospital and Review of Literature. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3). PubMed PMID: 31871083. PMCID: PMC7038287. Epub 20200221. eng.

13. Adam KM, Osthoff M, Lamoth F, Conen A, Erard V, Boggian K, et al. Trends of the Epidemiology of Candidemia in Switzerland: A 15-Year FUNGINOS Survey. Open Forum Infect Dis. 2021 Oct;8(10):ofab471. PubMed PMID: 34660836. PMCID: PMC8514178. Epub 20210917. eng.
14. Zakhem AE, Istambouli R, Alkozah M, Gharamti A, Tfaily MA, Jabbour JF, et al. Predominance of Candida Glabrata among Non-albicans Candida Species in a 16-Year Study of Candidemia at a Tertiary Care Center in Lebanon. Pathogens. 2021 Jan 19;10(1). PubMed PMID: 33477771. PMCID: PMC7832319. Epub 20210119. eng.
15. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. Clin Microbiol Infect. 2019 Jul;25(7):792-8. PubMed PMID: 30965100. Epub 20190406. eng.
16. Kumar A, Nair R, Kumar M, Banerjee A, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, et al. Assessment of antifungal resistance and associated molecular mechanism in Candida albicans isolates from different cohorts of patients in North Indian state of Haryana. Folia Microbiol (Praha). 2020 Aug;65(4):747-54. PubMed PMID: 32219719. Epub 20200326. eng.
17. Fornari G, Vicente VA, Gomes RR, Muro MD, Pinheiro RL, Ferrari C, et al. Susceptibility and molecular characterization of Candida species from patients with vulvovaginitis. Braz J Microbiol. 2016 Apr-Jun;47(2):373-80. PubMed PMID: 26991298. PMCID: PMC4874609. Epub 20160302. eng.
18. Zeng ZR, Tian G, Ding YH, Yang K, Liu JB, Deng J. Surveillance study of the prevalence, species distribution, antifungal susceptibility, risk factors and mortality of invasive candidiasis in a tertiary teaching hospital in Southwest China. BMC Infect Dis. 2019 Nov 7;19(1):939. PubMed PMID: 31699043. PMCID: PMC6836498. Epub 20191107. eng.
19. Persyn A, Rogiers O, Brock M, Vande Velde G, Lamkanfi M, Jacobsen ID, et al. Monitoring of Fluconazole and Caspofungin Activity against In Vivo Candida glabrata Biofilms by Bioluminescence Imaging. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Feb;63(2). PubMed PMID: 30420485. PMCID: PMC6355587. Epub 20190129. eng.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007 Jan;20(1):133-63. PubMed PMID: 17223626. PMCID: PMC1797637. eng.
21. Waikhom SD, Afeke I, Kwawu GS, Mbroh HK, Osei GY, Louis B, et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis among pregnant women in the Ho municipality, Ghana: species identification and antifungal susceptibility of Candida isolates. BMC Pregnancy Childbirth. 2020 May 6;20(1):266. PubMed PMID: 32375724. PMCID: PMC7201979. Epub 20200506. eng.
22. de Cássia Orlandi Sardi J, Silva DR, Anibal PC, de Campos Baldin JJCM, Ramalho SR, Rosalen PL, et al. Vulvovaginal Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors, Pathogenesis, Resistance, and New Therapeutic Options. Current Fungal Infection Reports. 2021;15(1):32-40. PubMed PMID: de Cássia Orlandi Sardi2021.
23. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). Int J Antimicrob Agents. 2011 Jul;38(1):65-9. PubMed PMID: 21514797. Epub 20110422. eng.
24. Hsu DI, Nguyen M, Nguyen L, Law A, Wong-Beringer A. A multicentre study to evaluate the impact of timing of caspofungin administration on outcomes of invasive candidiasis in non-immunocompromised adult patients. J Antimicrob Chemother. 2010 Aug;65(8):1765-70. PubMed PMID: 20554567. Epub 20100616. eng.

Key-words: Epidemiology; *Candida*; Fungal infections.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO PASSIVA CONTRA COVID-19 EM NEONATOS PREMATUROS VIA TRANSPLACENTÁRIA E PELO LEITE HUMANO

Wellington Dias Liziero[1]; Christyna Beatriz Genovez Tavares[2]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[3]; Larissa Danielle Bahls Pinto[4]; Joana Maira Valentini Zacarias Santim[5];

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

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

[3]Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[4]Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

[5]Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Núcleo de Cadeiras Básicas, Faculdade de Medicina de Marília, Marília, SP

e-mail: weliziero@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) foi oficialmente declarada em Março de 2020 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo o agente etiológico o vírus SARS-CoV-2 (1). A disseminação global do SARS-Cov-2 trouxe muitas incertezas relacionadas ao binômio saúde-doença de públicos específicos, como as gestantes e puérperas (em até 45 dias após o parto). Essas têm maior probabilidade de desenvolver COVID-19 grave comparadas às demais mulheres, com aumento na taxa de internação em unidade de terapia intensiva (UTI), necessidade de oxigenoterapia, ventilação mecânica e mortalidade (2). Além disso, as gestantes, ao apresentar as manifestações clínicas da doença estão predispostas a um risco maior de complicações obstétricas, tais como: parto prematuro, óbito fetal, abortamento, eclâmpsia, entre outros (3). Assim, uma vez que foi estabelecida a ligação entre gravidez, incidência de COVID-19 grave e complicações obstétricas, foi fundamental incluir gestantes como grupos prioritários nas campanhas de vacinação (3,4).

A vacinação contra COVID-19 em gestantes induz rápidas respostas de anticorpos, com produção de anticorpos IgM e IgG, com predomínio da soroconversão para IgG. Esse efeito desejado não é observado no curso natural da infecção por SARS-CoV-2, que tende a produzir respostas mais graduais (5). Além disso, os títulos de IgG aumentam significativamente com a segunda dose e posteriores aplicações de reforço do imunizante (6).

A vacinação contra COVID-19 em gestantes induz rápidas respostas de anticorpos, com produção de anticorpos IgM e IgG, com predomínio da soroconversão para IgG. Esse efeito desejado não é observado no curso natural da infecção por SARS-CoV-2, que tende a produzir respostas mais graduais (5). Além disso, os títulos de IgG aumentam significativamente com a segunda dose e posteriores aplicações de reforço do imunizante (6).

Com base nisso, o esquema vacinal preconizado pelo Ministério da Saúde, segue a aplicação de duas doses do imunizante com intervalo de quatro semanas entre a primeira e a segunda dose em gestantes; após quatro meses é orientado que se faça outras duas doses de reforço, também com intervalo de quatro meses entre elas (6,7). Visto isso, mesmo que a gestante possa iniciar o esquema vacinal em qualquer período da gestação, é aconselhável a tomar as primeiras doses logo no primeiro trimestre gestacional (12), para se fazer possível no pré-natal a aplicação de todas as doses, pois a imunidade adaptativa é mais significativa após a vacinação de reforço e está ligada a uma melhor transmissão de anticorpos pela placenta (8,9,10).

A transferência de IgG materna para o feto é influenciada por vários fatores, incluindo o nível de IgG materna e a idade gestacional. A IgG materna é transferida através da placenta para o feto em desenvolvimento a partir de 10 a 12 semanas de gestação, sendo a maior parte da IgG transferida nas últimas 4 semanas (11). Imunoglobulinas IgG foram encontradas em 98,5% dos recém-nascidos de mães que completaram duas doses

de vacinação Pfizer-BioNTech comparados com 43,6% de neonatos de mães que receberam apenas uma dose do mesmo imunizante (12,13). Além do número de doses da vacina contra a COVID-19, o intervalo de tempo entre a vacinação da mãe e o nascimento da criança mostrou-se associado aos níveis de títulos de anticorpos IgG e sua taxa de transferência placentária (14)..

Outra via importante na transferência de anticorpos da mãe para o recém-nascido é por meio do aleitamento materno. O leite materno é um fluido nutricional valioso, rico em fatores imunomoduladores e imunoprotetores como citocinas, receptores solúveis e anticorpos maternos (15). Estudos recentes detectaram anticorpos específicos anti-SARS-Cov-2 no leite de mães que tiveram COVID-19 (16), assim como, a presença de anticorpos IgA e IgG no leite de mães que foram vacinadas contra a doença (17).

Dessa forma, este estudo teve o objetivo de avaliar a transferência transplacentária e pelo leite humano de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em recém-nascidos prematuros de gestantes vacinadas contra COVID-19, atendidas no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de indivíduos

Foram incluídos no estudo quarenta recém-nascidos prematuros atendidos e internados na UTI-neonatal do Hospital Universitário Regional de Maringá, do Estado do Paraná, cujas mães foram vacinadas contra COVID-19 durante o pré-natal. Foi avaliado o esquema vacinal contra COVID-19 das mães, se enquadrando para o estudo aquelas que tiveram o esquema vacinal completo há, no mínimo, 15 dias do parto pré-termo ou esquema vacinal incompleto, pois, devido ao parto prematuro, não receberam todas as doses dos imunizantes de acordo com as recomendações do Plano Nacional de Imunização contra COVID-19 do Ministério da Saúde. .

2.2. Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Para a coleta dos dados clínicos, foi realizada a abordagem das mães durante o período de internamento do RN e convidadas a participarem da pesquisa de forma a responder um questionário composto por perguntas como sexo e idade gestacional do RN, via de parto, peso ao nascimento, idade materna, número de gestações e intercorrências clínicas no pré-natal.

Os dados laboratoriais do RN como glicemia, eletrólitos, hemograma e leucograma , bem como outros dados clínicos complementares, foram coletados através de prontuários médicos. As mães que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.3. Coleta de dados vacinais da mãe

Os dados de vacinação contra a COVID-19 das mães incluídas no estudo foram coletados a partir da aplicação de um questionário no qual indagou-se período de imunização no pré-natal, plataforma vacinal, quantidade e intervalo entre as dose e uso de medicações imunossupressoras. A comprovação da vacinação se deu mediante a apresentação e análise da carteirinha de vacinação da mãe. Aquelas que não souberam responder ou na impossibilidade de apresentar a carteirinha de vacinação, tiveram o esquema vacinal averiguado através do sistema e rede de armazenamento de dados da Secretaria da 15ª Regional de Saúde do Paraná.

2.4. Coleta das amostras de soro dos RNs e leite humano

As amostras de soro dos neonatos prematuros para a dosagem de anticorpos IgG contra SARS-Cov-2 foram advindas de alíquotas restantes da utilização para os exames de rotina laboratorial e armazenadas no laboratório de análises clínicas do HUM.

As amostras de leite humano (LH) para dosagem de anticorpos específicos anti-SARS-Cov-2, se deu com o leite humano ordenhado cru (LHOC) e leite humano pasteurizado (LHP), ambos da própria mãe, fornecidos aos pesquisadores pelo Banco de Leite Humano (BLH) do HUM.

2.5. Detecção de anticorpos IgG anti SARS-CoV-2 em amostras de soro e leite humano

A detecção de anticorpos específicos para proteínas do SARS-CoV-2 no soro do neonato e no leite humano será realizada utilizando o kit LABScreen™ COVID Plus (One Lambda, Thermo Fisher Scientific) de acordo com instruções do fabricante. A leitura foi efetuada no equipamento Luminex® 100/200TM (Luminex) e a interpretação dos dados pelo software HLA Fusion versão 4.5. Este teste apresenta sensibilidade e especificidade de 100% e 98,6%, respectivamente, na avaliação semi-quantitativa de anticorpos anti-SARS-CoV-2 alvo-específicos: anti-S (domínio extracelular), anti-S1 (domínio S1), and-S2 (domínio S2), anti-RBD (domínio do receptor de ligação) e anti-N (proteína do nucleocapsídeo); bem como de anticorpos específicos para o domínio S1 da proteína S de outros coronavírus (HCoV-229E, HCoV-HKU1, HcoV-NL63, HcoV-OC43, MERS-CoV e SARS-CoV).

3. RESULTADOS

Os resultados qualitativos do perfil clínico ao nascimento dos RN prematuros atendidos pelo HUM demostraram maior prevalência de nascimento do sexo feminino (57,5%), via de parto cesariana (62,5%), com idade gestacional (IG) entre 32 e 36 semanas (55%), predominantemente com baixo peso ao nascimento (75%), entretanto, 95% estavam com o peso de nascimento adequado para a idade gestacional (AIG), conforme a tabela 1. .

Por sua vez, a análise descritiva dos dados laboratoriais ao nascimento dos RN prematuros atendidos pelo HUM (tabela 2), evidenciou alterações na glicemia como hiperglicemia e hipoglicemia, 45% e 25%, respectivamente. Distúrbios hidroelectrolíticos também foram observados com predominância de hiponatremia (75%) e hipocalcemia (35%). Além do mais, o leucograma revelou linfopenia em 27,5% dos nascimentos prematuros.

Da mesma forma, a análise qualitativa do perfil clínico das gestantes atendidas pelo HUM na admissão para o parto (tabela 3), demonstrou que 45% delas haviam idade entre 26 e 35 anos, seguidos de 27,5% com idade entre 18 e 25 anos, 15% idade superior a 35 anos e 12,5% menores de 18 anos. Em relação ao número de gestações, a maioria eram multíparas (42,5%) seguido de primíparas (37,5%). Além do mais, as principais intercorrências clínicas durante o pré-natal foram pré-eclâmpsia e eclâmpsia, 37,5% e 45%, respectivamente.

Tabela 1. Perfil clínico ao nascimento dos recém-nascidos prematuros atendidos pelo Hospital Universitário Regional de Maringá

Variável	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Sexo		
Feminino	23	57,5
Masculino	17	42,5
Tipo de parto		
Vaginal	15	37,5
Cesariana	25	62,5
Idade gestacional (IG)		
28-31 semanas	18	45
32-36 semanas	22	55
Peso ao nascimento		
Baixo peso	30	75
Muito baixo peso	10	25
Peso para a IG		
AIG	38	95
PIG	1	2,5
GIG	1	2,5

AIG: adequado para a idade gestacional; PIG: pequeno para a idade gestacional; GIG: grande para a idade gestacional

Tabela 2. Perfil laboratorial ao nascimento dos recém-nascidos prematuros atendidos pelo Hospital Universitário Regional de Maringá

Variável	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Glicemia		
Hiperglicemia	18	45
Hipoglicemia	10	25
Euglicemia	12	30
Sódio		
Hiponatremia	30	75
Potássio		
Hipocalemia	4	10
Cálcio		
Hipocalcemia	14	35
Hemograma		
Anemia	3	7,5
Leucograma		
Leucocitose	5	12,5
Linfopenia	11	27,5

Tabela 3. Perfil clínico das gestantes atendidas pelo Hospital Universitário Regional de Maringá

Variável	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Idade		
< 18 anos	5	12,5
18-25 anos	11	27,5
26-35 anos	18	45
> 35 anos	6	15
Gestações		
Primípara	15	37,5
Secundípara	8	20
Multípara	17	42,5
Intercorrência gestacional		
Pré-eclâmpsia	15	37,5
Eclâmpsia	18	45

4. DISCUSSÃO

As intercorrências gestacionais no pré-natal como pré-eclâmpsia e eclâmpsia apresentam um risco de até 7 vezes para o parto prematuro (18). Essas complicações provavelmente foram responsáveis pela maior parte dos partos prematuros ocorridos no HUM observados neste estudo, embora não se possa afirmar que tenha sido a única causa.

Contudo, em situações de urgências e emergências obstétricas, quando a vida materna-fetal está ameaçada, o parto passa a ser de interesse da mãe e de médicos para salvar ambas as vidas. Nesses cenários, a via de parto preferível é a cesariana (2), o que corrobora com o predomínio de cesarianas observadas neste estudo.

No entanto, o parto prematuro pode não ser a melhor conduta para a vida do RN. A prematuridade pode ser clinicamente prejudicial pela imaturidade de diversos sistemas e órgãos. O sistema imunológico do RN prematuro é subdesenvolvido e produz baixos títulos de anticorpos, deixando-o mais suscetível a infecções, como a COVID-19 (12). Esse estado imaturo das células imunes puderam ser observados em leucogramas de RN prematuros participantes deste estudo, no qual 12,5% cursaram com leucocitose com predomínio de neutrófilos e 27,5% apresentaram linfopenia. Os linfócitos são células importantes para uma resposta imune protetora, duradoura e específica com produção de anticorpos. Assim a baixa quantidade dessas células circulantes no sangue do prematuro, torna-o mais dependente de anticorpos maternos, cujos são transferidos predominantemente ao final da gestação nas últimas 4 semanas e pelo leite materno após o nascimento (14,17).

Além disso, os rins e pâncreas de RN prematuros não são completamente desenvolvidos, fato que prejudica a homeostase de eletrólitos como sódio, cálcio e glicose (19). Esse desequilíbrio hidroeletrolítico foi observado nos dados laboratoriais dos RN pré-termo com destaque para a prevalência de hiponatremia (75%), hipocalcemia (35%), hiperglicemia (45%) e hipoglicemia (25%).

Visto isso, esse trabalho mostra que a vacinação de gestantes contra a COVID - 19 se faz necessária como forma de prevenção, uma vez que estudos já demonstraram que este grupo específico apresentam maiores chances de adquirir COVID - 19 grave com altas taxas de internações em UTI, complicações obstétricas como eclâmpsia, parto prematuro e óbito fetal (2,3). Além do mais, a vacinação é de suma importância para uma adequada imunidade passiva fetal através da placenta e pelo leite materno após o nascimento.

5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que a vacinação de gestantes contra a COVID-19 pode ser um caminho adjuvante na prevenção de doenças infectocontagiosas como a COVID-19 em RN prematuros, por promover a imunização passiva através da placenta e do leite materno, uma vez que o sistema imunológico desses RNs é imaturo e pouco responsivo. Assim, a dosagem de anticorpos nos RN prematuros ainda será realizada com a finalidade de analisar a imunização passiva e reforçar a importância da vacinação contra a COVID-19 em gestantes.

FINANCIADORES

CAPES, CNPq.e PPSUS

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, ao Banco de Leite e ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Koa Hosoki, et al. Moleculat mechanisms and Epidemiology of COVID-19 from an allergist's perspective. J Allergy Clin Immune; 2020, 146(2):285-299.
2. Amelie Pham, et al. Maternal COVID-19 disease, vaccination safety in pregnancy, and evidence of protective immunity.Journal Allergy and Clinical Immunology.July 2021 07 013.
3. Brasil. Ministério da saúde, Secretária em Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Plano Nacional de Operacionalização de Vacinação contra COVID-19. 2ª Edição. 2021.
4. Leik Nang, et al. Covid-19 vaccine and its consequences in pregnancy: Brief review. Ann Med Surg (Lond). 2021; 72:103103.
5. Prabhu Murphy., et al. bioRxiv; 2021. Antibody Response to SARS-CoV-2 mRNA Vaccines in Pregnant Women and Their Neonates. 2021.04.05.438524.
6. Gray Kathryn, et al. Coronavirus disease 2019 vaccine response in pregnant and lactating women: a cohort study. American journal of obstetrics and gynecology. 2021.
7. Brasil. Ministério da saúde, Secretária em Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Plano Nacional de Operacionalização de Vacinação contra COVID-19. 2ª Edição. 2021.
8. Polack Fernando, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. N. Engl. J. Med. 2020;383(27):2603–2615.
9. Sociedade Brasileira de Imunização {internet}. COVID-19: Documentos sobre a vacinação, 31 de maio de 2021 (Atualizado em 24 de agosto de 2024). Disponível em: https://sbim.org.br/informes-e-notas-tecnicas/outras-entidades.

10. Kathryn Moore, et al.. Comprehensive analysis of COVID-19 during pregnancy. Biochem Biophys Res Commun. 2021 Jan 29;538:180-186.
11. Palmeira Quinello, et al. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. Clin. Dev. Immunol. 2012;2012:985646.
12. Gill Jones. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibodies in neonatal cord blood after vaccination in pregnancy. Obstet. Gynecol. 2021;137(5):894–896.
13. Rottenstreich Zarbiv. Efficient maternofetal transplacental transfer of anti-SARS-CoV-2 spike antibodies after antenatal SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccination. 2021.
14. Mithal Otero, et al. Cord blood antibodies following maternal coronavirus disease 2019 vaccination during pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 2021;1
15. Pasqua Anna Q, et al. Anti-Infective, Anti-Inflammatory, and Immunomodulatory Properties of Breast Milk Factors for the Protection of Infants in the Pandemic From COVID-19. Frontiers impublicável health; 2021
16. Aline V. Costa, et al. Breastfeeding importance and its therapeutic potential against SARS-CoV-2. Physicological Reports; 2021, e14744
17. Perl SH, et al. SARS-CoV-2-Specific Antibodies in Breast Milk After COVID-19 Vaccination of Breastfeeding Women. JAMA. 2021 May 18;325(19):2013-2014
18. DA CUNHA SOARES, Ticianne et al. Fatores de risco relacionados a pré-eclâmpsia: uma revisão integrativa da literatura. Revista Eletrônica Acervo Saúde, n. 20, p. e437-e437, 2019.
19. Manual MDS {internet}.Recém-nascidos prematuros (pré-termo), 17 de setembro de 2024 (atualizado em janeiro de 2024). Dlsponível em https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/problemas-de-sa%C3%BAde-infantil/problemas-gerais-em-rec%C3%A9m-nascidos/rec%C3%A9m-nascidos-prematuros-pr%C3%A9-termo

Palavras-chave: Parto prematuro; Imunidade passiva; Anticorpos.

PBF-UEM

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

23 A 25 DE OUTUBRO

2024

Resumos Simples

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA NEFRITE LÚPICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Aíssa Moreira Carniel Da Silva[1]; Emanuelle Rocha Moreira[1]; Julia Rissatti De Souza[1]; Bianca Celin Possari[1]; Hugo de Amorim Souza[1]; Izabele Marini Couto[1]; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré[2]; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose[2]; Maria Valdrinez Campana Lonardoni[2]; Jorge Juarez Vieira Teixeira[2]

[1]Acadêmico (a) de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

[2]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) afeta múltiplos sistemas, decorrente de uma resposta imune desregulada, na qual o sistema imune ataca seus próprios tecidos. Uma das complicações mais frequentes da LES é a nefrite lúpica (NL) que pode levar à necessidade de transplante renal. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática para avaliar as associações entre o sistema imune com o desenvolvimento da NL. **Material e métodos:** A pesquisa foi conduzida em seis bases de dados (*PubMed, Embase, Web of Science, Scopus, LILACS* e *Cochrane Library*) conforme protocolo PRISMA. Os blocos de pesquisa foram definidos após a escolha dos descritores e adaptados para cada base: ("Lupus Erythematosus", Systemic") AND ("Lupus Nephritis") AND ("Immune System Phenomena") OR ("Immune System") AND ("Cohort Studies"). **Resultados:** De 142 artigos recuperados, 12 foram incluídos. Resultados mostram que a concentração de neutrófilos circulantes, a produção de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) e o aumento de neutrófilos de baixa densidade (LDNs) estão associados à NL. A análise imuno-histológica mostrou aumento de macrófagos nos glomérulos, enquanto a atividade de desoxirribonuclease estava significativamente reduzida, comprometendo a depuração do DNA extracelular e intensificando a inflamação. Além disso, a quimiocina CXCL13, envolvida no recrutamento de células B e na formação de órgãos linfoides terciários, foi encontrada em níveis elevados nos rins e sangue de pacientes com NL, correlacionando-se com a gravidade da doença e destacando seu papel na perpetuação da tolerância como alvo potencial para novas terapias. A presença de anticorpos IgE específicos para DNA de fita dupla e IgM total foi associada à lesão glomerular e inflamação, podendo ser biomarcadores para monitoramento terapêutico. **Conclusão:** Os resultados ressaltam a complexidade e a heterogeneidade da resposta imune na NL e enfatizam a necessidade de investigações adicionais para melhor compreensão dos mecanismos subjacentes e identificação de alvos terapêuticos e biomarcadores específicos.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; nefrite lúpica; marcadores imunológicos.
Área temática: Imunologia.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

IMPACTOS DA DIETA CONTENDO GLÚTEN NA FERTILIDADE MASCULINA

Alice Hochsprung Cordobé[1], Caroline Wichoski[1], Thuany Amorim de Andrade[1], Livia Carvalho Severiano[1], Jaqueline de Carvalho Rinaldi[1,2]
[1]Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Unifatecie, Paranavaí/PR, Brasil
[2]Docente, Centro Universitário Unifatecie, Paranavaí/PR e Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Brasil.

Introdução: A intolerância não celíaca ao glúten pode promover ruptura da barreira epitelial intestinal, disbiose e inflamação crônica. Alguns estudos, já demonstraram uma possível relação entre o glúten e a infertilidade feminina, entretanto isto não está caracterizado na reprodução masculina. **Objetivo**: Investigar se a ingestão de uma dieta com sobrecarga de glúten influencia a reprodução masculina. **Material e métodos:** Trata-se de uma revisão de literatura narrativa de artigos em português e inglês publicados nos últimos 3 anos e detectados nas bases de dados do PubMed, Scielo, BVS e Google scholar. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram "dieta contendo glúten", "reprodução masculina", "qualidade espermática" e "infertilidade". **Resultados:** Do total de 285 artigos, 162 foram excluídos pela leitura do título e 94 após leitura do resumo, sendo somente 29 artigos disponibilizados gratuitamente na íntegra e relacionados ao tema de estudo. A literatura aponta o glúten como um dos principais disruptores da saúde reprodutiva. Ele é um agente pró-inflamatório que interfere na absorção de nutrientes importantes para o sistema reprodutor, como ferro, ácido fólico, vitamina K, B12, B6. Atua também interferindo na motilidade, produção e qualidade espermática, além de impactar a produção do líquido seminal. A literatura aponta seus efeitos significativos em mudanças hormonais, como hipogonodismo, alterações na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonodal devido ao hipoandrogenismo por produção excessiva de FSH, alterações em prolactina e testosterona. O efeito pró-inflamatório do glúten favorece a cronificação de inflamação pré-existente, impactando também na barreira imunológica e antioxidante testicular. **Conclusão:** Os estudos avaliados neste levantamento bibliográfico sugerem que dietas com sobrecarga de glúten atuam como um importante fator de interferência na saúde reprodutiva masculina. Isto ocorre tanto pelo acometimento dos tecidos e funções testiculares quanto pelo desbalanço hormonal. Os mecanismos envolvidos neste processo ainda estão sendo amplamente estudados no intuito de estabelecer protocolos de prevenção/intervenção.

Palavras-chave: reprodução; revisão de literatura.
Financiamento: A Conpex/Unifatecie pela bolsa de iniciação científica.
Área temática: Morfologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

INTOXICAÇÕES POR DROGAS DE ABUSO NO ESTADO DO PARANÁ DE 2018 A 2023

Ana Claudia Ferreira Ribeiro[1]; Nicole Santos Baccule[2]; Simone Aparecida Galerani Mossini[3]
[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O uso exacerbado de entorpecentes, lícitos ou ilícitos, tem se tornado um grave problema de saúde pública mundial, com um número crescente de usuários no Brasil. Esse aumento acarreta diversas consequências para o indivíduo e para a sociedade. O consumo exagerado dessas substâncias afeta o estado mental do usuário, resultando em complicações nocivas à saúde. **Objetivo:** Analisar as notificações de intoxicações por drogas de abuso no Paraná, registradas no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) entre 2018 e 2023. **Material e métodos:** Estudo descritivo e exploratório, com dados extraídos do DATASUS, referente ao uso de drogas de abuso nos anos de 2018 a 2023 no estado do Paraná. **Resultados:** No Brasil, foram notificados 130.520 casos de intoxicações por drogas de abuso durante o período estudado. Desses, 16.382 (12,55%) ocorreram no estado do Paraná. A faixa etária de 20 a 39 anos apresentou o maior número de notificações, correspondendo a 52,28%. Além disso, houve predominância do sexo masculino (74,73%). O uso abusivo foi a circunstância predominante entre os casos, representando 89,79% do total, quanto ao tipo de exposição, a mais significativa foi a exposição aguda-única (38,82%). Cascavel foi o município paranaense com o maior número de notificações (37,62%), seguido por Curitiba, com 36,31% das notificações. Ao todo, no Paraná, foram notificados 14.047 casos de cura sem sequelas e 168 casos de óbitos decorrentes de intoxicação. **Conclusão:** O número de casos de intoxicação e óbitos é crescente. Assim, as campanhas de prevenção ao uso de drogas devem se concentrar, principalmente, no sexo masculino. Medidas preventivas devem ser implementadas desde a adolescência, a fim de evitar o primeiro contato com entorpecentes, reduzindo a incidência de intoxicações e, consequentemente, o número de óbitos relacionados.

Palavras-chave: intoxicação; drogas de abuso; saúde pública; sistemas de informação em saúde.
Área temática: Toxicologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

DIETA CONTENDO 70% DE GLÚTEN ALTERA ALTURA DO EPITÉLIO PROSTÁTICO

Ana Julia Alencar Herrera[1]; Camila Rodrigues Thom[2]; Anne Caroline Santa Rosa[3]; Gabriela Barone Volce da Silva[3]; Ana Luiza Russo Duarte[3]; Maria Raquel Marçal Natali[3]; Jaqueline de Carvalho Rinaldi[2]

[1]Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá.
[2]Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.
[3]Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A dieta ocidental apresenta diferentes porcentagens de glúten na sua composição. O glúten é uma família de proteínas presentes em cereais como trigo, centeio e cevada. A literatura o descreve como um agente pró-inflamatório, capaz de aumentar a permeabilidade das células epiteliais intestinais, impactar na microbiota e também na reprodução. **Objetivo:** Investigar os impactos de uma dieta contendo 70% de glúten no epitélio prostático. **Material e métodos:** (CEUA#6295090221) Ratos *Wistar* machos foram distribuídos no grupo gluten-free ou G0 (n=5), animais alimentados com dieta sem glúten; controle ou G14 (n=5), cujos animais receberam dieta padrão para ratos, contendo 14% de glúten; e grupo glúten ou G70 (n=5) no qual receberam dieta com 70% de glúten. Após 100 dias de experimento, os ratos foram submetidos a eutanásia, a próstata foi dissecada, pesada, fixada em methacarn e processada histologicamente. Cortes de 4µm foram corados em hematoxilina e eosina para a histopatologia e morfometria da altura epitelial no *Image-Pro Plus* versão 4.5.0.29. A análise estatística empregou o teste *t student*, realizada no *GraphPad Prism* versão 5.01, sendo considerado um nível de significância de 5%. **Resultados:** A dieta não impactou no ganho de peso dos animais. A histopatologia revelou infiltrado inflamatório no estroma prostático acompanhado de alterações epiteliais. Houve redução na altura epitelial em G70 em relação ao G14. Não houve diferença neste parâmetro entre G0 e G14. **Conclusão:** Os resultados deste estudo sugerem que dieta com sobrecarga de glúten impacta o epitélio prostático. Mais estudos são necessários para investigar os mecanismos envolvidos neste processo.

Palavras-chave: dieta; reprodução; saúde humana.
Área temática: Morfologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO NANOENCAPSULADO PARA TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Anibal Salinas Junior[1]; Maria Julia Schiavon Goncalves[1]; Larissa Ferreira de Oliveira[2]; Maria Clara Mazócoli Siqueira[3], Wilker Caetano[4], Paulo Cesar de Souza Pereira[4], Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré[5], Maria Valdrinez Campana Lonardoni[5]

[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá
[3]Acadêmico de Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá
[4]Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá
[5]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A leishmaniose tegumentar (LT) há décadas é tratada com antimoniais pentavalentes, anfotericina B e mais recentemente pentamidinas. Esses fármacos exibem limitações, como toxicidade e indução de resistência. Diante disso, a terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma alternativa promissora, com baixos efeitos colaterais e melhorias estéticas. O azul de metileno (AM), atua como fotossensibilizador na TFD, destaca-se por suas propriedades antimicrobianas e leishmanicidas. **Objetivo:** avaliar a atividade anti-*Leishmania* do AM em nanoformulação, por meio de TFD. **Material e métodos:** para avaliar a toxicidade e propriedades físico-químicas do AM, análises *in silico* foram realizadas nos *softwares SEA (Similarity ensemble approach) Search Server,* e *SwissADME® Swiss Drug Design*. Para o ensaio de viabilidade celular, promastigotas de *L. amazonensis* ($2x10^7$ parasitos/mL) foram colocadas em contato com diferentes concentrações de AM (800, 160, 32, 6 e 1 µg/ mL) nanoencapsulado (1%). Para cada tempo de incubação, uma placa foi iluminada (2h) e outra mantida protegida da luz. Após 24 e 48 horas a 25°C, 100 µL da solução de XTT (500 µg/mL) ativada com PMS (50 µg/mL) foi adicionada aos poços, e as densidades ópticas das colorações geradas medidas em espectrofotômetro (450 nm) após 4h de incubação. A concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC_{50}) foi estimada por comparação com culturas não tratadas. **Resultados:** a análise *in silico* do AM demonstrou afinidade com a enzima glutationa redutase e uma alta probabilidade de ligação, análises físico-químicas e farmacocinéticas demonstraram solubilidade moderada em água, ótima lipofilicidade, biodisponibilidade e baixa toxicidade. Além disso, a atividade anti-*Leishmania* após 24 e 48 horas de incubação com o composto, resultou em valores de IC_{50} 6,2 e 144,8 µg/ mL, respectivamente. **Conclusão:** o AM apresenta potencial anti-*Leishmania;* em tempos menores de incubação parece levar a melhores resultados, porém, mais estudos são necessários para corroborar essa afirmação.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana; terapia fotodinâmica; azul de metileno.
Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (*CAPES*) – Código de Financiamento *001*
Área temática: Parasitologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA APÓS ENXERTO DE BIOCERÂMICA ASSOCIADA A PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) EM CALVÁRIAS DE RATOS *WISTAR*

Antonio Marcos Reissureição Galindo[1]; Antonio Paulo Felice Rodrigues Leite[1]; Isadora Yumi Yokoyama Kaminata[1], Lediane Pedroso Silva[2]; Henrique Lança Fuzeti[3], Guilherme Antônio Zanoni Rodrigues[1], Luzmarina Hernandes[4]

[1]Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Acadêmica de Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá
[4]Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: As biocerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP) obtidas de ossos de peixes são empregadas como materiais para a regeneração óssea por sua biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução. Estes biomateriais podem ser enriquecidos com outras substâncias, a fim de potencializar seu efeito reparador, como o plasma rico em plaquetas (PRP), que contém mais de 300 moléculas biologicamente ativas que podem influenciar na regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar, morfologicamente, a regeneração óssea em calvária de ratos após enxerto de BCP enriquecido ou não com PRP. **Material e métodos:** CEUA/UEM nº 6263280422. Defeitos de tamanho crítico (DTC) foram realizados na calvária de ratos Wistar machos (peso entre 300-400g). Os defeitos foram preenchidos com BCP (controle) ou BCP-PRP (teste) (n=8/grupo). Após 15 dias, os animais foram eutanasiados, as calvárias foram removidas, fixadas e processadas para inclusão em parafina e coloração com H&E. O PRP foi obtido de animais de mesma espécie, antes do procedimento cirúrgico. **Resultados:** Em ambos os grupos, a análise em microscopia óptica evidenciou o crescimento de tecido conjuntivo frouxo, vascularizado, preenchendo o defeito e os espaços entre as biocerâmicas. O crescimento de osso novo, por osteocondução, ocorreu principalmente a partir das bordas do defeito. Nucleações ósseas foram observadas no centro do defeito e crescimento ósseo ocorreu também nos poros dos biomateriais, por osteoindução. Não houve desenvolvimento de fibrose. **Conclusão:** Neste estudo, foi possível concluir que o BCP obtido de ossos de peixe, enriquecido ou não com o PRP, foi biocompatível, osteoindutor e osteocondutor. A regeneração óssea, neste tempo, foi semelhante em ambos os grupos.

Palavras-chave: osteogênese; defeito de tamanho crítico; biocerâmicas.
Financiador (es): CNPq, Fundação Araucária, FINEP.
Área temática: Morfologia.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE APÓS O USO DE FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO (BCP) OBTIDO DE OSSOS DE PEIXES PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA

Antonio Paulo Felice Rodrigues Leite[1]; Antonio Marcos Reissureição Galindo[1]; Lediane Pedroso Silva[2]; Henrique Lança Fuzeti[3], Guilherme Antônio Zanoni Rodrigues[1], Luzmarina Hernandes[4]

[1]Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Acadêmica de Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá
[4]Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Os biomateriais à base de fosfato de cálcio representam uma das principais escolhas para reparo de tecido ósseo. O Bio-Oss® (osso bovino desproteinizado) é considerado o padrão ouro para a regeneração óssea, e é amplamente comercializado e empregado clinicamente para este fim. Por sua vez, o fosfato de cálcio bifásico (BCP), obtido de ossos de peixe, tem demonstrado excelentes resultados no processo de regeneração óssea em estudos experimentais e a avaliação da toxicidade sistêmica é um dos requisitos para sua aprovação por agências reguladoras. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade sistêmica do BCP obtido de ossos de peixes, através da análise da morfologia hepática, após enxerto deste material, na forma particulada, em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Animais enxertados com Bio-Oss foram empregados como controle. **Material e métodos:** CEUA/UEM nº 6263280422. Foram empregados ratos *Wistar* (n=8/grupo), idade 90 dias, submetidos a craniotomia, sob anestesia geral, e realização de defeito de tamanho crítico com enxerto de BCP (teste) e Bio-Oss (controle positivo). Após 90 dias, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico e o lobo hepático direito foi removido, fixado e processado para inclusão em parafina e coloração com HE. As calvárias foram empregadas para estudo da regeneração óssea. **Resultados:** A análise histológica do tecido hepático do BCP e demonstrou a ocorrência de hepatócitos largos com nucléolo evidente, arranjados em fileiras celulares que irradiavam da veia centro-lobular. Os sinusóides hepáticos formavam uma rede complexa e a tríade portal continha os típicos componentes morfológicos. Morfologia semelhante foi observada no parênquima hepático dos animais enxertados com Bio-Oss. **Conclusão:** Nenhum aspecto morfológico que caracterizasse um efeito tóxico do BCP foi observado no fígado dos animais que permaneceram por 90 dias com o biomaterial proveniente de ossos de peixe.

Palavras-chave: enxerto ósseo; efeito sistêmico; toxicidade
Financiador (es): CNPq, Fundação Araucária, FINEP.
Área temática: Morfologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ESTUDO DO EFEITO GENOTÓXICO DE AGROTÓXICOS EM MULHERES DA AGRICULTURA FAMILIAR

Camilla Yumi Endo[1], Thalita Fontana Manocchi[2], Tânia Cristina Alexandrino Becker[3], Priscilla de Laet Santana[3], Simone Aparecida Galerani Mossini[3], Edilson Nobuyoshi Kaneshima[4], Alice Maria de Souza Kaneshima[4].

[1]Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá
[2]Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá
[3]Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá
[4]Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: As mulheres têm importante participação nas atividades rurais e também no cuidado doméstico. Diariamente podem estar expostas aos agrotóxicos após a pulverização ou por meio do contato com objetos e roupas contaminadas. O gene *GSTP1* é responsável pela codificação da enzima glutationa S-transferase Pi 1, relacionada à detoxificação celular de xenobióticos. As mutações neste gene podem ter correlação com o desenvolvimento de neoplasias devido ao uso crônico de pesticidas. **Objetivo:** Detectar a ocorrência de polimorfismo no gene *GSTP1* em mulheres com exposição indireta aos agrotóxicos. **Materiais e métodos:** Este estudo foi realizado com cinco mulheres residentes na área rural de Marialva.Todos os participantes concordaram com o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP), CAAE nº 65018017.7.0000.0104, parecer de nº 6.209.432. Amostra de sangue total foi coletada para posterior extração e amplificação do DNA, utilizando a técnica da PCR-RFLP. O fragmento de DNA amplificado pela técnica da PCR foi submetido à digestão com a enzima de restrição Alw26I (BsmAI) por 3h a 55°C, em seguida submetido à eletroforese em gel de agarose a 3,5%. **Resultados:** Uma mulher apresentou o genótipo Ile-Ile, duas exibiram o genótipo Ile-Val e as demais o genótipo Val-Val. **Conclusão:** De acordo com o descrito em alguns artigos científicos, a ocorrência de lesão no DNA é maior em portadores do genótipo Ile-Ile, sendo comumente encontrado em trabalhadores expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos. Portanto, existe a possibilidade de maior risco para o desenvolvimento de câncer e outras doenças crônicas em mulheres com exposição indireta aos agrotóxicos e portadoras do genótipo Ile-Ile do gene GSTP1.

Palavras-chave: *GSTP1*; mutação; mulheres.
Financiador (es): Fundação Araucária
Área temática: Saúde Coletiva

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs5743836 NO GENE *TLR9* NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Caroline Tavares Moreno[1]; Matheus Braga[2]; Sérgio Grava[2]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[3]; Larissa Danielle Bahls Pinto[3]

[1]Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

[3]Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19) é causada pelo vírus SARS-Cov-2. Dentre outros fatores, a severidade da doença pode ser gerada por características imunes intrínsecas ao hospedeiro. O receptor de reconhecimento de padrões, conhecido como TLR9 (*Toll-like receptor 9*), presente em células imunes inatas e células epiteliais, participa tanto da regulação da resposta imune quanto da resposta inata no combate ao vírus. O polimorfismo rs5743836 do gene *TLR9* foi associado a várias doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, o que sugere que este SNP pode estar relacionado com casos mais graves de COVID-19. **Objetivo:** Avaliar a associação do polimorfismo rs5743836 localizado no promotor do gene *TLR9* na infecção por SARS-CoV-2. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo caso-controle com 110 pacientes diagnosticados com COVID-19, nos Hospitais Universitários de Maringá e de Londrina (CAAE: 38095420.5.0000.0104), sendo 38 casos não severos e 72 casos severos ou críticos. O polimorfismo foi genotipado por meio da técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction Sequence-Specific Primer)* e a análise estatística foi realizada no software SNPStats. Os grupos foram comparados em relação ao genótipo e alelos, e valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** O Teste T mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre a idade média dos pacientes não severos (49,80 ± 15,08) e severos ou críticos (60,80 ± 16,90). Também houve diferença significativa estaticamente entre sexo e doença cardiovascular (CVD). As distribuições de frequência dos genótipos e alelos do TLR9 estavam conforme o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Não houve associação entre os diferentes genótipos relativos ao polimorfismo rs5743836 e a gravidade da doença. Na análise das frequências alélicas, o alelo C foi associado com proteção para gravidade da doença. **Conclusão:** O polimorfismo *rs5743836* do gene *TLR9* está associado com a gravidade da doença.

Palavras-chave: TLR9; POLIMORFISMO GENÉTICO; COVID-19.
Financiador (es): Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM); CNPq.
Área temática: Imunogenética.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

PRÉ-CAQUEXIA E CAQUEXIA AUMENTA O TAMANHO DE NEURÔNIOS NITRÉRGICOS EM CAMUNDONGOS COM CÂNCER INDUZIDO

Eduarda Barbieri Silva[1]; Lucas Sala Bellettini[2]; Jacqueline Nelisis Zanoni[3]
[1]Acadêmico Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Acadêmico de Pós-Graduação(Mestrando) em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá
[3]Docente – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O câncer se demonstra como um problema de saúde pública com propensão a aumentar sua incidência, globalmente. Com o desenvolvimento do câncer origina-se a caquexia. A síndrome de caquexia é constituída pela perda de massa muscular esquelética, com perda ou não de tecido adiposo. Esse distúrbio está relacionado ao desenvolvimento e progressão de tumores, dentre seus diversos tipos, uma vez que promove a inflamação, proteólise, autofagia e lipólise dos tecidos afetados. O sistema nervoso entérico (SNE) também pode ser afetado em decorrência da caquexia, podendo ter o controle da motilidade e secreção alterados. **Objetivo:** Avaliar os neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico imunorreativos a óxido nítrico sintetase (nNOS) no jejuno de camundongos com câncer no período pré-caquético e caquético. **Material e métodos:** Vinte e quatro camundongos com 42 dois dias foram distribuídos em 4 grupos experimentais: C7- Animais controle com 7 dias; PQ7- Animais pré –caquéticos com 7 dias; C14- Animais controle com 14 dias; Q14- Animais caquéticos com 14 dias. Os animais dos grupos PQ7 e Q14 sofreram inoculação de 1x106 células de carcinoma de cólon C26. Ao final do período experimental o jejuno foi coletado e processado segundo à técnica imunohistoquímica, para marcação de nNOS e posterior análise morfométrica. **Resultados:** A área dos neurônios do plexo mioentérico apresentou um aumento de 5,97% (C14 vs C7, $p<0,005$), houve também um aumento de 6,75% (PQ7 vs C7, $p<0,005$), 12,74% (Q14 vs C14, $p<0,005$). **Conclusão:** O desenvolvimento tumoral e a caquexia causaram alterações significativas na área dos neurônios imunorreativos a nNOS, o que pode prejudicar o intestino e todo o funcionamento do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: câncer; caquexia; sistema nervoso entérico.
Financiador (es): CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
Área temática: Morfologia.

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

SCAFFOLDS IMPREGNATED WITH METHYLENE BLUE: A NEW APPROACH FOR THE TREATMENT OF *FUSARIUM OXYSPORUM* INFECTIONS

Gabriela Casa Grande de Matos[1]; Juliana Aparecida Fernandes[2]; Glaucia Sayuri Arita[3]; Wilker Caetano[4]; Maria Clara Mazócoli Siqueira[5]; Weslei Carlos Castilho[6]; Thais Lazzarotto Braga[7]; Isis Regina Grenier Capoci[8]; Érika Seki Kioshima Cotica[9]; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça[10]

[1] Undergraduate student in Biomedicine, State University of Maringá
[2] Postgraduate student (PhD) in Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá
[3] Postgraduate student (Post-Doctorate) in Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá
[4] Professor - Department of Chemistry, Maringá State University
[5 and 6] Undergraduate student in chemistryt, State University of Maringá
[7] Postgraduate student (PhD) by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, State University of Maringá.
[8,9 and 10] Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá

Introduction: Infections by species of the *Fusarium* genus have been a significant challenge for both immunocompromised and immunocompetent patients. Scaffolds are three-dimensional, porous structures used in tissue engineering to promote the formation of new tissues. Insights have indicated the potential for applying these structures in the context of Photodynamic Therapy (PDT). **Objective:** In this study, we tested a scaffold model, impregnated with methylene blue (MB), associated with LED light at 660 nm, which has strong potential to photoactivate MB, and is also ideal for penetration into biological tissues. **Material and methods:** The scaffolds and scaffold liquid solutions contained 1% F108 copolymer, citric acid and MB at concentrations of 0.03198mg/mL and 8 mg/mL, respectively. They were supplied by the UEM's Photodynamic Systems Research Center and the *F. oxysporum* strains were obtained from samples collected at the Clinical Analysis Teaching and Research Laboratory, approved by the ethics committee (n°2.748.843). A red LED (660nm) was used for irradiation. The assays was carried out with the scaffolds and the scaffolds liquid solutions impregnated with MB, and the inoculum standardized at 10^5 UFC/mL. After incubating for 30 minutes in the dark, the plate was irradiated at a fluence of 60J/cm². The antifungal action was assessed by measuring the fungal inhibition halo and qualitative evaluation. **Results:** The PDT+scaffolds liquid+MB solutions, showed antifungal potential, with visible action inhibiting fungal growth. Additionally, PDT+scaffolds+MB had fungicidal activity against *F. oxysporum* resulting in an inhibition halo of 2 cm² after 48 hours of incubation, when compared to the control group **Conclusion:** This study characterized the antifungal activity of PDT+scaffolds+MB, and showed promising results (*in vitro*) for the use of this therapeutic strategy in the context of *F. oxysporum* infections.

Palavras-chave: phototherapy; methylene blue; scaffolds.
Área temática: Microbiology

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE *PRIMERS* PARA ANÁLISE DAS PRINCIPAIS REGIÕES DE INTERESSE CLÍNICO DO GENE *ASXL1* ASSOCIADO A NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Gustavo Henrique Leite Magalhães[1]; Igor Jose Lopes dos Santos[2]; Giovana Paola Zaccarias Bemvides[3]; José Renato Pattaro Júnior [4]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[5].
[1]Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá;
[2]Academico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá;
[3]Acadêmico de Doutorado PBF-UEM;
[4]Acadêmico de Pós-Doutorado PBF-UEM;
[5]Docente PBF-UEM.

Introdução: As doenças mieloproliferativas, originadas na medula óssea, se desenvolvem quando há mutações nas células maduras da linhagem mieloide e proliferam-se descontroladamente excedendo as células saudáveis. Essas mutações podem diferenciar-se de acordo com o gene no qual essa mutação ocorre e sua função. Por conta disso, se fez necessário o estudo dessas mutações genéticas responsáveis pelo desencadeamento de neoplasias mieloproliferativas. **Objetivo:** Este estudo teve por objetivo desenvolver *primers* para realizar a amplificação das regiões interesse clínico do éxon 14 do gene *ASXL1*, frequentemente associado a essas mutações. **Materiais e métodos:** O projeto foi executado conforme aprovação pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UEM (parecer nº 2.364.250/2017). Para o desenho dos primers foram utilizados os softwares Primer Blast e Oligo Analyzer. Objetivou-se *primers* com temperatura de melting de 60 C, 40-60% CG e com ΔG maior que -9 kcal/mol para a formação de homo, heterodímeros e grampos. Utilizou-se a metodologia de PCR seguido de eletroforese em gel de agarose com concentração de 1%, ajustes nos volumes de magnésio e DNTPs, temperatura de anelamento e tempo de extensão foram realizados para obter a amplificação do *ASXL1*. Além disso, as amostras analisadas foram adquiridas do sangue de pacientes através da prestação de serviço do LIG e o gene *HGH* foi utilizado para validar as reações. **Resultados:** Considerando o tamanho da região do éxon em questão (≈2500nts), diferentes *primers* foram testados para que a amplificação acontecesse. Dessa forma, para 20uL de volume, obteve-se que o gene amplifica-se em condições nas quais as concentrações de DNTPs e magnésio sejam de 0,75mM e 1,87mM respectivamente, com os *primers* QA1F e QA2R em temperatura de anelamento a 55ºC. **Conclusão:** Por fim, os resultados obtidos possibilitaram o desenvolvimento de *primers* capazes de amplificar a região do gene *ASXL1*.

Palavras-chave: genes; mutações; *ASXL1* gene.

Área Temática: Imunogenética

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ANÁLISE DA COMPLETUDE DAS VARIÁVEIS DAS NOTIFICAÇÕES DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SRAG) POR HOSPITAIS SENTINELAS DO ESTADO DO PARANÁ NO ANO DE 2023

Hellen Carla Rickli[1]; Ricardo Martins Silva Neto[2]; Matheus Cordeiro Marchiotti[3]; Marcia Edilaine Lopes Consolaro[4]

[1]Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR. Mestre em Enfermagem. Enfermeira Núcleo de Vigilância Epidemiológica Hospital Universitário Regional de Maringá/UEM.
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Bioestatística, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR (UEM)
[3]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR (UEM), Infectologista Núcleo de Vigilância Epidemiológica Hospital Universitário Regional de Maringá/UEM
[4]Docente, Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá/PR (UEM)

Introdução: A maior completude dos dados de notificações de doenças como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) pelos Hospitais Sentinela (HS) influencia diretamente o monitoramento do Ministério da Saúde (MS) e assim nas suas orientações para adoção de medidas necessárias para seu controle. **Objetivo:** Analisar a completude das variáveis sociodemográficas e clínicas das notificações de SRAG pelos HS do Estado do Paraná no ano de 2023. **Material e métodos:** Este foi um estudo descritivo da completude de variáveis constantes da ficha de notificação do MS para SRAG registrados no Sivep-Gripe/MS, com preenchimento baseado nos prontuários médicos. A completude foi mensurada através da proporção de registros preenchidos diferentes de ignorado ou em branco e a frequência dos dados analisada utilizando-se o software R, versão 4.4.1. A completude dos dados disponíveis foi classificada em: excelente (baixa frequência de dados incompletos, ou <5%), boa (5-10%), regular (10-20%), ruim (20-50%) e muito ruim (>=50%). **Resultados:** Foram notificados 14.272 casos de SRAG no Paraná no ano de 2023, a maioria ocorreu em pessoas com raça branca (71,4%) e ≥60 anos (64%). As piores completudes foram regular para febre, tosse, dispneia, desconforto respiratório e saturação de O_2, ruim para escolaridade, dor de garganta, cardiopatia, diabetes e pneumopatias, e muito ruim para asma e imunossupressão. As melhores completudes foram boa raça e internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), e excelente para suporte ventilatório, coleta de amostra, resultado do exame molecular para o agente etiológico, critério de encerramento do caso, classificação final da SRAG e evolução. **Conclusão:** Uma classificação de completude regular, ruim, e muito ruim foi observada em dados extremamente importantes para vigilância de SRAG no Paraná, o que possivelmente deve ter influenciado no seu monitoramento e consequentemente no seu controle no Estado, e as suas possíveis causas estão em análise.

Palavras-chave: Síndrome respiratória aguda grave; monitoramento; completude.

Área temática: Epidemiologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

AVALIAÇÃO DE UM DERIVADO DE SEMICARBAZONA FRENTE A BACTÉRIAS GRAM POSITIVA, NEGATIVA E CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*

Ingrid Beatriz Campanha[1]; Larissa de Souza Brianezi[1]; Maria Luiza Fróes da Motta Dacome[2]; Lygia Beatriz Dziendzik da Silva[2]; Rosilene Fressatti Cardoso[3]; Regiane Bertin de Lima Scodro[3]; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli[3]

[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A tuberculose (TB) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial. Causada por bacilos do Complexo *M. tuberculosis*, é mais comumente associada ao *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), transmitido principalmente por via aérea. A TB pode se apresentar como infecção latente, com o bacilo inativo, ou como doença ativa, quando o sistema imunológico falha em controlar a proliferação bacteriana. O diagnóstico inclui baciloscopia, cultura de escarro e testes moleculares. O tratamento, que durando em média seis meses, envolve múltiplos antibióticos. A adesão é um desafio, pois o abandono pode levar à resistência bacteriana, exigindo tratamentos mais complexos. Por isso, a busca por novos medicamentos é essencial. **Objetivo:** Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de uma molécula derivada de semicarbazona contra uma cepa sensível de Mtb, além de sua ação em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Material e métodos:** A CIM foi determinada pelo método REMA (*Resazurin Microtiter Plate Assay),* utilizando cepas obtidas na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano em 7 dias para Mtb, em 16-24 horas para *E. coli* e *S. aureus*, sob condições ideais de temperatura. **Resultados:** A CIM para Mtb sensível foi de 0,25 µg/mL. Para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a substância não apresentou ação significativa, com CIM <1000 µg/mL, indicando alta seletividade. Isso sugere que a substância é eficaz contra o *Mtb*, com baixa ação sobre outras bactérias reduzindo impacto sobre a microbiota não patogênica e diminuindo a probabilidade de efeitos colaterais indesejados. **Conclusão:** A substância se mostra promissora para o tratamento direcionado da TB, desta forma, estudos subsequentes são essenciais para uma avaliação mais aprofundada de seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: *Mycobaterium tuberculosis;* tuberculose; concentração inibitória mínima.
Financiador (es): CAPES, CNPq.
Área temática: Microbiologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA NO ALVÉOLO DENTÁRIO APÓS EXODONTIA E ENXERTO COM BIOMATERIAIS A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO

Isadora Yumi Yokoyama Kaminata[1]; Camila Girotto da Silva[2]; Luzmarina Hernandes[3]
[1]Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR.

Introdução: Após avulsão dentária, recomenda-se a realização de implante para a manutenção do osso alveolar, entretanto esse procedimento é contraindicado nos indivíduos em crescimento. As cerâmicas bifásicas (BCPs), constituídas por hidroxiapatita e β-fosfatotricálcico são excelentes substitutos ósseos por apresentarem biocompatibilidade e capacidade de osteoindução, mas, por serem frágeis, sua associação com o Nióbio é vantajosa conferindo resistência ao material. **Objetivo**: Quantificar por método estereológico o osso neoformado após exodontia e enxertia do alvéolo com BCP e BCP/Nb2O5. **Material e métodos:** Foram utilizados cortes seriados do dente incisivo superior direito de ratos Wistar, aos 15, 30, 60 e 120 dias após exodontia, corados por Azan (CEUA/UEM:9354050517). As imagens foram observadas com objetiva de 20x. Para a análise quantitativa do osso neoformado nos grupos BCP, BCP-Nb, e Coágulo, utilizou-se lâminas histológicas de 3 ratos para cada tempo. Foram selecionados 3 cortes de cada animal e cada corte foi virtualmente dividido em 15 campos de onde foram capturados 5 campos. Empregou-se um sistema-teste com 130 cruzes em folha de acetato projetado sobre a captura na tela de um notebook Samsung com zoom de 177%. As intersecções das cruzes sobrepostas ao osso novo foram contabilizadas e convertidas em valor relativo de área. Os dados foram submetidos à análise estatística (ANOVA, com pós teste de Tukey) pelo GraphPadPrism8.0.1. **Resultados:** Houve formação óssea ao longo do tempo em cada grupo. Quando comparados os grupos dentro de um período, a maior formação ocorreu no Coágulo. Os alvéolos preenchidos com BCP e BCP-Nb apresentaram médias da área de formação óssea semelhantes ($p>0,05$). O Nióbio não prejudicou a regeneração, que foi semelhante à do grupo BCP. **Conclusão:** As cerâmicas estimularam a osteogênese; o Coágulo foi mais eficiente na regeneração óssea; não houve diferença na área de osso neoformado no alvéolo com BCP/Nb2O5.

Palavras-chave: avulsão dentária; regeneração óssea; biomateriais.

Financiador (es): Fundação Araucária (FA) e Financiadora de Estudos e Projetos (Finep)

Área temática: Morfologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ACELLULAR PORCINE PLACENTAL BIOMEMBRANES AS A NOVEL BIODRESSING FOR TISSUE REPAIR: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION

Jaqueline de Carvalho Rinaldi[1]; Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida[2]; Luan Stefani Lima[3]; Beatriz Lopomo[3]; Rafael Oliveira Bergamo[3]; Giovanna Vitoria Consani Santos[3]; Mariana Sversut Gibin[4]; Mauro Luciano Baesso[5]; Luzmarina Hernandes[6]; Ana Claudia Oliveira Carreira[7]
[1]Professor – Postgraduation Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringa, Maringá/PR
[2]Postgraduate Student (Doctorate) in Anatomy of Domestic and Wild Animals, University of São Paulo, São Paulo/SP
[3]Undergraduate Student in Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo/SP
[4]Postgraduate Student (Doctorate) in Physics, State University of Maringa, Maringá/PR
[5]Professor – Department of Physics, State University of Maringa, Maringá/PR
[6]Professor – Department of Morphological Sciences, State University of Maringa, Maringá/PR
[7]Professor – Center of Human and Natural Sciences, Federal University of ABC, Santo André/SP

Introduction: The development of scaffolds derived from decellularized tissues has emerged as a promising approach for tissue reconstruction, biomimetic microenvironments and tissue repair therapies. Among the several available sources to obtain acellular and non-immunogenic matrices to modulate as bioactive biomaterials, fetal membranes have been explored. Therefore, this study aimed to establish an optimized protocol to generate acellular porcine placental membranes for tissue engineering applications. **Materials and Methods:** For that, term porcine placentas (n=5) were decellularized using a combination of detergents (0.1% SDS and 0.5% Triton X-100) and ultrasonication. To evaluate the decellularization efficiency, DNA quantification and DAPI staining were performed. To evaluate the scaffolds structure, histological, ultrastructural and biomechanical analysis were carried out. Then, samples were collected for FTIR and Raman spectroscopy for physico-chemical evaluation. Moreover, samples were sterilized and cultured with L929 and YS cell lines for 10 days to attest cytocompatibility in vitro. Cell viability and the interaction between cells and scaffolds were assessed. **Results:** DNA quantification revealed a decrease of 90% in the content and DAPI staining showed nuclei absence. Histological analysis did not show significant alterations in collagen, GAGs and elastic fibers distribution. Scanning electronic microscopy (SEM) did not indicate any signs of fiber degradation or signs of cellular debris. Biomechanical evaluation showed no differences between native and decellularized membranes. Spectroscopy data showed no alterations in all bands related to collagen, elastin, proteoglycans and GAGs content in the scaffolds compared to the native tissue. Regarding the cellular assays, SEM images evidenced both cells attached and anchored on the scaffolds. Cell viability rates were also above 90%, which attested biomaterial's cytocompatibility. **Conclusion:** In conclusion, the generated acellular placental membranes had a preserved microstructure, composition, allowed cell attachment, and survival.

Keywords: placenta; tissue engineering; decellularization.
Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Thematic Area: Morphology

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

IMPACTOS DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* NO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS BALB/C

Jhonatan da Silva Fernandes[1]; Izadora Volpato Rossi[2]; Camila R Thom[3]; Marcel Ivan Ramirez[2]; Gessilda Alcantara Nogueira de Melo[3]; Jaqueline de Carvalho Rinaldi[3]
[1]Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR/Curitiba
[3]Programa de Pós- Graduação em Biociências e Fisiopatologia /UEM

Introdução: O protozoário *Trypanosoma cruzi* é conhecido por desencadear a doença de Chagas. Um dos mecanismos do parasito para evasão da resposta imune do hospedeiro é através das vesículas extracelulares. Neste sentido, a infecção pode impactar diferentes sistemas orgânicos e ocasionar complicações viscerais, como cardiomegalia, megaesôfago e megacólon. Porém, ainda são escassos estudos investigando seus impactos no sistema reprodutor. **Objetivo:** Analisar os efeitos da inoculação experimental de *T. cruzi* (clone CL Brener) na morfologia testicular de camundongos Balb/c. **Material e métodos:** (CEUA#5864311022) Os animais foram alocados em três grupos (n=4): o grupo infectado (GI) recebeu a inoculação (via intravenosa) de 1x105 tripomastigotas derivados de cultura celular (clone CL Brener) em solução salina estéril (PBS); grupo infectado + VEs (GIV), que recebeu vesículas extracelulares provenientes do contato de *T. cruzi* (clone CL Brener) com células de epitélio intestinal (Caco-2); o grupo controle (GC) no qual houve a ausência de infecção, recebendo somente solução salina estéril. Após 30 dias de infecção os animais foram submetidos a eutanásia, os testículos foram pesados e coletados. A morfologia testicular foi avaliada em cortes corados por hematoxilina e eosina. A avaliação de proporção dos compartimentos testiculares foi investigada pelo método de Weibel. **Resultados:** Não houve alteração no peso testicular entre os grupos experimentais. A avaliação histopatológica revelou presença de infiltrado inflamatório no estroma testicular, porém sem desencadear alteração em sua histoarquitetura quando avaliada pelo método de Weibel. **Conclusão:** A infecção pelo *T. cruzi* potencializada por vesículas extracelulares não desencadeou alterações significativas na histoarquitetura testicular. Avaliação mais detalhada e aprofundada se faz necessário para investigar os outros aspectos morfológicos não abordados neste estudo.

Palavras-chave: histopatologia; doença de chagas; método de weibel.
Financiador (es): CAPES / CNPq
Área temática: Morfologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

AS CONSEQUÊNCIAS COGNITIVAS PROMOVIDAS PELA SÍNDROME PÓS-COVID E SUA CORRELAÇÃO COM A ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS

Juliane Camila Crubelati[1], Leticia Naomi Matsumoto[1], Larissa Ferreira de Oliveira[2], Karla Larissa TrassiGanaza Domingues, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose[3], Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré[3], Jorge Juarez Vieira Teixeira[3], Maria Valdrinez Campana Lonardoni[3]

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

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

[3]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Há relatos de casos de pacientes com COVID-19 que apresentam uma gama de sintomas crônicos após a infecção. Dentro desses sintomas, o comprometimento do status cognitivo e de memória caracteriza umas das principais reclamações. **Objetivos**: Realizar uma revisão sistemática de literatura para buscar evidências que mostrem a relação entre o comprometimento de memória após a COVID-19 e as alterações laboratoriais associadas. **Material e métodos:** A pesquisa, seguindo parâmetros PRISMA, foi realizada nas bases de dados Pubmed, Scopus, Web of Science, Embase, Cochrane, EBSCO e LILACS, utilizando descritores pré-definidos, na qual o bloco 1 referia-se à COVID-19, o bloco 2 à termos de cognição e o bloco 3 para a COVID-longa. Os critérios de inclusão abrangiam artigos originais que analisavam amostras biológicas de pacientes com alterações cognitivas na COVID-longa. O protocolo da revisão foi registrado no PROSPERO. **Resultados**: Foram incluídos 35 artigos. As evidências sugerem que a depuração imunológica retardada do antígeno SARS-CoV-2 e a maior quantidade ou duração da carga de antígeno viral no trato respiratório durante a COVID-19 aguda está diretamente ligada à COVID longa. Pacientes que sofreram hipóxia durante a fase aguda são mais suscetíveis ao desenvolvimento dos sintomas cognitivos persistentes. Ademais, a ativação da via da quinurenina, bem como alterações nos níveis de proteína C reativa, TNF-β, G-CSF, IFN-α2, IL13, IL15, IL7 e dímero-D também foram associados à COVID-longa. Em nível molecular, a presença de alelos, como o APOE ε4, eram comumente encontrados em pacientes com reclamações relacionadas à cognição e memória. Por fim, alterações nos níveis de alguns hormônios, como o cortisol, podem indicar um possível envolvimento adrenal. **Conclusão**: É essencial o acompanhamento a longo prazo dos pacientes que contraíram a COVID-19, já que os sintomas desenvolvidos como sequelas podem ser indicados por alterações nos exames laboratoriais e impactar na qualidade de vida dos mesmos.

Palavras-chave: síndrome pós-COVID; déficit de memória; COVID-19.
Financiador (es): CAPES
Área temática: Pesquisa clínica

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS DE INH CONTRA CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES

Larissa de Souza Brianezi[1]; Ingrid Beatriz Campanha[1]; Lorena Moran Bombonato[2]; Laiz Mangini Cicchelero[3]; Jean Eduardo Meneguello[4]; Fabio Vandresen[5]; Katiany Caleffi-Ferracioli[6]; Regiane Bertin de Lima Scodro[6]; Rosilene Fressatti Cardoso[6]

[1]Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR.
[2]Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.
[3]Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.
[4]Acadêmico de Pós-Graduação (Pós Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.
[5]Docente – Departamento Acadêmico de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina/PR.
[6]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A tuberculose (TB), segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso no mundo, atrás apenas da COVID-19. Devido ao longo período de tratamento, muitos pacientes abandonam, isso pode resultar na seleção de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) com resistência aos fármacos antituberculose. A isoniazida (INH) é um dos principais medicamentos na terapia antituberculosa, mas a resistência a este fármaco tem reduzido a eficácia do tratamento. Diante disso, a síntese de análogos da INH apresenta uma ação promissora para desenvolvimento de um novo fármaco a ser utilizado no tratamento da TB. **Objetivo:** Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de derivados de INH contra *Mtb* resistentes à INH e multirresistente. **Material e métodos:** Foram utilizadas *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ como cepa padrão sensível, cepa resistente, à INH 3360 e multirresistentes 109 e 3614, pertencentes a micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Os 11 derivados de INH foram sintetizados em parceria com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a CIM determinada pela técnica *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA). **Resultados:** A CIM dos derivados de INH contra *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ variou de 0,25 - 2 µg/mL. Nas cepas 3360, 109 e 3614 as CIM variaram de 0,25 - 16 µg/mL, 4 a >2.048 µg/mL e 2 a 512 µg/mL, respectivamente. O derivado ACH-01 demonstrou valores de CIMs inferiores a 2 µg/mL, sendo mais baixos em comparação com os outros derivados, contra todas as cepas avaliadas. **Conclusão:** Os derivados de INH mostraram atividade antimicrobiana promissora contra *M. tuberculosis* resistentes à INH, com CIM variando em valores competitivos quando comparados ao fármaco de referência INH. Embora alguns derivados tenham apresentado maior CIM comparado ao da INH, esses demonstraram potencial atividade no combate em *M. tuberculosis* resistentes, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antituberculosa.

Palavras-chave: tuberculose; isoniazida; resistência a múltiplos medicamentos.
Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Área temática: Microbiologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ATIVIDADE DA HIPERICINA EM PARASITOS, FUNGOS E BACTÉRIAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Larissa Ferreira de Oliveira[1]; Maria Julia Schiavon Gonçalves[2]; Juliane Camila Crubelati[2]; Aline Ávila Brustolin[3]; Camila Alves Mota[3]; Mariana de Souza Terron Monich[4]; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré[4]; Jorge Juarez Vieira Teixeira[4]; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose[4]; Maria Valdrinez Campana Lonardoni[4]

[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Laboratório de Imunologia Clínica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[4]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A hipericina (H) é uma naftodiantrona de origem natural, derivada de plantas da família *Hypericum* com extenso potencial terapêutico, destacando-se sua atividade antimicrobiana. O composto possui propriedades fotossensibilizadoras, podendo ser associado a terapia fotodinâmica (TFD). Doenças infecciosas parasitárias, fúngicas e bacterianas são altamente variáveis, endêmicas e clinicamente muito relevantes, entretanto, por muitas vezes as opções terapêuticas disponíveis são defasadas, tóxicas ou pouco eficazes. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática sobre a ação antimicrobiana da H em fungos, parasitos e bactérias de interesse médico. **Material e métodos:** A revisão sistemática utilizou o norteador de revisões PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic* reviews *and Meta-Analyses*). Foram realizadas buscas de artigos nas bases de dados PubMed, Embase, Scopus, Web of Science, COCHRANE e Lilacs utilizando dois blocos de busca: Bloco 1 (referentes ao composto) "*AND*" Bloco 2 (referente aos microrganismos e anti-infectivos). Os artigos obtidos foram analisados para inclusão por leitura de título/resumo e posteriormente por leitura completa de manuscritos. Apenas artigos experimentais *in vivo* ou *in vitro* foram aceitos. Dados de interesse foram extraídos dos manuscritos aceitos. **Resultados:** De 305 artigos recuperados, 51 foram aceitos pela leitura de título e resumos e 31 foram incluídos na revisão, dos quais apenas 7 não citaram o uso de TFD. A atividade sob parasitos, fungos e bactérias foi avaliada em 4, 11 e 17 artigos, respectivamente. Vários gêneros de fungos e bactérias foram estudados e apenas parasitos do gênero *Leishmania* foram avaliados. Todos os trabalhos demonstraram algum nível de eficácia da H sob os microrganismos tanto *in vitro* quanto *in vivo,* sendo mais efetiva a associação com a TFD e sistemas de entrega de fármacos. **Conclusão:** A H demonstra atividade *in vitro* e *in vivo* contra diferentes espécies de parasitos, fungos e bactérias, especialmente quando associada a TFD, mostrando-se uma boa alternativa terapêutica.

Palavras-chave: hipericina; doenças infecciosas; anti-infectivos.
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: Farmacologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A INFECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* SOBRE AS FIBRAS COLÁGENAS DO CÓLON EM CAMUNDONGOS BALB/C

Laura Lavagnoli Barchi[1]; Anna Carolina Ponhozi[1]; Maria Gabriela Lima da Silva[2]; Amanda Gubert Alves dos Santos[3]; Izadora Volpato Rossi[4]; Marcel Ivan Ramirez[5]; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo[3].

[1]Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[3]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá
[4]Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR
[5]Pesquisador – Instituto Carlos Chagas, Fiocruz/PR

Introdução: *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, transmitida pelo inseto barbeiro. A doença tem fases aguda e crônica, podendo a última levar a complicações cardíacas e digestivas. Durante a infecção são geradas vesículas extracelulares (VEs) que podem alterar a virulência e patogenicidade da cepa infectante. **Objetivos:** Avaliar se a infecção por *T. cruzi*, na presença das VEs, causam alterações quantitativas das fibras colágenas total, do tipo I e III no cólon de camundongos. **Materiais e métodos:** O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM sob protocolo nº5864311022. Utilizou-se 30 camundongos divididos em seis grupos: um controle e cinco infectados com *T. cruzi* e inoculados com diferentes VEs. Após 23 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados, um segmento do cólon foi coletado para análise histológica. Cortes de 5 µm foram corados com Picrosirius Red. As imagens foram capturadas com e sem luz polarizada, 16 de cada. A análise estatística confirmou a normalidade dos dados, com ANOVA e pós-teste de Tukey, considerando 5% de significância. **Resultados:** Quando comparado com o grupo controle não infectado, há diminuição da área das fibras colágenas tipo I mensuradas em todos os grupos e diminuição de fibras colágenas tipo III mensuradas nos grupos com vesículas de provenientes do cultivo do parasito com a linhagem celular C2C12. **Conclusão:** A perda das fibras colágenas no cólon causada pela infecção por *T. cruzi* é um dos fatores principais que levam aos problemas gastrointestinais na doença de Chagas. Entender como essa perda ocorre, a relação com as vesículas extracelulares, e suas implicações é crucial para desenvolver tratamentos.

Palavras-chave: doença de Chagas; colágeno; intestino.

Financiador: Capes e CNPQ

Área temática: Parasitologia

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
2024
23 A 25 DE OUTUBRO
PBF-UEM

CARACTERIZAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DA ERITROSINA B EM ASSOCIAÇÃO À POLÍMEROS SOBRE *Trichophyton rubrum*

Letícia Carolinne Rissi Zanelli[1]; Thais Lazzarotto Braga[2]; Maria Clara Mazócoli Siqueira[3]; Weslei Carlos Castilho[3]; Maria Antonia Botelho Pereira[3]; Maria Julia Lameu Nascimento[3]; Juliana Aparecida Fernandes[4]; Wilker Caetano[5]; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça[6]; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski[6]

[1]Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá;
[2]Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Química, Universidade Estadual de Maringá;
[3]Acadêmicos de Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá;
[4]Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá
[5]Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá
[6]Docentes – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A Eritrosina B (ERI) é um corante rosa-cereja da família dos xantenos que tem sido utilizada como fotossensibilizador (FS) no contexto da Terapia Fotodinâmica (TFD). Esta técnica envolve a aplicação local ou sistêmica de um FS que, ao absorver luz, em comprimentos de onda específicos, gera espécies reativas de oxigênio, eliminando células-alvo. Infecções por *Trichophyton rubrum* são desafiadoras devido a crescente resistência antifúngica, e persistência nos sítios de infecção como unha e pele. Assim, novas abordagens antifúngicas são necessárias. Nosso grupo de pesquisa tem acumulado experiência acerca do uso de ERI com ação antifúngica, e este trabalho buscou avaliar a ação antifúngica da ERI+TFD, isoladamente e no contexto polimérico, almejando aplicação deste FS em nanofibras, caracterizadas como curativos médicos. **Material e métodos:** *T. rubrum* ($1x10^6$ Unidades Formadoras de Colônia/mL), ERI isolada (100-0,19µM) e associada a polímeros (F108 e PVA 10%m/V, ácido cítrico 20%m/V + ERI 100µM) foram testados para avaliação antifúngica, utilizando Luz LED verde (510 nm)/20 minutos. *T. rubrum* foi pré-incubado com a ERI isolada (10 minutos) e associada a polímeros (30 minutos), na ausência de luz. Para todos ensaios, os seguintes controles foram usados: ERI na ausência (+Eri-Luz) ou presença de luz (+Eri+Luz) e controle fúngico (-Eri-Luz). A menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico, foi determinada como Concentração Fungicida Mínima (CFM) expressa em Log_{10} UFC/mL, e analisada por *test t-student* com intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** a ERI isolada inibiu totalmente o crescimento fúngico nas concentrações 100-12,5 µM, e redução expressiva do crescimento fúngico em 6,25 µM. Adicionalmente, a fotoativação da ERI associada à polímeros, mostrou eficiente ação antifúngica, eliminando totalmente o crescimento fúngico. **Conclusão:** A ação antifúngica da ERI+TFD mostrou promissora utilização deste FS em nanofibras, que são estruturas de curativos com aplicabilidade clínica importante.

Palavras-chave: inativação fotodinâmica; onicomicose; dermatomicose.
Financiador (es): CNPq
Área temática: Microbiologia

SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024
PBF-UEM

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE RIFAMPICINA ASSOCIADA COM TIMOL EM *Mycobacterium kansasii*

Leticia Julia Faria[1]; Camile Yukari Ocochi[1]; Camilla de Lima Ruffini[1] Renata Alexandre de Oliveira[2]; Giulienne Karla Pereira da Silva[2]; Carolina Trevisolli Palomo[3]; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli[4]; Regiane Bertin de Lima Scodro[4]; Rosilene Fressatti Cardoso[4].

[1]Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.
[2]Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) no Programa de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.
[3]Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) no Programa de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.
[4]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: Micobactérias não tuberculosas (MNT) causam infecções denominadas micobacterioses. Atualmente o tratamento é longo, com combinações de antimicrobianos que nem sempre leva a cura do paciente. Portanto torna-se necessário buscar alternativas terapêuticas para o tratamento dessas micobacterioses. O timol (TIM) vem sendo estudado devido suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais. Adicionalmente, alguns estudos com a combinação de antimicrobianos com TIM demonstraram ação sinérgica contra o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e MNTs. **Objetivo** Avaliar atividade de rifampicina (RIF) combinada com TIM contra *Mycobacterium kansasii*. **Material e métodos:** A concentração inibitória mínima (CIM) de RIF e TIM foi determinada pelo método *resazurin broth microdilution assay*, e a atividade da combinação de RIF com TIM, pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay*. A avaliação da ação combinada de RIF e TIM foi calculada pelo índice de concentração inibitória fracionária (FICI): FICI = (CIM A + B/CIM A) + (CIM B + A/CIM B), sendo que valores de FICI ≤ 0,5 indica ação sinérgica entre RIF e TIM, FICI > 0,5-4 indiferença e FICI >4 antagonismo entre RIF e TIM. Adicionalmente foi determinado o fator modulador (FM), sendo FM = (CIM A/CIMA + B). Valores de FM ≥ 4 foram considerados significativos para ação modulatória de TIM na atividade de RIF. **Resultados:** A CIM de TIM foi 256 µg/mL e para RIF variou de 0,06 - 256 µg/mL. Na combinação de RIF com TIM, FICI variou de 0,31 - 0,75 e FM variou 2 - 32. A combinação mostrou efeito sinérgico nas três linhagens estudadas de *M. kansasii,* que apresentavam resistência à RIF, com redução significativa na CIM de RIF (250 µg/mL para 32 µg/mL). **Conclusão** Concluímos que a combinação de RIF e TIM mostrou sinergismo contra linhagens de *M. kansasii*, tornando promissor a continuidade de estudos do TIM no tratamento das micobacterioses.

Palavras-chave: timol; *Mycobacterium kansasii*; sinergismo.
Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.
Área temática: Microbiologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ESCORPIONISMO: PANORAMA DE ACIDENTES NO PARANÁ DE 2019 A 2023

[1]Lyriel de Oliveira Santos, [2]Nicole Santos Baccule; [3]Érica Benassi Zanqueta; [3]Raul Gomes Aguera; [4]Simone Aparecida Galerani Mossini.

[1]Graduanda de Biomedicina - Centro Universitário Ingá - Uningá;
[2]Discente Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia - Universidade Estadual de Maringá
[3]Docente - Centro Universitário Ingá - Uningá;
[4]Docente Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia - Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O acidente escorpiônico no Brasil é um problema importante de saúde pública, devido a rápida evolução e incidência, especialmente em períodos de alta umidade e temperatura. Os escorpiões do gênero *Tityus*, em particular o *Tityus serrulatus*, conhecido como escorpião amarelo, são os principais causadores de acidentes moderados e graves no Paraná. **Objetivo:** Fornecer um panorama sobre os acidentes escorpiônicos notificados no estado do Paraná, entre os anos de 2019 a 2023. **Materiais e métodos:** Os dados foram extraídos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, com foco nas ocorrências de acidentes escorpiônicos dos últimos 5 anos. As variáveis analisadas foram: faixa etária, intervalo entre picada/atendimento, soroterapia, local da picada e acidentes relacionados ao trabalho. **Resultados:** Os dados obtidos apontam 22.021 casos notificados, com crescente número de casos nos anos analisados, 3.385 notificações em 2019 e 6.149 no ano de 2023. Apenas 8,6% dos casos tiveram relação com a ocupação dos acidentados, com maior ocorrência nas profissões de pedreiro, trabalhador agropecuário e da agricultura. As faixas etárias mais acometidas foram de 40-59 anos (30,97%) e 20-39 anos (30,73%). Além disso, em 76,70% das notificações o tempo entre o acidente e o atendimento ocorreu em menos de 1 hora e em 13.45% entre 1 e 3 horas. Os locais anatômicos com maior incidência de picadas foram os dedos das mãos (22,78%), seguidos das mãos (20,43%) e pés (18,97%). A soroterapia não foi necessária em 92,28% dos casos. **Conclusão:** Nos 5 anos analisados observa-se o dobro de acidentes notificados no último ano (2023) analisado, quando comparado a 2019, evidenciando uma situação preocupante. Faz-se necessário maior foco das autoridades responsáveis quanto à prevenção e manejo destes acidentes, que podem ser reduzidos com medidas simples adotadas pela população e Estado.

Palavras-chave: Envenenamento por escorpião; Animais peçonhentos; Saúde pública.
Área temática: Toxicologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

ATIVIDADE DO TERMOGEL DE *Curcuma longa* E ÓLEO ESSENCIAL DE *Pectis brevipendunculata* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L) amazonensis*

Maria Julia Schiavon Gonçalves[1]; Estela Mesquita Marques[2]; Renato Sonchini Gonçalves[3]; Larissa Ferreira de Oliveira[4]; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré[5]; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose[6]; Maria Valdrinez Campana Lonardoni[7]

[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA
[3]Docente – Laboratório de Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA
[4]Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[5,6,7]Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A leishmaniose tegumentar é classificada como uma doença tropical negligenciada cujo tratamento atual por vezes não é eficaz e pode apresentar toxicidade para o paciente. Sendo assim, se faz necessário a busca por novas alternativas terapêuticas. **Objetivo:** Avaliar o potencial terapêutico da combinação em termo gel do óleo essencial de *Pectis brevipendunculata* e *Curcuma longa* sob formas promastigotas de *Leishmania (leishmania) amazonensis* (*LLa*). **Material e métodos:** Foram realizados ensaios sob promastigotas de *LLa*. Os termos géis foram adicionados em concentrações de 17,5 µg/mL a 2,19 µg/mL e 50 µg/mL a 6,25 µg/mL para o OE de *Pectis brevipendunculata* e *Curcuma longa*, respectivamente. Também foi testado o termo gel puro como controle negativo. As placas foram incubadas e lidas em 24, 48 e 72h por espectrofotometria após teste colorimétrico para avaliação de viabilidade mitocondrial. Todos os compostos foram fornecidos pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão. Os dados quantitativos foram analisados pelo Software Microsoft Excel 2021. **Resultados:** O termogel combinado apresentou ação anti-*Leishmania* em todos os tempos testados, resultando em uma porcentagem de morte superior a 88% na maior concentração testada, já nas menores concentrações apresentou morte de 24,15%, 21,35% e 10,40% para 24, 48 e 72h respectivamente. A IC_{50} foi de 12,42µg/mL de *Curcuma longa* com 4,35 µg/mL de OE de *Pectis brevipendunculata* para 24h; 9,78µg/mL de *Curcuma longa* com 3,42 µg/mL de OE de *Pectis brevipendunculata* para 48h; e 17,12µg/mL de *Curcuma longa* com 5,99 µg/mL de OE de *Pectis brevipendunculata* para 72h. O termo gel puro não apresentou atividade anti-*Leishmania*. **Conclusão:** A combinação do termo gel apresentou ação anti-*Leishmania* em todas as concentrações testadas, apresentando um potencial terapêutico para a LT com potencial efeito aditivo ou sinérgico entre os compostos.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar; *Curcuma longa*; *Pectis brevipendunculata*
Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.
Área temática: Parasitologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

POLIMORFISMO DO GENE *GSTP1* OBSERVADO EM AGRICULTORES FAMILIARES E SUA RELAÇÃO COM O CONSUMO DE BEBIDAS ALCÓOLICAS

Thalita Fontana Manocchi[1]; Camilla Yumi Endo[2]; Edilson Nobuyoshi Kaneshima[3]; Simone Aparecida Galerani Mossini[4]; Alice Maria de Souza Kaneshima[4].
[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR
[2]Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá
[3]Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá
[4]Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Polimorfismo em genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos, como a glutationa S-transferase P1 – *GSTP1* pode ter influência na ação genotóxica de alguns agrotóxicos que podem induzir o estresse oxidativo e acarretar em lesão no DNA, principalmente quando a detoxificação celular é ineficiente. O consumo de álcool é um fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer e sua interação com os agrotóxicos pode alterar o material genético do agricultor. **Objetivo:** Avaliar o polimorfismo em relação a substituição de Ile por Val no éxon 5 do gene *GSTP1* e o consumo de álcool entre os agricultores. **Material e métodos:** Estudo observacional-transversal envolvendo 15 agricultores familiares, sendo 10 etilistas, com consumo semanal de bebidas alcoólicas e 5 não etilistas. Todos os participantes assinaram o TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP), CAAE nº 65018017.7.0000.0104 parecer de nº 6.209.432. As informações foram coletadas por meio de questionário previamente validado e amostras de sangue foram utilizadas para análise do polimorfismo genético do gene *GSTP1*, utilizando a técnica PCR-RFLP. As informações coletadas foram organizadas no Microsoft Excel 2016 e o *p*-valor foi calculado pelo teste do qui-quadrado. **Resultados:** Todos os participantes relataram contato atual com agrotóxicos e do total de etilistas, 80% apresentaram genótipo Ile-Ile, portanto, podem ter capacidade de detoxificação dos xenobióticos diminuída. Enquanto que entre os não etilistas, 80% apresentaram o genótipo Ile-Val (capacidade de detoxificação dos xenobióticos normal). O etilismo associado à exposição ocupacional, foi significativamente relevante para a ocorrência de polimorfismos no gene estudado ($p<0,05$). **Conclusão:** Os agricultores etilistas e portadores do genótipo Ile-Ile podem apresentar maior predisposição ao desenvolvimento de neoplasias, mas deve ser salientado que a utilização de Equipamento de Proteção Individual (EPI) também deve ser levada em consideração, necessitando de pesquisas adicionais.

Palavras-chave: álcool; agrotóxicos; *GSTP1*.
Financiador (es): Fundação Araucária
Área temática: Patologia

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

DESENVOLVIMENTO DE *SOFTWARE* PARA ANÁLISE *IN-SILICO* DA LIGAÇÃO HLA-PEPTÍDEO: PROVA DE CONCEITO E APLICAÇÕES NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Victor Hugo de Souza[1]; Jeane Eliete Laguila Visentainer[2]
[1]Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. Docente, Universidade Cesumar, Maringá, PR.
[2]Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

Introdução: As moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) desempenham um papel fundamental na resposta imune adaptativa, sendo cruciais para a apresentação de antígenos a linfócitos T. Estudos demonstram uma forte relação entre variações em genes do HLA e a patogênese de diversas doenças autoimunes, incluindo a espondilite anquilosante (EA), na qual o alelo *HLA-B*27:05* está associado a um prognóstico mais severo. Ferramentas *in-silico* têm se tornado essenciais para aprimorar o entendimento da função do HLA, tanto no contexto de doenças como na área de transplantes de órgãos. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo desenvolver e validar a prova de conceito de um *software* para análise *in-silico* da ligação HLA-peptídeo, oferecendo uma plataforma para estudos sobre imunogenicidade e interação molecular. **Material e métodos:** O *software* foi desenvolvido na linguagem R (versão 4.2.2) com interface Shiny, utilizando diversos pacotes e a ferramenta netMHCpan para avaliar a imunogenicidade das interações HLA-peptídeo com base no valor de concentração inibitória (IC50). Como prova de conceito, o *software* analisou 25 proteínas relacionadas à proteômica da EA e 25 proteínas humanas aleatórias (grupo controle), comparando suas IC50 por meio do teste de Wilcoxon ($P<0,05$). Os peptídeos derivados dessas proteínas foram analisados em relação à sua capacidade de ligação à molécula do *HLA-B*27:05*. **Resultados:** A ferramenta permitiu a análise instantânea de proteínas, totalizando mais de 18 mil peptídeos em interação com o HLA-B27. Apesar da robustez da análise ser comprovada, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as IC50 das proteínas do grupo EA em comparação ao grupo controle ($P=0,45$). **Conclusão:** Essa análise rápida e simples foi possível apenas com o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática como essa, e seus resultados comprovam sua eficiência e praticidade para análises de alta complexidade envolvendo HLA no transplante de órgãos e estudo de doenças.

Palavras-chave: MHC; bioinformática; imunogenética.
Financiador (es): CNPq e LIG-UEM
Área temática: Imunogenética

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

IMPACT OF NUTRITIONAL CONDITIONS ON *Candida albicans* BIOFILM FORMATION

Vitória Nielsen de Souza[1]; Alexandro Vieira Lena[1]; Glaucia Sayuri Arita[2]; Juliana Aparecida Fernandes[3]; Karina Mayumi Sakita[2], Ana Luiza Vasconcelos[1], Isis Regina Grenier Capoci[4], Érika Seki Kioshima[4], Patrícia de Souza Bonfim[4];

[1] - Postgraduate student (Master degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringá, PR
[2] - Posdoctoral Researcher, Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringá, PR
[3] - Postgraduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringá, PR
[4]- Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

Introduction: *Candida albicans* is a commensal microorganism of the human microbiome; it is also the most prevalent fungal pathogen of humans. A significant number of infections caused by *C. albicans* can be attributed to the fungus's inherent ability to form biofilms. Biofilm is the ability of the microorganism to structure itself in a highly organized way through the formation of an extracellular polymeric matrix, allowing yeasts to attach themselves to surfaces and become more resistant to host defense and the action of antifungals. **Objective:** Evaluate the influence of the environment to which *C. albicans* is exposed on its ability to form biofilms (in vitro). **Material and methods:** *Candida albicans* SC5314 at a concentration of 1.10^6 CFU/mL, was testing the two culture media with different constitution, Tryptone Soy Broth (TSB) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI). After 2h of incubation at 35ºC, the cells were washed and a new culture medium was added. The plates were incubated at 35ºC for 24h. Afterwards, the biofilm was washed twice and scraped to assess the viability of fungal cells (CFU) and total mass (cells and matrix) using crystal violet. **Results:** The number of viable cells in the biofilm in RPMI (5,58 Log_{10}CFU/mL) was lower than the in TSB (7,11 Log_{10}CFU/mL). Interestingly, the total mass was higher for RPMI (3,80 absorbance of total biomass/cm^2) compared to the biofilm formed in TSB (1,45 absorbance of total biomass/cm^2). **Conclusion:** *C. albicans* can form complex biofilms on a variety of substrates under different environmental conditions. Our hypothesis was confirmed, showing important differences between the biofilms formed in RPMI and TSB. We can highlight that the greater biomass formed in RPMI can impact the scope of the research and the biological conclusions, such as modulation of the structure, virulence and susceptibility of *C. albicans*.

Key words: *Candida albicans;* biofilms; culture medium.
Thematic area: Microbiology

PBF-UEM
SEMINÁRIOS INTERDISCIPLINARES EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA
23 A 25 DE OUTUBRO
2024

BIOMARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM VOLUNTÁRIOS PRATICANTES DE MEDITAÇÃO TRANSCENDENTAL NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ: UM ESTUDO PRELIMINAR

Wanderson Rocha Oliveira[1*], Nayara Germano de Oliveira[2], Heloisa Bergamasco Vettor[3], Lucas Schimmack Redondo[4], Felipe Lisboa Conegero[5], Solange Marta Franzói de Moraes[6]

[1, 2] Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado, Mestrado) na Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Fisiologia do Exercício – UEM, Maringá, PR, Brasil

[3, 4, 5] Acadêmico de Graduação em Educação Física na Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Maringá/PR

[6] Docente - Programa de Pós-Graduação no Departamento de Ciências Fisiológicas na Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Maringá/PR

Introdução: As doenças cardiovasculares têm sido reconhecidas como a principal causa de óbitos no mundo. Sua presença pode ser modulada pelos hábitos de vida, que correspondem àqueles modificáveis através de estratégias diversas, dentre eles: peso corporal, alimentação, sedentarismo e estresse diário. Este último podendo influenciar o indivíduo a executar comportamentos capazes de elevar o risco cardiovascular, como o uso de fumo, bebida alcoólica; também alterando o padrão de sono. **Objetivo:** Relatar o perfil de biomarcadores de risco cardiovascular em voluntários de meditação transcendental na Universidade Estadual de Maringá (UEM). **Material e métodos:** Estudo observacional de corte transversal-longitudinal, de amostragem por conveniência, aprovada pelo COPEP sob o número CAAE 77175724.7.0000.0104. Realizadas análises bioquímicas e descritivas simples. **Resultados:** A amostragem foi composta por 63 voluntários, na idade de 31-50 anos (50,79%), 18-30 anos (26,98%) e acima de 51 anos (22,22%). Quanto ao sexo, a predominância foi do sexo masculino (60,31%). 22,22% (n=14) dos participantes possuíam o hábito de fumar e 39,68% (n=25) utilizavam bebidas alcoólicas. Em relação à prática de atividade física, apenas 22,22% (n=14) realizavam de forma regular. O Índice de Massa Corporal foi de 49,20% (n=31) para sobrepeso/obesidade, 46,03% (n=29) para eutrofia e 3,17% (n=2) para subnutrição. 44,44% (n=28) apresentaram hipercolesterolemia, 39,68% (n=25) hiperglicemia em jejum, 82,53% (n=52) níveis de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) elevados, 22,22% (n=14) para hipertrigliceridemia e 46,03% (n=29) níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) elevados. **Conclusão:** Os achados apontam a presença de indicadores de risco cardiovascular na população em estudo. A alteração dos biomarcadores foi associada ao perfil lipídico dos indivíduos, podendo estar relacionado aos hábitos de vida dos participantes, bem como sofrer influência dos mesmos. Maiores estudos são necessários para avaliar a influência da prática da meditação transcendental nestas variáveis.

Palavras-chave: saúde cardiovascular; meditação transcendental; saúde pública.
Área temática: Saúde coletiva