



Anais do

**VI**

International Meeting  
of Biosciences &  
Physiopathology

**X**

Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## APRESENTAÇÃO

No **Anais do VI International Meeting of Biosciences and Physiopathology e X Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia** estão publicados os resumos expandidos e resumos simples dos trabalhos científicos apresentados no evento organizado pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, realizado de 18 a 20 de setembro de 2019.



Programa de Pós-Graduação  
em Biociências e Fisiopatologia



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

# ORGANIZAÇÃO

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

### REITORIA

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

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

### CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

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

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

### DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA

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

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

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

Profa. Dra. Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo – **Coordenadora**

Profa. Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini – **Coordenadora Adjunta**

Luciene Menchon Moura da Silva - **Secretária**

## **COORDENAÇÃO GERAL**

Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana  
Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo

## **COMISSÃO ORGANIZADORA**

Amanda Gubert Alves dos Santos  
Carla Betania Huf Ferraz Campos  
Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana  
Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo  
Gláucia Sayuri Arita  
João Vítor Perez de Souza  
Laise Nayana Sala Elpidio  
Luciane Menchon Moura da Silva  
Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles  
Mariana Arrevolti  
Simone Aparecida Galerani Mossini  
Valéria Aparecida Baquetti Mosca

## **STAFF**

Camila Barros Galinari  
Daniella Renata Faria  
Franciely Machado da Silva  
Gabrielle Palma Feifer  
Isabella Harumi Yonehara Noma  
Jodiane Mendes Ferreira  
Josselyn Lilibeth Solórzano Napa  
Larissa Cordeiro Mayer



International Meeting  
of Biosciences  
& Physiopathology  
Simpósio de Biotecnologias  
Aplicadas à Farmácia

## STAFF

Maria Gabriela Lima Da Silva

Maria Júlia Sobreiro Lôbo Dias

Maria Luiza de Mello do Canto

Maria Vitória Felipe de Souza

Marina Rolim

Natalia Lourenço Mari

Pamela Carolina de Souza

Paulo Daniel Maria

Pedro Marquetti Pereira

Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado

Sara Andressa Caldeirão Janz

Sarah Cristina Aragão

Wanderson Rocha Oliveira

Waylla Albuquerque de Jesus

Yasmim Farias de Brito

# SUMÁRIO

## Resumos expandidos

### Ferramentas para inovação

CAN BIOMARKERS PREDICT BLOODSTREAM INFECTION BY GRAM-POSITIVE OR GRAM-NEGATIVE BACTERIA?.....	16
INSIGHTS ABOUT CELL WALL REMODULATION TRIGGERED BY RIFAMPICIN IN <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
REPOSITIONING EBSELEN AS ANTIFUNGAL OPTION TO TREAT INVASIVE ASPERGILLOSIS.....	26
PROTEOMIC ANALYSIS OF INDUCED POLYMYXIN RESISTANT <i>Klebsiella pneumoniae</i> AND ITS SUSCEPTIBLE COUNTERPART WITH KPC PRODUCING PROFILE.....	32

### Novas abordagens para tratamento das infecções fúngicas

NEW APPROACH FOR TREATMENT OF DERMATOPHYTOSIS BY HYPERICIN-MEDIATED PHOTODYNAMIC .....	39
PRÓPOLIS: ANTIFÚNGICO NATURAL QUE ATUA SOBRE O CICLO CELULAR DE FUNGOS DE INTERESSE MÉDICO SEM AFETAR CÉLULAS ANIMAIS.....	45
HYPERICIN-PHOTODYNAMIC THERAPY AS ALTERNATIVE TREATMENT FOR ONYCHOMYCOSIS .....	51
EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE LMM6 COMPOUND AGAINST <i>Candida tropicalis</i> .....	57

### Estratégias para o controle e combate a infecções causadas por bactérias MDR

RESGATE DA AÇÃO DA POLIMIXINA B PELA TIOSSEMICARBAZIDA DERIVADA DO (-)-CANFENO CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS .....	64
METHICILLIN-RESISTANT <i>Staphylococcus aureus</i> : LOCAL DISSEMINATION AMONG HOSPITALIZED PATIENTS AND HEALTHY DOGS AND THEIR OWNERS .....	70
SEQUENCIAMENTO TOTAL DO GENOMA DE UM ISOLADO DE <i>Raoultella planticola</i> RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS .....	76
DETECÇÃO DO GENE <i>mecA</i> EM <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE ACADÊMICOS E PACIENTES ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA ODONTOLÓGICA .....	82

### Infecções sexualmente transmissíveis no trato genital masculino e feminino: patogênese e carcinogênese

PERSISTENCE AND CLINICAL RELEVANCE OF ZIKA VIRUS IN THE MALE GENITAL TRACT.....	89
Kin17 EM CÂNCER CERVICAL: EXPRESSÃO BASAL PROTEICA <i>in vitro</i> E EM TECIDOS CERVICAIS .....	95
PREVALENCE AND TYPE CONCORDANCE OF CERVICAL AND OROPHARYNGEAL HUMAN <i>Papillomavirus</i> IN HIV-POSITIVE WOMEN AND HIV-NEGATIVE PAIRED CONTROLS IN BRAZIL .....	101

### Fatores genéticos e estratégias para o controle da tuberculose e hanseníase

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM HANSENÍASE .....	108
EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE ESTREPTOMICINA COM O INIBIDOR PIPERINA EM <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	114
NEW COMPOUNDS WITH POTENTIAL ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY .....	120
(-)-CAMPHENE-BASED THIOSEMICARBAZONES AS AGENTS AGAINST RESISTANT MYCOBACTERIA ...	124

### Neurogastroenterologia

ANÁLISE ESTRUTURAL DO DUODENO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 TRANSGÊNICOS DISLIPIDÊMICOS QUE SUPEREXPRESSAM A APOLIPOPROTEÍNA apoCIII HUMANA.....	131
EFEITO DO 5-FLUOROURACIL NO ÍLEO DE RATOS <i>Wistar</i> TRATADOS COM DOSE EQUIVALENTE À ADMINISTRADA EM HUMANOS .....	137
TRATAMENTO COM ROSUVASTATINA INTENSIFICA ALTERAÇÕES NO DUODENO DE CAMUNDONGOS SWISS ( <i>Mus musculus</i> ) INFECTADOS POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	142



IMPACTS OF PERINATAL GLYPHOSATE EXPOSURE ASSOCIATED TO HIGH-FAT DIET IN ADULTHOOD ON JEJUNUM OF MICE .....	148
SLEEP RESTRICTION PROMOTES CHANGES IN COLON OF WISTAR RATS .....	154

#### Modelos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e analíticos

AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE COMPRIMIDOS DE AMOXICILINA EM VOLUNTÁRIOS OBESOS .....	161
USO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA SUPOSTADA POR FIBRA OCA (HF-LPME) PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE COCAÍNA E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM AMOSTRAS DE CABELO .....	167
REDUCED ORAL BIOAVAILABILITY OF AMOXICILLIN IN RYGB BARIATRIC SUBJECTS.....	173
PHARMACODYNAMIC EVALUATION OF POLYMYXIN B COMBINATION TO PREVENT MUTANT SELECTION IN MULTIDRUG-RESISTANT <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	179
DETERMINAÇÃO DE ANFETAMÍNICOS EM CABELO: VALIDAÇÃO ANALÍTICA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (HF-LPME) E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	185

#### Estudos na biologia tecidual cardíaca, intestinal e da reparação óssea

ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO PLEXO CARDÍACO E DO TECIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO DE CAMUNDONGOS C57BL6 TRANSGÊNICOS PARA A APOLIPOPROTEÍNA CIII HUMANA: RESULTADOS PARCIAIS.....	191
PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS COM DEFEITO CRÍTICO UTILIZANDO SCAFFOLDS DE HIDROXIAPATITA- $\beta$ -TRICÁLCICO FOSFATO ( $\beta$ CP) COM CURCUMINA .....	197
EFEITO DO 5-FLUOROURACIL SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS WISTAR .....	202
EFEITOS DA ABORDAGEM TERAPÊUTICA COM 5-FLUOROURACIL NO INTESTINO GROSSO DE RATOS WISTAR .....	207
BONE REGENERATION IN CRITICAL-SIZE DEFECTS IN RAT'S CALVARIA AFTER CALCIUM PHOSPHATE CERAMIC IMPLANTATION .....	213

#### Epidemiologia aplicada à biociências e fisiopatologia

PREDISPOSIÇÃO DO HOSPEDEIRO DIABÉTICO NO DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS AGENTES DE DERMATOMICOSSES .....	219
EVIDÊNCIAS DO USO DO PROBIÓTICO <i>Lactobacillus reuteri</i> PARA REDUÇÃO DA CÓLICA INFANTIL EM BEBÊS ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE OU PREDOMINANTEMENTE COM LEITE MATERNO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA .....	225
CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIC PREDICTORS IN PREGNANT WOMEN WITH HEREDITARY/ACQUIRED THROMBOPHILIA TREATED IN THE HEALTH SERVICES OF MARINGÁ .....	231

## Resumos simples

#### Bioquímica clínica

ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA CAUSA ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS. 239	
TRATAMENTO COM 5-FLUOROURACIL EM RATOS ALTERA PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO RIM .....	240
EXTRATO DE CASCA DE JABUTICABA ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ) INIBI A $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA <i>in vivo</i> .....	241

#### Citologia clínica

CO-INFECÇÕES ENTRE <i>Papillomavirus</i> HUMANO (HPV) E MICOPLASMAS GENITAIS EM MULHERES ASSINTOMÁTICAS .....	243
---	-----

#### Epidemiologia

EVOLUÇÃO DAS INTERNAÇÕES PSIQUIÁTRICAS POR ESTRESSE NA REGIÃO SUL DO BRASIL .....	245
DENGUE VIRUS SPATIAL DISTRIBUTION ON 15th REGIONAL HEALTH .....	246
INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS NOTIFICADOS NO SUL DO BRASIL.....	247
EVOLUÇÃO DO NÚMERO DE CIRURGIAS BARIÁTRICAS E CIRURGIAS PLÁSTICAS REPARADORAS PÓS BARIÁTRICAS NO ESTADO DO PARANÁ .....	248



PERFIL DA SAÚDE MENTAL ENTRE HOMENS E MULHERES NO SUL DO BRASIL .....	249
MORTALIDADE POR REAÇÕES ADVERSAS A MEDICAMENTOS: ANÁLISE DE TENDÊNCIA NO BRASIL ...	250
EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF HEPATITIS B CHRONIC CARRIERS UNDERGOING TREATMENT IN THE 10 <sup>TH</sup> REGIONAL HEALTH OF PARANÁ STATE, BRAZIL .....	251
MORTALIDADE EM MULHERES JOVENS POR CÂNCER DE MAMA: REVISÃO SISTEMÁTICA .....	252
LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA NO ESTADO DO PARANÁ.....	253
ANÁLISE GEOESPACIAL DE ÓBITOS POR QUEDAS DE IDOSOS NO SUL DO BRASIL, DE 2008 À 2017 .....	254
INJÚRIA HEPÁTICA INDUZIDA POR MEDICAMENTOS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS: REVISÃO SISTEMÁTICA.....	255

### Farmacologia

EFEITO HEPATOPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA ( <i>Lavandula officinalis</i> ) NA LESÃO HEPÁTICA AGUDA INDUZIDA POR PARACETAMOL EM CAMUNDONGOS .....	257
LOW DOSE OF QUERCETIN-LOADED PECTIN/CASEIN MICROPARTICLES REDUCES THE OXIDATIVE STRESS IN ARTHRITIC RATS .....	258
EFFECTS OF ALPHA-TOCOPHEROL-LOADED POLYCAPROLACTONE NANOPARTICLES ON INFLAMMATION AND SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN ARTHRITIC RATS.....	259
VALIDAÇÃO DE MODELO FARMACOCINÉTICO FISIOLÓGICO (PBPK) DE CETAMINA POR VIA INTRAVENOSA EM CÃES .....	260

### Fisiologia

LOW PROTEIN DIET IN ADOLESCENT RATS PROGRAMS CARDIOVASCULAR DYSFUNCTION IN ADULTHOOD.....	262
DIETA RICA EM GORDURA OFERTADA A RATOS DURANTE A ADOLESCÊNCIA PROGRAMA PARA SÍNDROME METABÓLICA NA VIDA ADULTA.....	263
INFLUENCE OF CANOLA OR SOYBEAN OIL ON LIVER FATTY ACID COMPOSITION IN MICE FED WITH HIGH- CARBOHYDRATE DIET .....	264

### Imunologia

TNF- $\alpha$ PROFILE IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS ADULTHOOD.....	266
ZIKA VIRUS DIAGNOSIS: A SISTEMATIC REVIEW .....	267
PERFIL DE CITOCINAS TH17 NAS DIFERENTES FASES DO LEITE HUMANO .....	268
QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE INTERLEUCINA 5 EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE....	269
DIFERENÇAS NOS NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-16 DE HOMENS E MULHERES EM UM ESTUDO COM PERIODONTITE.....	270
INFLUÊNCIA DO IFN-GAMA E IL-4 NO CURSO DA PERIODONTITE .....	271

### Microbiologia

GENOTYPICAL PROFILE OF HEPATITIS B VIRUS IN CHRONIC CARRIERS PATIENTS OF CASCAVEL CITY, PARANÁ, BRAZIL .....	273
ANÁLISE PRELIMINAR DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS ISOLADAS EM SUPERFÍCIES INANIMADAS DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI) DE UM HOSPITAL DE TRÊS LAGOAS, MS.....	274
SELEÇÃO DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO PARA GERAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DENGUE .....	275
EFICÁCIA DA COMBINAÇÃO DE EUGENOL E SORBATO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE <i>Escherichia coli</i> .....	276
FORMAÇÃO DE BIOFILME FÚNGICO EM BALÃO INTRAGÁSTRICO .....	277
PROMISSING SYNERGISTIC ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEW OXADIAZOLE- AMPHOTERICIN B ASSOCIATIONS .....	278
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Eucalyptus urograndis</i> SOBRE <i>Candida spp</i> .....	279
ATIVIDADE ANTI- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> E CITOTOXICIDADE DE PIPERINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS.....	280
FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS .....	281



SYNERGISTIC EFFECT OF AN OXADIAZOLE AND CONVENTIONAL ANTIFUNGALS AGAINST <i>Candida albicans</i> .....	282
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE UMA SÉRIE DE DERIVADOS ACILHIDRAZÔNICOS DO ÁCIDO TIOFÊNICO FRENTE A <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	283
FIRST GENETIC CHARACTERIZATION OF THE CHIKUNGUNYA VIRUS CIRCULATING IN SOUTHERN BRAZIL .....	284
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> DE UMA SÉRIE DE NACILHIDRAZONAS DERIVADAS DA ISONIAZIDA.....	285
ELECTROSPINNING: UMA FERRAMENTA NA ELABORAÇÃO DE POLÍMEROS NANOESTRUTURADOS APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DE TECIDOS BIOLÓGICOS .....	286
ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS EM BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS .....	287
PRESENÇA DE FUNGOS DERMATÓFITOS EM ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS ENCAMINHADOS AO CENTRO DE CONTROLE DE ZONÓSES DE MARINGÁ .....	288
N-ACYLIDRAZONE-DERIVED IMPROVES THE ACTION OF AMPHOTERICIN B AGAINST <i>Paracoccidioides</i> spp .....	289
AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MORTALIDADE EM BACTEREMIAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ .....	290
PROTEOME OF <i>Staphylococcus aureus</i> AFTER ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY ROSE BENGAL .....	291
SELEÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS CONTRA MICOBACTÉRIAS .....	292
MONITORAMENTO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE <i>Acinetobacter</i> spp. RECUPERADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA NO PERÍODO DE DEZ ANOS .....	293
PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS NANOESTRUTURADOS APLICADOS À ENGENHARIA DE TECIDOS.....	294
SINERGISMO ENTRE PIPERINA E RIFAMPICINA EM MICOBACTÉRIAS.....	295
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Palicourea crocea</i> .....	296
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO EM BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS.....	297
PESQUISA DE ISOLADOS <i>Staphylococcus aureus</i> SENSÍVEL A METICILINA CARREADORES DO GENE <i>mecA</i> EM UM HOSPITAL DE ENSINO.....	298
TECIDO NANOESTRUTURADO DERIVADO DE EXOSQUELETO DE CRUSTÁCEOS E POLIPROLACTONA APLICADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TECIDO RECONSTITUÍDO <i>in vitro</i> .....	299
EPIDEMIOLOGIA DIFERENCIAL DE <i>Tinea corporis</i> E <i>Tinea capitis</i> EM PACIENTES ATENDIDOS NO LEPAC NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ.....	300
PARTICULARIDADES DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i> spp. NA IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF) .....	301

## Morfologia

ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS ABSORTIVAS PRESENTES NO JEJUNO DE <i>Mesocricetus auratus</i> INFECTADOS PELA <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	303
ROSUVASTATINA PROMOVE AUMENTO DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO DUODENO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	304
INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> NÃO ALTERA NÚMERO DE NEURÔNIOS MIENTÉRICOS DO JEJUNO DE HAMSTERS .....	305
PROBIOTIC SUPPLEMENTATION AND ITS EFFECT ON REPAIR AND RESISTANCE OF INTESTINAL TISSUE IN WISTAR RATS .....	306
ANÁLISE DA HISTOARQUITETURA DA PRÓSTATA DORSOLATERAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE 5-FLUORURACIL.....	307



ANÁLISE DE MASTÓCITOS SEROTONINÉRGICOS NO JEJUNO DE HAMSTER INFECTADOS COM <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	308
EFEITO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA SOBRE AS CRIPTAS DO CÓLON DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA apoCIII HUMANA .....	309
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS RINS DE CAMUNDONGOS SWISS TRATADOS COM BAIXA DOSE DE CICLOSPORINA A .....	310
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR DIFERENTES CEPAS DE <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> PROMOVE REDUÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO TIPO I DO JEJUNO DE <i>Mesocricetus auratus</i> .....	311

#### Neurociências

EFEITO NEUROPROTETOR DO TRATAMENTO COMBINADO DE ASPIRINA E BENZNIDAZOL SOBRE OS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS COLINÉRGICOS NO MODELO MURINO DA DOENÇA DE CHAGAS .....	313
MOLECULAR COMPOSITION OF THE ENTERIC PERINEURONAL NET .....	314

#### Parasitologia

CHRONIC INFECTION BY <i>Toxoplasma gondii</i> DOES NOT PROMOTE CHANGES IN PANETH CELLS IN THE DUODENUM AND JEJUNUM OF C57BL/6 MICE .....	316
PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM GLUCANTIME® INTRAPERITONEAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ..	317
INFECÇÃO AGUDA POR <i>Toxoplasma gondii</i> REDUZ O NÚMERO DE NEURÔNIOS SUBMUCOSOS VIPÉRGICOS NO DUODENO DE RATOS WISTAR .....	318
INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> CAUSA ALTERAÇÕES INDICATIVAS DE ATIVIDADE IMUNE NO ÍLEO DE HAMSTERS .....	319
QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO ÍLEO E CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS CRONICAMENTE POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	320
REDUÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES NO ÍLEO DE HAMSTERS INFECTADOS POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	321
ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS SWISS NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Giardia muris</i> .....	322
TRATAMENTO COM <i>Echinacea purpurea</i> ALTERA O NÚMERO DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS APÓS INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	323
ASSOCIATION OF MATRIX METALLOPROTEASE 9 AND WELL-CONTROLLED INFECTION OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS .....	324
OS MASTÓCITOS DO ÍLEO DE HAMSTERS NÃO SOFREM ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS APÓS 120 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	325
CONTAGEM DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO INTESTINO DE HAMSTERS INFECTADOS POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	326
DIMINUIÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DE MASTÓCITOS NO CÓLON DE HAMSTERS INFECTADOS POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	327
CHARACTERIZATION OF TWO SUBPOPULATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES DERIVED FROM THE INTERACTION OF <i>Trypanosoma cruzi</i> WITH HOST CELLS.....	328
CAMUNDONGOS SWISS E BALB/C COMO MODELOS EXPERIMENTAIS NO ESTUDO DA GIARDÍASE: COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS.....	329
QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DE PANETH NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 SUBMETIDOS À INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	330
A INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> NÃO ALTERA O COLÁGENO DO ÍLEO DE HAMSTERS .....	331
INFECÇÃO AGUDA POR <i>Toxoplasma gondii</i> REDUZ O NÚMERO DE GÂNGLIOS VIPÉRGICOS NO PLEXO SUBMUCOSO DO DUODENO DE <i>Rattus norvegicus</i> .....	332
ÁREA DE GÂNGLIOS MIENTÉRICOS E SUBMUCOSOS NO DUODENO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO AGUDA POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	333

EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Tetradenia riparia</i> E CETOCONAZOL OU ANFOTERICINA B NA EVOLUÇÃO DA LESÃO TEGUMENTAR POR LEISHMANIOSE EM CAMUNDONGOS BALB/C.....	334
AVALIAÇÃO NAS MUCINAS PRESENTES NO ÍLEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL.....	335
DANOS MITOCONDRIAIS EM <i>Leishmania amazonensis</i> INDUZIDOS PELO 1,2-BIS[3-(2- METIL-1,3-DIOXOLAN-2-IL)FENIL]DITELANO .....	336
MELHORA NA DETECÇÃO PARASITOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Giardia duodenalis</i> EM AMOSTRAS DE FEZES COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA.....	337

### Educação em saúde e ciências

PRODUÇÃO DE UM VÍDEO ANIMADO COMO FERRAMENTA PARA A DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA NA ÁREA DA SAÚDE .....	339
A INFLUÊNCIA DA MÍDIA NOS HÁBITOS ALIMENTARES DA CRIANÇA E O PAPEL DA ESCOLA E DOS RESPONSÁVEIS NESSE PROCESSO.....	340
ABORDAGENS METODOLÓGICAS RELACIONADAS AO ESTUDO DE CIÊNCIAS.....	341
A HORTA SUSTENTÁVEL COMO PRÁTICA EDUCATIVA EM SAÚDE AMBIENTAL: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA .....	342
OS DESAFIOS PARA ENSINO DE CIÊNCIAS NO ATUAL CONTEXTO EDUCACIONAL BRASILEIRO .....	343
CONFEÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS DA CLIVAGEM DO ZIGOTO PARA O ENSINO DE EMBRIOLOGIA HUMANA.....	344
AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA MONITORIA DE HISTOLOGIA NO PROCESSO DE ENSINO-APRENDIZAGEM DA EDUCAÇÃO BÁSICA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA .....	345
REFLEXÕES ACERCA DOS DESAFIOS DO ENSINO DE CIÊNCIAS PARA EDUCAÇÃO DOS SURDOS .....	346
CONTRIBUIÇÕES DO ENSINO DE CIÊNCIAS NA EDUCAÇÃO INFANTIL PARA O DESENVOLVIMENTO DA CIDADANIA .....	347
METODOLOGIAS ATIVAS NO ENSINO DE CIÊNCIAS: UMA ABORDAGEM TEÓRICA .....	348

### Patologia

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENICO DO 7,2-DIMETILBEZENTRACENO UTILIZANDO A TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	350
---	-----

### Saúde coletiva

DIFERENÇAS RACIAIS NA TAXA DE MORTALIDADE POR CÂNCER COLORRETAL NAS REGIÕES DO BRASIL, PERÍODO 2012 A 2016 .....	352
AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS PRÉ ESCOLARES DE UM CENTRO MUNICIPAL DE EDUCAÇÃO INFANTIL DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ-PR, BRASIL.....	353
CUIDADOS DE ENFERMAGEM A PACIENTES COM HEMOFILIA .....	354
SAÚDE PREVENTIVA COM ENFOQUE NA IMUNIZAÇÃO: UM OLHAR DA ENFERMAGEM .....	355
RELAÇÕES ENTRE ESTILO DE VIDA E CASOS DE SÍNDROME METABÓLICA .....	356
CUIDADOS DE ENFERMAGEM NA MELHORIA DA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM NEOPLASIA MAMÁRIA.....	357
ATUAÇÃO DO ENFERMEIRO NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE INFANTIL .....	358
TESTAGEM RÁPIDA DE HIV E SÍFILIS NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE DO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRES .....	359
ATUAÇÃO DO ENFERMEIRO NA ASSISTÊNCIA DO PACIENTE COM SÍNDROME DE DOWN .....	360
VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E EDUCAÇÃO EM SAÚDE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA ENDÊMICA DE MARINGÁ-PR, 2018-2019 .....	361
ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM AO PORTADOR DE FIBROSE CÍSTICA .....	362
A INFLUÊNCIA DA EPIGENÉTICA NOS DISTÚRBIOS MENTAIS: REFLEXÕES SOBRE AS PRÁTICAS DE ASSISTÊNCIA EM SAÚDE.....	363

CUIDADOS DA ENFERMAGEM NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE INFANTIL.....	364
ATUAÇÃO DO ENFERMEIRO NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DE MAMA: UM OLHAR DO ACADÊMICO DE ENFERMAGEM .....	365
ASSISTÊNCIA DA ENFERMAGEM AO PORTADOR DE ANEMIA FALCIFORME .....	366
A IMPORTÂNCIA DA AFETIVIDADE NO PROCESSO DE ENSINO E APRENDIZAGEM .....	367
IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS APROVADOS COMO MEDICAMENTOS PELA ANVISA.....	368
ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM NA MELHORIA DA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES HEMOFÍLICOS .....	369
ASSISTÊNCIA DE PROFISSIONAIS DA SAÚDE NO COMPORTAMENTO SUICIDA .....	370
MORTALIDADE BRASILEIRA POR OBESIDADE: O REFLEXO DA TRANSIÇÃO NUTRICIONAL .....	371
ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM NO PARTO HUMANIZADO .....	372

### **Toxicologia**

EXPOSIÇÃO AO ESCITALOPRAM NA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS CAUSA ABORTO E MALFORMAÇÕES EM FETOS .....	374
PADRONIZAÇÃO DA DERIVATIZAÇÃO E DA TÉCNICA DE DPX PARA DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIUREIA NA URINA.....	375
PERFIL DE POSITIVIDADE PARA COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES INTERNADOS EM CLÍNICA DE RECUPERAÇÃO EM MARINGÁ-PR .....	376
TENTATIVAS DE SUICÍDIO POR MEDICAMENTOS EM JOVENS ATENDIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES DE MARINGÁ, PARANÁ .....	377
CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL DE FLORICULTORES À PRAGUICIDAS INIBIDORES DAS COLINESTERASES – RESULTADOS PRELIMINARES HUMANIZADO .....	378
CARACTERIZAÇÃO DO TABAGISMO ENTRE OS ACADÊMICOS DO CURSO DE BIOMEDICINA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ.....	379

### **Vigilância em saúde e ambiental**

EFEITO LARVICIDA E OVOCIDA DE EXTRATOS DE <i>Crotalaria pallida</i> SOBRE O VETOR ARBOVIRÍDICO, <i>Aedes aegypt</i> .....	381
---	-----



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Resumos expandidos



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Ferramentas para inovação



## CAN BIOMARKERS PREDICT BLOODSTREAM INFECTION BY GRAM-POSITIVE OR GRAM-NEGATIVE BACTERIA?

Daniela Dambroso Altafini<sup>1,3</sup>; Mayara Assumpção Lolis Baveloni<sup>2</sup>; Nathália de Oliveira Bizetti Cano<sup>2</sup>; Gregório Contardi Korneiczuk<sup>2</sup>; Alessandra Arruda Lemos<sup>2</sup>; Bruno Buranello Costa<sup>3</sup>; Josmar Mazucheli<sup>4</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (PhD student), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>2</sup>Medical Graduate student, Medical Microbiology Laboratory, State University of Maringa, PR

<sup>3</sup>Maringa University Hospital, State University of Maringa, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Statistic, State University of Maringa, PR

<sup>5</sup>Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringa, PR

e-mail: ddaltafini@uem.br

### 1. INTRODUCTION

Bloodstream infections (BSI) are defined by the presence of viable microorganisms, mostly bacteria or fungi, which can be confirmed by positive blood culture. BSI may be preceded or concomitant with a local infectious focus such as pneumonia, urinary tract infections, endocarditis, meningitis and others. This infectious process can lead to changes in the patient's laboratory results, clinical and hemodynamic parameters resulting in a systemic inflammatory process called sepsis (1,2).

BSI are among the leading causes of morbidity and mortality and their incidence are increasing in both Europe and the United States with rates ranging from 76 and 189 per 100,000 inhabitants. Mortality is high ranging from 20 to 30%, despite advances in antimicrobial therapy and intensive care. Cases that progress to sepsis result in approximately six million deaths each year, with a significant increase in hospital costs (3,4).

Both BSI caused by Gram-positive (BSI-GP) or Gram-negative (BSI-GN) bacteria are highly prevalent and may progress to sepsis. In Brazil, BSI-GN were more frequent (72%) than BSI-GP in Intensive Care Unit. Higher incidence of BSI-GN was evidenced in more severe patients, suggesting a distinct immunopathophysiological behavior between GN and GP bacteremia that may influence laboratory test results (5–7).

Appropriate antimicrobial therapy has been used to reduce mortality among patients with BSI-GN and when started early has a favorable effect on critically ill patients. Rapid recognition of sepsis and early initiation of therapy are critical for improving the patient's clinical condition. However, the choice of the appropriate antimicrobial class has become complex due to increased antibacterial resistance (8,9).

Blood culture is considered the gold standard in the diagnosis of BSI and sepsis, as it enables the identification of the microorganism and guides the rational use of antimicrobial. However, low positivity rates, false positive and negative results are limitations of the method that lead to an increase in hospital costs. Another important limitation is the delay in results, on average three days, which causes a delay in adequate treatment. These are factors that prompt the search for other faster and more effective methodologies, to prove the BSI and direct the treatment (5,10).

Biomarkers are protein components or other macromolecules present within organisms that have the ability to inform about biological processes and regulatory mechanisms. It is a measurable indicator of the severity, presence of any disease state or the effects of pharmacological treatment. Thus, many studies are conducted to relate possible biomarkers with pathological conditions, especially in cases of bacterial infections (11).

*In vitro* studies report important differences between GP and GN inflammation signaling pathways that may reflect different host responses verified by routine laboratory tests (12). Ratzinger et al. (2015) evaluated that laboratory markers cannot be used to predict different classes of bacterial pathogens. However, these authors pointed out that monocyte count was considered the marker with discriminatory power (5).

This shows that current studies are not able to direct to a single conduct. Considering the complexity of the subject and the results still need further explanation, the aim of this study was to evaluate the relationship between the values of routine biomarkers at different times (48h, 24h and 0h) before the collection of blood cultures from patients with BSI- GP or BSI-GN.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Study design and data collection



This retrospective study included registers from patients that had BSI between January 2013 and December 2018 in Maringá University Hospital, which provides assistance to patients who are users of the Brazilian public health system in the northwestern region of Parana in southern Brazil. The microbiology sector of the hospital's clinical analysis laboratory performs blood cultures using the BACTEC™ (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) automated system method and identifies isolates by the Phoenix™ BD automated system. The results are available on the “Sistema de Gestão da Assistência de Saúde do SUS” (GSUS) computer program which is also kept with daily patient's clinical data. We analyzed laboratory tests performed at the Clinical Analysis Laboratory of the University of Maringá Hospital, all the tests analyzed were carried out in accordance to parameter specific standard operating procedures (SOPs). All study data were obtained from the GSUS system database. Laboratory data were collected at time 48 (T48), 24 (T24) and 0 (T0) hours before blood culture collection of the selected patients.

Inclusion criteria: the study included patients with positive blood cultures that were positive in both samples collected or when at least one blood culture was positive with pathogens of clinical interest and distinct bacterial groups. Exclusion criteria: negative blood cultures, fungal infections and bacteria considered contaminants. Contamination criteria were pre-defined as a positive blood culture in which the isolate was a common skin organism (such as diphtheroids, micrococci, or coagulase-negative staphylococci) isolated in 1 bottle, or when medical records reported cultures as contaminants (13,14). If both sets of blood samples obtained for positive culture for viridans streptococci or coagulase-negative staphylococci, then that organism was considered to be a pathogen if the patient had a clinical history that was compatible with infection caused by these bacteria (15). It were excluded patients with new positive blood culture by bacteria from another group under 60 days and patients that presented more than one culture from the same bacterial group under 30 days.

## 2.2. Statistical analysis

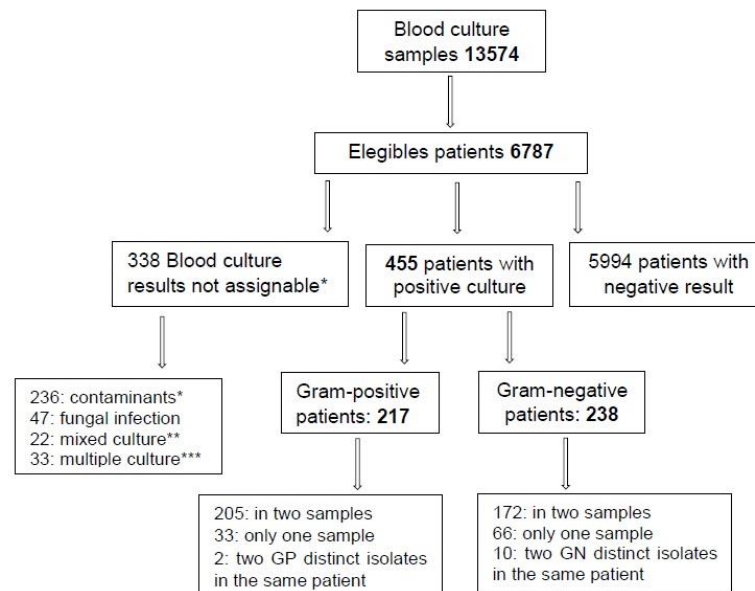
The results were organized in the Microsoft Excel 2007 (Microsoft®) software. Correlation between biomarkers and blood culture positive was performed by statistical treatment using *Student's T test* or *chi-square test*. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 2.3 Ethical considerations

The study was approved by the local ethics committee of the “Comissão de Regulamentação das Atividades Acadêmicas” (COREA-HUM) and the “Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos” (COPEP), CNS / MS Resolution 466/12 / COPEP Number 0447/2017-HUM.

## 3. RESULTS

A total, data from 13574 blood culture samples, equivalent to 6787 patients, were selected for inclusion in this study. Data from 455 patients were analyzed, including 47.7% (217/455) GP cases and 52.3% (238/455) GN cases (Figure 1).



**Figure 1. Patient recruitment process.** \*identification of the microorganism with potentially contaminated blood, \*\* gram-positive and gram-negative identification in the same patient, \*\*\* Patients with new positive blood culture by bacteria from another group under 60 days. When a patient showed more than two cultures from the same bacterial group (under 30 days), only the first culture was included. GP= gram-positive, GN= gram-negative

Within the study population, 57.6% (262/455) were male and 42.4% (193/455) were female. BSI-GP were relatively less frequent (40.6%) in female than BSI-GN (44.1%), whereas that male patients the frequency of BSI-GP was 59.4% and BSI-GN was 55.9%. The main initial infectious focus in both GP and GN groups was pulmonary, 31% and 32.7% respectively, followed by skin to GP (22%) and abdominal (20.2%) to GN. Mortality was significantly different only when the initial focus was abdominal, being higher in the presence of GN ( $p = 0.002$ ). The presence of sepsis or septic shock showed no difference between BSI-GP and BSI-GN groups ( $p > 0.05$ ) (Table1).

**Table1. General characteristics of eligible patients**

Parameters	Gram-positive % (n)	Gram-negative % (n)	p-valor
Age, years, mean $\pm$ SD	37 $\pm$ 28.7	45 $\pm$ 30.6	0.003
<b>Sex</b>			ns
Female	40.6 (88)	44.1 (105)	
Male	59.4 (129)	55.9 (133)	
<b>Admission</b>			
Surgery Clinic	5.1 (11)	9.0 (21)	ns
Medical Clinic	11.1 (24)	15.5 (37)	ns
Pediatrics	4.0 (09)	6.7 (16)	0.029
Emergency	38.7 (84)	36.0 (86)	ns
General ICU	13.8 (30)	16.8 (40)	ns
Pediatric ICU	8.3 (18)	8.0 (19)	ns
Neonatal ICU	19.0 (41)	8.0 (19)	<0.001
<b>Initial Infections site</b>			
Pulmonary	31 (67)	32.7 (78)	0.027
Intra-abdominal	8.0 (20)	20.2 (48)	<0.001
Urinary tract	6.0 (12)	13.9 (33)	0.003
Skin and soft tissue	22.0 (48)	8.4 (20)	<0.001
CNS	4.0 (08)	1.7 (04)	ns
Endocarditis	3.2 (07)	0.8 (02)	ns
Others	18.4 (40)	8.0 (19)	<0.001
Unknown site	6.9 (15)	14.3 (34)	0.008
<b>Mortality</b>			ns
Yes	30.1 (65)	37.3 (89)	
No	69.9 (152)	62.7 (149)	
<b>Mortality Initial Infections site</b>			
Pulmonary	43.3 (29)	37.1 (29)	ns
Intra-abdominal	35.0 (07)	52.1 (25)	0.002
Urinary tract	25.0 (04)	27.3 (09)	ns
Skin and soft tissue	27.1 (12)	30.0 (06)	ns
CNS	37.5 (01)	25.0 (01)	ns
Endocarditis	28.6 (02)	50.0 (01)	ns
Others	5.0 (02)	10.5 (02)	ns
Unknown site	46.7 (07)	47.0 (16)	ns
<b>Sepsis</b>	36.0 (78)	29.0 (69)	ns
<b>Septic shock</b>	14.0 (30)	15.0 (35)	ns
<b>No sepsis or septic shock</b>	50.0 (109)	56.0 (134)	ns

Data given the percentage and numbers of patients, chi square Test, ns = not significant. ICU= Intensive care unit, CNS= Central Nervous System

The microorganisms most frequently detected in BSI-GP were *Staphylococcus aureus* (n= 95, 43.7%), *Staphylococcus epidermidis* (n= 42, 19.40%), *Enterococcus faecalis* (n= 22, 10.3%) and *Streptococcus pneumoniae* (n=15, 6.91). Among BSI-GN, *Escherichia coli* (n = 63, 26.5%), *Klebsiella pneumoniae* (n = 47, 19.7%), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 37, 13.8%) and *Acinetobacter baumannii* (n=20, 8.4%) were the most prevalent GN microorganisms.

According to the data shown in table 2, in total, 51 biomarkers were evaluated regarding their single power to distinguish between patients with GP and GN bacteremia. After applying the Student's T test, significant differences were found (T0) in the bilirubin, creatinine, hematocrit, hemoglobin, lactate, TAP, base excess (BE), HCO<sub>3</sub>, ctO<sub>2</sub> and p50 (all=  $p \leq 0.001$ ). Calcium ionic, left shift, TAP- INR, urea and pH ( $0.001 > p < 0.01$ ). RBC, MCH, MCV, aPTT, methemoglobin, PLT and CO<sub>2</sub> ( $0.01 < p < 0.05$ ).

The table 3 shows the markers that presented differences in T24 and T48. On the time (T24) only the biomarkers: MCH ( $p < 0.001$ ), hematocrit ( $p = 0.003$ ), hemoglobin ( $p = 0.004$ ) and MCV ( $p = 0.002$ ) presented significant differences to differentiate the groups GP and GN. On the T48, ctO<sub>2</sub> and p50 were able to show differences between the groups evaluated.

**Table 2. Univariate evaluation of available biomarkers in relation to the date of blood culture collection (T0)**

Nº	Biomarkers	n	Gram-positive	n	Gram-negative	p-value
1	Age	217	37 (0-90)	238	45 (0-94)	<0.001
2	ALAT (U/L)	61	122 (12-1684)	79	86 (21-828)	ns
3	Albumin (G/dL)	10	2.3 (1.9-2.8)	30	2.8 (1.1-3.9)	ns
4	aPTT (sec)	56	39.9 (20.2-115.5)	78	45.7 (19.4-247.5)	0.025
5	ASAT (U/L)	62	92.9 (15-1055)	78	256 (11- 8013)	ns
6	Base excess (mmol/L)	163	-3.5 (-23.7-12)	174	-5.9 (-27.5-9.6)	0.001
7	Basophiles %	200	0.1 (0-3)	222	0.1 (0-4)	ns
8	Basophiles (/mm <sup>3</sup> )	200	15.2 (0-364)	222	9.8 (0-621)	ns
9	Bilirubin (mg/dl)	163	1.6 (0.1-12.4)	176	3.0 (0.1-35.1)	<0.001
10	Left shift (/mm <sup>3</sup> )	200	1657 (0-17369)	222	2578 (0-92581)	ns
11	Left shift (%)	200	11 (0-65)	222	14 (0-94)	0.015
12	Calcium ionic (mg/dL)	182	4.8 (3.84-6.41)	200	4.6 (3.08-6.77)	0.004
13	Carboxyhemoglobin (%)	163	1.4 (0-4.5)	174	1.4 (-0.2-2.6)	ns
14	Chloride (mg/dL)	182	108.5 (89-136)	200	108.7 (86-139)	ns
15	CO <sub>2</sub> (mmol/L)	163	22.0 (4.1-37)	174	20.4 (3.2-34.6)	0.021
16	Creatinine (mg/dl)	177	1.2 (0.1-10.1)	192	1.8 (0.1-10.3)	<0.001
17	CRP (mg/dl)	167	17.9 (0.5-57.3)	183	18.8 (0.5-87.1)	ns
18	ctO <sub>2</sub> (mL/dL)	163	14.6 (7-23)	173	13.3 (2-25.7)	0.001
19	Eosinophils %	200	1.9 (0-33)	222	1.3 (0-20)	0.028
20	Eosinophils (/mm <sup>3</sup> )	200	216 (0-3217)	222	170.3 (0-4056)	ns
21	Glucoses (mg/dl)	172	147.9 (36-438)	184	138.2 (11-428)	ns
22	Hematocrit (%)	200	32.5 (20.4-55.9)	222	30.26 (12.9-55.6)	<0.001
23	Hemoglobin (G/dL)	200	10.8 (6.5-19.5)	222	10.1 (4.6-19.6)	<0.001
24	HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	163	21.7 (8.2-35.5)	174	19.9 (0-33.6)	0.001
25	Lactate (mmol/L)	163	2.6 (0.4-12.8)	173	3.5 (0.6-16)	<0.001
26	Lymphocytes (%)	200	14.9 (1-78)	222	14.5 (1-90)	ns
27	Lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	200	1693 (39.9-9158)	222	1474 (77.5-10119)	ns
28	MCH (fl)	200	29.8 (24.4-39.9)	222	29.1 (19.9-40.6)	0.02
29	MCHC (g/dl)	200	33.4 (29.9-36.2)	222	33.2 (28.8-36.2)	ns
30	MCV (pg)	200	89.2 (62.9-116.8)	222	87.6 (62.5-119.5)	0.05
31	Methemoglobin (%)	161	0.9 (0.1-2.1)	174	1.1 (0-3.5)	0.023
32	Monocytes %	200	6.3(0-24)	222	5.2 (0-29)	0.005
33	Monocytes (/mm <sup>3</sup> )	200	867(0-5997)	222	707 (0-3393)	0.025
34	NLCR	200	13.6 (0.11-99.73)	222	13.8 (0.055-97.99)	ns
35	Neutrophiles %	200	76.5(1-97)	222	78.4 (5-98)	ns
36	Neutrophiles (/mm <sup>3</sup> )	200	11502(4-44443)	222	11956 (71-65768)	ns
37	Oxyhemoglobin (%)	163	92.7 (57.8-98.2)	174	91.7 (19.6-98.2)	ns
38	Oxygen Saturation (%)	163	94.9 (59.8-100)	174	94.1 (20-99.7)	ns
39	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	163	37.1 (10.2-103.7)	174	37.6 (13.3-171.6)	ns
40	pH	163	7.37 (7-7.72)	174	7.33 (6.72-7.94)	0.003
41	PLT (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	199	234.6 (9-865)	222	206.6 (5-780)	0.03
42	pO <sub>2</sub> (mmHg)	163	96.6 (32.8-348.3)	174	104.2 (24.3-368.8)	ns
43	Potassium (mmol/L)	182	3.9 (1.4-6.7)	200	4.0 (1.9-7.2)	ns
44	p50 (mmHg)	163	26.2 (18.89-42.92)	173	28.4 (18.6-61.93)	<0.001
45	RBC (millions/uL)	200	3.7 (1.97-6.15)	222	3.5 (1.28-5.56)	0.02
46	RDW (%)	200	15.8 (12.4-25.6)	222	16.3 (12-39)	ns
47	Sodium (mmol/L)	182	136.6 (117-157)	200	136.4 (115-171)	ns
48	TAP (%)	63	67.3 (14.8-100)	84	55.1 (10-100)	<0.001
49	TAP- INR	63	1.3 (1.0 - 5.47)	84	1.7 (1.0 - 8.07)	0.002
50	Urea (mg/dl)	96	68.3 (8-243)	126	88.9 (10-347)	0.008
51	WBC (/mm <sup>3</sup> )	200	14.6 (0.21-65)	222	14.7 (0.25- 98.5)	ns

Data given as mean with minimum and maximum values, Student T Test, ns= not significant. ALAT= alanine aminotransferase, aPTT= activated partial thromboplastin time, ASAT= aspartate aminotransferase, Left shift (bands + metamyelocyte + myelocyte + promyelocyte + blasts), CO<sub>2</sub>= carbon dioxide, CRP= C-reactive protein, ctO<sub>2</sub>=oxygen contend, HCO<sub>3</sub>= sodium bicarbonate, MCH= mean corpuscular hemoglobin, MCV= mean corpuscular volume, MCHC= mean corpuscular hemoglobin, NLCR= Neutrophils/Lymphocytes, pCO<sub>2</sub>= carbon dioxide pressure, pH= hydrogen potential, PLT= platelet count, pO<sub>2</sub>= oxygen pressure, RBC= red blood cell count, RDW= red blood cell distribution width, TAP= prothrombin time, INR= International standardized ratio, WBC= white blood cell count.

**Table 3. Statistical analysis of laboratory biomarkers in relation to 24h and 48h before blood cultures collection**

Biomarkers	n	Gram-positive (T24)	N	Gram-negative (T24)	p-value	n	Gram-positive (T48)	N	Gram-negative (T48)	p-value
Hematocrit (%)	79	31.6 (19.4-48.4)	88	28.9 (20.4-51.2)	0.003	71	31.6 (19.6-53.4)	77	30.5 (18.7-53.9)	ns
Hemoglobin (G/dL)	79	10.5 (6.3-16.2)	88	9.57 (6.3-16.5)	0.004	71	10.6 (6.2-18.1)	77	10.1 (6.6-17.4)	ns
MCH (fl)	79	29.9 (24.4-39.9)	87	28.51 (21.3-36.5)	<0.001	71	29.9 (22.4-39.7)	77	28.9 (19.9-36.8)	ns
MCV (pg)	79	89.9 (74.6-116.5)	87	86.6 (65.8-110.9)	0.002	71	89.5 (68.9-112.2)	77	87.3 (65.2-107)	ns
ctO <sub>2</sub> (mL/L)	57	13.8 (8.4-22.0)	64	12.9 (8.9-22.1)	ns	58	14.4 (8.1-23.6)	55	13.2 (8.3-23.4)	0.049
p50 (mmHg)	57	25.7 (19.2-51.9)	64	26.53 (19.6-40.3)	ns	58	24.7 (17.5-35.4)	55	26 (18.0 -32.3)	0.036

Data given as mean with minimum and maximum values, Student T test, ns = not significant. MCH= mean corpuscular hemoglobin, MCV= mean corpuscular volume, ctO<sub>2</sub>= oxygen contend.

#### 4. DISCUSSION

There are few studies about the role of biomarkers to predict the bacterial group involved in BSI, but the results are still contradictory and inconclusive (5,6,16). *In vitro* studies have reported there are differences between inflammation signaling pathways in GP and GN that may reflect different host responses, as evidenced by routine laboratory biomarkers (12). The present study demonstrated that there are significant differences between some laboratory parameters (verified before blood culture results) found in patients with BSI-GN or BSI-GP that may help in choosing the most appropriate empirical therapy.

Data from routine biomarkers performed concurrently with blood culture (T0) point to more prominent metabolic changes with statistical significance in BSI-GN patients. An example is the highest lactate dosage averaging 3.5 and 2.6 found in BSI-GN and BSI-GP, respectively.

Lactate acts as a marker of the critical balance between tissue oxygen demand and oxygen supply (11), and may also indicate anaerobic lactic acid production. In the present study, the significantly greater lactate difference in BSI-GN may indicate compromised oxygenation status of patients with BSI-GN, and the higher severity associated with infections by this bacterial group. Other relevant parameters were pH, HCO<sub>3</sub> and BE which were always lower in BSI-GN. A possible explanation would be the fact that excess acid mobilizes part of the bicarbonate of the buffer system, resulting in a decrease of HCO<sub>3</sub>. In addition, this biomarker may be further decreased due to a renal failure demonstrated by increased creatinine ( $p \leq 0.001$ ) and urea ( $p < 0.01$ ) also verified in BSI-GN.

There was a significant difference for hemoglobin and hematocrit ( $p \leq 0.001$ ) results in T0, in which the GN group presented lower values for these parameters. RBC dosage was also lower in this group ( $p = 0.002$ ); consequently, indices MCV and MCH followed these results ( $p < 0.05$ ). Besides, such parameters have also become significant in T24.

In critically ill patients, there is a reduction in tissue oxygen delivery from varying combinations of low output states and anemia. While hemoglobin is responsible for oxygen transport, methemoglobin is unable to carry O<sub>2</sub>. The ctO<sub>2</sub> is the main parameter to evaluate oxygen transport capacity as it relates to hemoglobin concentration and the presence of methemoglobin (17,18). The affinity of O<sub>2</sub> to hemoglobin is expressed by the value of  $p50$ , which is a parameter that evaluates the release of oxygen to hemoglobin (19). These parameters showed statistically significant differences between BSI-GN and BSI-GP at T0 and unpublished this study found that two of these biomarkers (ctO<sub>2</sub> and  $p50$ ) showed such differences 48 hours before blood culture collection. This demonstrates that ctO<sub>2</sub> and  $p50$  may be promising biomarkers for predicting which bacterial group (GN or GP) is involved in bacteremia, which can unrivalably assist in choosing the right antimicrobial therapy, enhancing therapeutic success and improving patient survival.

In the coagulation tests evaluated, TAP% ( $p \leq 0.001$ ) showed the higher significance to differentiate the bacterial groups in BSI, followed by TAP-INR, PLT and aTTP. These differences were observed only at T0, among both groups. The request for TAP and aTTP coagulation tests need to be routinely stimulated in suspected bacteremia, once it was observed that their request was lower when compared to the blood count that contains the PLT. Further studies involving coagulation tests need to be performed to confirm its usefulness as a bacterial group predictor in BSI.

White blood cell changes are related to infectious processes, regardless of bacterial group. Others studies have determined that NLCR was a good indicator of bacteremia (20,21). However, it was not possible to associate it with the infectious agent in our study. Some parameters were verified and only relative eosinophil count, relative and absolute monocytes, already shown by other authors (5), were promising as biomarkers in BSI-GP. However, the presence of left shift ( $p = 0.015$ ) was more associated with BSI-GN. More studies are need to confirm these results.

CRP has been used to establish the most appropriate diagnosis and prognosis in infectious processes. High CRP values have been associated with BSI-GN (6,16). However, in this study there was no statistical difference between bacterial groups. One of the limitations of the study were the number of missed exams in T48 and T24, which may have impaired the study.

#### 5. CONCLUSION

The data of present study showed that before blood culture results, the changes of biomarkers: lactate, pH, HCO<sub>3</sub>, BE, urea, creatinine (T0), hemoglobin and hematocrit (T0-T24),  $p50$  and ctO<sub>2</sub> (T0-T48) may be associated with BSI-GN. These results may be important for directing appropriate empiric therapy reducing morbidity and mortality in BSI. Multivariate statistical analyzes are being performed to confirm the results in future publications. We believe that a larger number of studies should be performed to confirm these findings.

#### REFERENCES

1. Viscoli C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. Virulence [Internet]. 2016;7(3):248–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1152440>.
2. Gurol G, Ciftci IH, Terzi HA, Atasoy AR, Ozbek A, Koroglu M. Are There standardized cutoff values for neutrophil-lymphocyte ratios in bacteremia or sepsis? J Microbiol Biotechnol. 2015;25(4):521–5.



3. Kontula KSK, Skogberg K, Ollgren J, Järvinen A, Lyytikäinen O. Early deaths in bloodstream infections: A population-based case series. *Infect Dis (Auckl)*. 2016;48(5):379–85.
4. Taniguchi LU, Bierrenbach AL, Toscano CM, Schettino GP, Azevedo LC. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. *Crit Care [Internet]*. 2014;18(6):608. Available from: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-014-0608-8>.
5. Ratzinger F, Dedeyan M, Rammerstorfer M, Perkmann T, Burgmann H, Makristathis A, et al. Neither Single nor a Combination of Routine Laboratory Parameters can Discriminate between Gram-positive and Gram-negative Bacteremia. *Sci Rep [Internet]*. 2015;5(February):16008. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep16008>.
6. Alexandraki I, Palacio C. Gram-negative versus Gram-positive bacteremia: what is more alarmin(g)? *Crit Care [Internet]*. 2010;14(3):161. Available from: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc9013>.
7. Silva E, Junior LD, Da Silveira Fernandes H, Moreno R, Vincent JL. Prevalence and outcomes of infections in Brazilian ICUs: A subanalysis of EPIC II study. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012;24(2):143–50.
8. Ratzinger F, Haslacher H, Perkmann T, Pinzan M, Anner P, Makristathis A, et al. Machine learning for fast identification of bacteraemia in SIRS patients treated on standard care wards: a cohort study. *Sci Rep [Internet]*. 2018;8(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30236-9>.
9. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Vol. 43, *Intensive Care Medicine*. Springer Berlin Heidelberg; 2017. 304-377 p.
10. Rita M, Araujo E De. Hemoculturas-Recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados Coleta de hemoculturas. *J Infect Control*. 2012;1(1):8–19.
11. Julián-jiménez A, Candel FJ, Castillo JG. Utilidad de los biomarcadores para predecir bacteriemia en los pacientes con infección en urgencias. 2017;30(4):245–56.
12. Gao H, Evans TW, Finney SJ. Bench-to-bedside review: Sepsis, severe sepsis and septic shock - Does the nature of the infecting organism matter? *Crit Care*. 2008;12(3):1–6.
13. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):788–802.
14. Canzoneri CN, Akhavan BJ, Tosur Z, Andrade PEA, Aisenberg GM. Follow-up Blood Cultures in Gram-Negative Bacteremia: Are They Needed? *Clin Infect Dis*. 2017;65(11):1776–9.
15. Author T, Grace CJ, Lieberman J, Pierce K, Littenberg B. Usefulness of Blood Culture for Hospitalized Patients Who Are Receiving Antibiotic. *Source Clin Infect Dis [Internet]*. 2001;32(11):1651–5. Available from: <http://www.jstor.org/stable/4482616>.
16. Zarkesh M, Sedaghat F, Heidarzadeh A, Tabrizi M, Moghadam KB, Ghesmati S. Diagnostic value of IL-6, CRP, WBC, and absolute neutrophil count to predict serious bacterial infection in febrile infants. *Acta Med Iran*. 2015;53(7):408–11.
17. Wahr JA, Gerber M, Venitz J, Baliga N. Allosteric modification of oxygen delivery by hemoglobin. *Anesth Analg*. 2001;92(3):615–20.
18. Rehman HU. Evidence-Based Case Review: Methemoglobinemia. *West J Med [Internet]*. 2001;175(3):193–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1071541/>
19. Reduced red cell 2,3-diphosphoglycerate concentrations in critical illness without decreased in vivo P50. *Anaesth Intensive Care*. 2001;29(5):479–83.
20. Zhang HB, Chen J, Lan QF, Ma XJ, Zhang SY. Diagnostic values of red cell distribution width, platelet distribution width and neutrophil-lymphocyte count ratio for sepsis. *Exp Ther Med*. 2016;12(4):2215–9.
21. Riché F, Gayat E, Barthélémy R, Le Dorze M, Matéo J, Payen D. Reversal of neutrophil-to-lymphocyte count ratio in early versus late death from septic shock. *Crit Care [Internet]*. 2015;19(1):439. Available from: <http://ccforum.com/content/19/1/439>.

**Keywords:** biomarkers; bacteria; blood culture.

## INSIGHTS ABOUT CELL WALL REMODULATION TRIGGERED BY RIFAMPICIN IN *Mycobacterium tuberculosis*

Jean Eduardo Meneguello<sup>1</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>1</sup>; João Vitor de Oliveira Silva<sup>2</sup>; Luciana Dias Ghiraldi-Lopes<sup>3</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>3</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>3</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>3</sup>; Eduardo Jorge Pilau<sup>4</sup>; Paula Aline Zannetti Campanerut-Sá<sup>3,†</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate student (Doctorate) in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Postgraduate student (Master's) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, PR

†These authors contributed equally to this work

e-mail: jan.meneguello@gmail.com / meneguello.je@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains the leading cause of death by infectious disease worldwide, which has raised a global concern about its association with HIV coinfection (1). Despite the modern therapeutic regimen efficacy, the strategies have been suffering from the emergency of multi-drug resistance over the last years. Even using drugs combination, drug activity is impaired by major limitation such as the slowly killing of *Mycobacterium tuberculosis*, increasing the risk of developing tolerant or drug-resistant phenotypes (2).

Rifampicin plays an important role during TB treatment due to its specificity to the mycobacterial molecular target, *rpoB* (3), which codify the subunit B from RNA polymerase. Thus, its use is recommended during all the treatment time. On the other hand, the resistance to rifampicin is an intersection for the definition of multi (MDR-TB) and extensively (XDR-TB) resistant outcomes, because most of the MDR and XDR resistant cases carry mutations within *rpoB* simultaneously to those driven to isoniazid resistance (4).

Conventionally, it is proposed the rifampicin molecule binds 12 Å from the RNA polymerase active site, which blocks the *M. tuberculosis* transcription (3). Not only mutations driven to rifampicin resistance are ascribed to an 81 bases pair region surrounding this site of *rpoB*, but a small proportion (5%) of the resistant bacilli could be related to a few explored mechanisms (5).

To survive the challenges from host-imposed stringencies, such as hypoxia, low pH, phagocytosis and nutrient limitation, *M. tuberculosis* has robust mechanisms in its physiologic arsenal to evade stressors (6). The attempting towards the cure is a stressor that exposes the bacilli to an extended period of drug coexistence, which favors *M. tuberculosis* metabolic flexibility. Under these circumstances, the effort to treat the patients could allow the bacilli to acclimatize into the adverse environment caused by drugs (7). These issues have increased discussions about the narrow binary definition between drug susceptibility and resistance, pointing out an alternative view, in which, resistance faces continuum physiologic states that bacteria could simulate during drug exposure (7). This dynamic regulation is modulated by the genome expression, which can be analyzed by proteomic studies (8). In this sense, the pathway to resistance emerges firstly by physiologic changes into the bacterial cell, preceding those assigned by genomic mutation, such as efflux systems triggered by rifampicin (9). In previous studies, our group brought new insights about alternative responses related to the first line drugs activity (10,11). Thus, we aimed to report the changes in *Mycobacterium tuberculosis* protein profile triggered by rifampicin.

### 2. MATERIAL AND METHODS

#### 2.1 *Mycobacterium tuberculosis* growth condition

Reference strain, *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294), was used to perform the experiments. Prior to drug exposure, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by carrying out the assay described by Palomino et al. (2002) (12). The bacillus suspensions was prepared and cultured from OD<sub>625</sub>=0.010 to achieve OD<sub>625</sub>≈ 0.8-1.2, for approximately 15 days, in 80 mL of Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, MI, USA) supplemented with 0.2% glycerol and 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase-enrichment) at 35° C. Rifampicin was added to the culture at MIC (0.03 µg·mL<sup>-1</sup> for each 3.75x10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>), considering the optical density in the sample tube during 12, 24 and 48 hours. Simultaneously, a

rifampicin-unexposed culture, as control, was grown and undertaken to the whole analysis to establish the effects of rifampicin over bacillus.

## 2.2 Sample preparation

Before protein extraction, bacillary suspensions were twice-washed with deionized water and heated-inactivated at 80 °C for 30 minutes. Then, it was sonicated in lysis solution (7 M urea, 2 M thiourea, and 40 mM dithiothreitol (DTT)) in ice bath. Protein concentrations were estimated by the Bradford method (13) using bovine serum albumin as standard.

The protein digest was prepared according the procedure described by Villén & Gygi (2008) (14) with modifications. Briefly, 100 µg of protein were diluted in 8 M urea solution, and reduced with five mM DTT, and left 25 minutes at 56 °C. Subsequently, it was performed the alkylation with 14 mM iodoacetamide, light-protected at room temperature, followed by a DTT quenching (five mM) during 15 minutes at the same condition. Calcium chloride at one mM and two micrograms of trypsin for mass spectrometry (Promega, USA) were added to the solution, and incubated at 37 °C for 16 hours until the digesting being stopped with 0.4% trifluoroacetic acid. The obtained peptides were desalted using C18 Sep Pak® cartridges (Waters, USA) and stored at -80 °C until the liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis (LC-MS).

## 2.3 Liquid chromatography/mass spectrometry configuration

Data for peptide identification was obtained using ultra high performance liquid chromatography Nexera X2™ (Shimadzu, Japan) coupled to mass spectrometer Impact II (Bruker, Germany). The chromatographic peptide separation was performed with acetonitrile gradient (gradient A containing purified water and 0.1 % formic acid (v/v) and B containing acetonitrile with 0.1 % formic acid (v/v)), graded as 2 %, 35 %, 95 %, 95 % and 2 % of B during 2, 60, 90, 110 and 111 min respectively, and stopped at 120 min. Samples (10 µL) were loaded at flow of 0.1000 mL·min<sup>-1</sup>, with capillary voltage operating in positive ionization mode, set at 4500 V and with an end plate offset potential of -500 V. The dry gas parameters were set to 7.0 L min<sup>-1</sup> at 180 °C with a nebulization gas pressure of 2.0 bar. Data were collected from m/z 150-2200 with an acquisition rate of 5 spectrums per second, and the ions of interest were selected by auto MS/MS scan fragmentation.

## 2.4 Bioinformatics/data processing and database searching

The MS/MS search for peptide mass fingerprinting and protein identification were performed in Maxquant software, version 1.6.1.0 (15), using the reference proteome of *M. tuberculosis* UP000001584 (taxonomy 83332), available in UniProt database. The following parameters were applied for the database search: enzyme specificity was set as Trypsin, maximum of two missed cleavages sites, mass tolerance of 0.5 Da for fragment. Carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification and acetylation of the protein N- terminus, and oxidation of methionine were set as variable modifications for database searches.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (16) partner repository with the dataset identifier PXD014177.

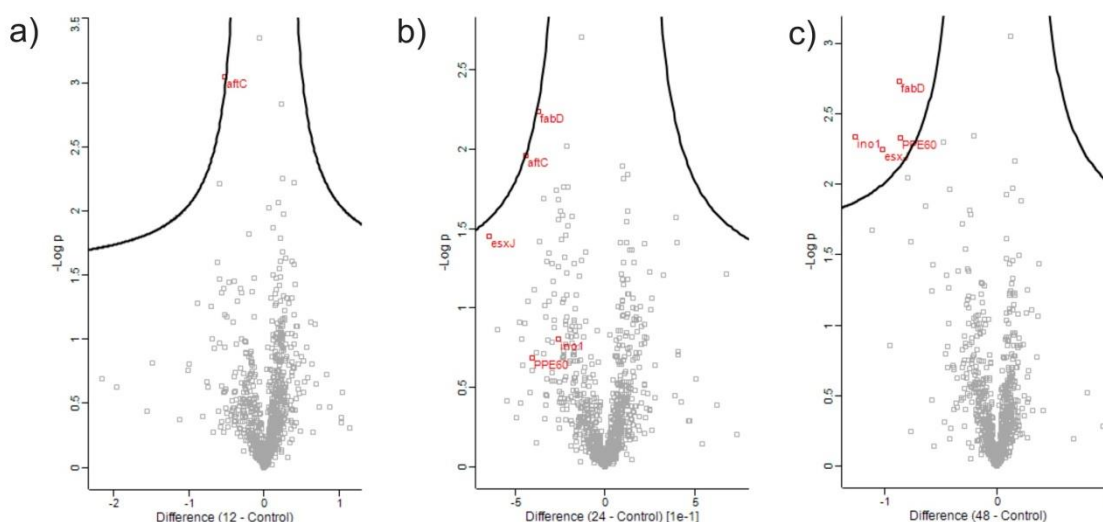
The first search for precursor ions was performed with a mass tolerance of 20 ppm for calibration, while 6 ppm was applied for the main search. For protein identification, at least one unique peptide was required per protein group (17). Minimum peptide length of 7 amino acids was required for identification. The maximum false discovery rate (FDR) cutoff of 0.01 (1%) was set at both the peptide spectra matches and the protein group levels. For all other parameters, the default setting was applied. Following protein identification by a database search, validation for multiple comparisons was corrected using Benjamini-Hochberg correction. To aid in the control of false positives, the database was supplemented with additional sequences for common contaminants and reversed sequences of each entry. The statistical analysis was performed in Perseus software version 1.6.1.1 (18).

## 3. RESULTS

We explored protein alterations in *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv exposed to rifampicin over 12, 24 and 48 hours. These changes were examined using the comparison between treatment snapshots challenged with the MIC and the drug-free condition. Overall, 1300 proteins were identified by the untargeted proteomics with high correlation among replicates (R<sup>2</sup>>0.90).

Alterations among the exposure snapshots were determined by statistical analysis, considering p <0.05 and a false discovery rate (FDR) <0.05. The significant points obtained by a permutation-based FDR calculation were represented in a Volcano plot (Fig. 1). As a result, no significant differences were observed in 12 and 24 hours. Evident changes were identified at 48 hours by four statistically underrepresented proteins: Proteins Ino1 (Rv0046c), FabD (Rv2243), EsxK (Rv1197) and PPE60 (Rv3478) (Figure 1).





**Figure 1. Protein alterations triggered by rifampicin at MIC exposure ( $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in reference strain *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. All exposure points; (a) 12, (b) 24 and (c) 48 were compared with an untreated control. It was taken into consideration the association between difference and the calculated *p*-value in order to minimize false positive results.**

#### 4. DISCUSSION

Even though rifampicin has been known as an inhibitor of transcriptional machinery, we reported alterations related to the cell wall remodeling during its action.

According to Mycobrowser and UniProt, these proteins are functionally distributed in different cellular process. Ino1 catalyzes the conversion of glucose 6-phosphate into 1D-myoinositol 3-phosphate in mycobacteria, participating in pathways of the cell wall and membrane construction. Additionally, inositol attends multiple cellular functions such as forming the backbone of lipoarabinomannan and lipomannan in the first steps of the mycobacterial cell envelope construction (21), anchoring glycoconjugates such as phosphatidylinositol, phosphatidylinositol mannosides, lipomannan and lipoarabinomannan, linking those constituents to membrane (22). This substrate is also part of mycothiol biosynthesis, controlling oxidative stress in response to adverse lung microenvironments.

Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (FabD) plays a pivotal role between the linkage of FASI and FASII biosynthesis machinery, essential for mycolic acid biosynthesis (23). Both Ino1 and FabD are targets of the Pup-proteasome degradation system (24).

Regarding EsxK (Rv1197) and PPE60 (Rv3478), no consensus about their enzymatic function is well-defined in the databases. The knowledge available suggests they play a role in the host-pathogen immune interaction (25).

#### 5. CONCLUSION

Finally, our results show a reduction of different processes related to the cell wall construction. In this sense, a perturbation in lipid metabolism could be an alternative response triggered by rifampicin in susceptible strains, such as H<sub>37</sub>Rv.

#### FUNDINGS

CAPES and CNPq.

#### ACKNOWLEDGMENTS

To the Laboratory of Medical Bacteriology at the State University of Maringá.

#### REFERENCES

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva, Switzerland; 2018.
2. Machado D, Girardini M, Viveiros M, Pieroni M. Challenging the drug-likeness dogma for new drug discovery in Tuberculosis. *Front Microbiol.* 2018 Jul;13:67.
3. Campbell EA, Korzhcheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901–12.

4. Marks SM, Flood J, Seaworth B, Hirsch-Moverman Y, Armstrong L, Mase S, et al. Treatment practices, outcomes, and costs of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, United States, 2005-2007. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(5):812–21. doi: 10.3201/eid2005.131037.
5. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Matter L, Schopfer K, Bodmer T, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993;341(8846):647–51.
6. Canezin PH, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RB de L, Siqueira VLD, Pavan FR, Barros ILE, et al. Intramacrophage *Mycobacterium tuberculosis* efflux pump gene regulation after rifampicin and verapamil exposure. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Jul;73(7):1770–76. doi: 10.1093/jac/dky091.
7. Danelishvili L, Shulzhenko N, Chinison JJJ, Babrak L, Hu J, Morgun A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* proteome response to antituberculosis compounds reveals metabolic “escape” pathways that prolong bacterial survival. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7). doi: 10.1128/AAC.00430-17.
8. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature.* 2016;537(7620):347–55.
9. Caleffi-Ferracioli KR, Amaral RCR, Demitto FO, Maltempe FG, Canezin PH, Scodro RBL, et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. *Tuberculosis.* 2016;97:65–72.
10. Campanerut-Sá PA, Ghiraldi-Lopes LD, Meneguello JE, Fiorini A, Evaristo GP, Siqueira VL, et al. Proteomic and morphological changes produced by subinhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 2016;11:1123–32. doi:10.2217/fmb-2016-5000.
11. Ghiraldi-Lopes LD, Campanerut-Sa PAZ, Evaristo GPC, Meneguello JE, Fiorini A, Baldin VP, et al. New insights on ethambutol targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Disord Drug Targets.* 2019;19(1):73–80.
12. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2720–2.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
14. Villén J, Gygi SP. The SCX / IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2008;3(10):1630–8.
15. Tyanova S, Temu T, Carlson A, Sinitcyn P, Mann M, Cox J. Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics.* 2015;15(8):1453–6. doi: 10.1002/pmic.201400449.
16. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D442–50.
17. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008 Dec;26(12):1367–72.
18. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* 2016;13(9):731–40.
19. Bachhawat N, Mande SC. Identification of the INO1 gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv reveals a novel class of inositol-1-phosphate synthase enzyme. *J Mol Biol.* 1999;291(3):531–6.
20. Chen IW, Charalampous FC. Inositol 1-phosphate as intermediate in the conversion of glucose 6-phosphate to inositol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(1):144–9.
21. Hunter SW, Brennan PJ. Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 1990 Jun;265(16):9272–9.
22. Mishra AK, Driessen NN, Appelmelk BJ, Besra GS. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Nov;35(6):1126–57.
23. Kremer L, Nampoothiri KM, Lesjean S, Dover LG, Graham S, Betts J, et al. Biochemical characterization of Acyl Carrier Protein (AcpM) and Malonyl-CoA:AcpM Transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J Biol Chem.* 2001;276(30):27967–74.
24. Festa RA, McAllister F, Pearce MJ, Mintseris J, Burns KE, Gygi SP, et al. Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2010;5(1):e8589.
25. Su H, Zhang Z, Liu Z, Peng B, Kong C, Wang H, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PPE60 antigen drives Th1/Th17 responses via Toll-like receptor 2–dependent maturation of dendritic cells. *J Biol Chem.* 2018 Jun;293(26):10287–302. doi: 10.1074/jbc.RA118.001696.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; rifampicin; proteomics.

## REPOSITIONING EBSELEN AS ANTIFUNGAL OPTION TO TREAT INVASIVE ASPERGILLOSIS

**Karina Mayumi Sakita<sup>1</sup>; Isis Regina Grenier Capoci<sup>2</sup>; Daniella Renata Faria<sup>1</sup>;  
Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini<sup>1</sup>; Pollyanna Cristina Vincenzi  
Conrado<sup>3</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>1</sup>; Tania Cristina Alexandrino Becker<sup>4</sup>; Patricia de  
Souza Bonfim-Mendonça<sup>2</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>2</sup>; Erika Seki  
Kioshima<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>2</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>3</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringa, Maringa, PR

e-mail: karina.msakita@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Invasive aspergillosis (IA) remains as one of the major causes of morbidity and mortality among invasive fungal infections, especially in intensive care units patients (1, 2). Voriconazole (Vor) is the gold standard for treatment of IA (3). Isavuconazole has been also accepted as drug of choice, with reported fewer adverse events than voriconazole (4 - 7). Despite this, the mortality rates remain high (8 - 10). Prophylactic antifungal therapy with azole reflects the increase of resistant *Aspergillus* species strains (9). In addition, the use of agriculture fungicides with same targets than human pathogens creates environmental reservoirs of resistant fungi (9). In European markets more than 20% of agricultural fungicides are azole-based (11).

Facing this critical scenario, in an attempt to optimize the process of search for new drug options, repositioning drugs has become an interesting approach to speed the discovery of new antifungal drugs (12, 13). This approach speeds the conventional time of drug discovery from 10-17 years to 3-12 years for repurposed compounds, since bypass much of the discovery, preclinical stages and phase I studies for safety (14).

Ebselen (2-phenyl-1,2-benzoselenazol-3(2H)-one; EbSe) is an organoselenium compound already successfully tested in human clinical trials for neuroprotective effect (15), treatment for bipolar disorder (16) and prevention of noise-induced hearing loss (17) with no reported side effects or toxicity (16). In addition, the antifungal *in vitro* activities of EbSe against *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus* spp. have been demonstrated (18 - 21). Recently, Marshall, et al. (2019) proved the ability of EbSe to block *A. fumigatus* thioredoxin reductase (TrxR) activity (22). This flavoenzyme has been largely studied by our group as a promising target for antifungal drugs (23, 24). In fact, EbSe seems to inhibit in a selective manner the TrxR system of fungi and bacteria leading to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and cell death (25, 26).

To the best of our knowledge, this is the first study demonstrating the efficacy of EbSe antifungal treatment *in vivo*. Thus, the aim of this study was to bring evidence of EbSe effectiveness in invasive aspergillosis using a murine model.

### 2. MATERIAL AND METHODS

#### 2.1. Antifungal agents

The following compounds were used for susceptibility tests: Ebselen (EbSe; C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NOSe; TargetMol), the commercial antifungal agents: voriconazole (Vor; Pfizer Incorporated, New York, NY, USA) and amphotericin B (AMB; Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for solubilization of EbSe.

#### 2.2. Organisms and inoculum preparation

*Aspergillus fumigatus* reference strain (ATCC 64026), two clinical isolates of *A. fumigatus* isolated from sputum and bronchoalveolar lavage (Af1 and Af2) and one isolate of *A. flavus* isolated from tracheal lavage were used. For inoculum preparation, the strains were grown on potato dextrose agar (PDA) at 35°C for 7 days. Conidia were harvested with 0.1% Tween 80 in saline (0.85%). Homogenous conidial suspensions

were collected following filtration through a sterile syringe with cotton and then adjusted to the desired concentration (27).

### 2.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

The procedures were according to the broth microdilution protocol from the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2. For interpretation of results, 0.02% of resazurin sodium salt ( $C_{12}H_6NNaO_4$ ; R7017, Sigma, St. Louis, MO) were added and incubated for 24 h at 35 °C. A blue color was interpreted as absence of metabolic activity (no spore germination). A fluorescent pink color was interpreted as presence of metabolic activity (spore germination) and a purple color in the well was interpreted as a trailing result, where some metabolic activity was present but a longer incubation time allowed the purple color to change to pink (28).

### 2.4. Experimental model of invasive aspergillosis *in vivo*

The procedures were carried out in accordance with the regulations of the Institutional Ethics Committee for animal experimentation of the State University of Maringá, Brazil (Approval n° CEUA 9067030518). A total of 21 BALB/c female mice, weighing 22–25 g were used. Animals were housed in filter top cages and allowed access to food and water *ad libitum*. To induce an immunosuppressed state, intraperitoneal injections of cyclophosphamide (200 mg/kg on day -3, on day 0 (day of infection) and every 3 days until the end of the experiment were applied. Animals were infected with  $1-2 \times 10^4$  CFU of *A. fumigatus* (strain ATCC 64026) suspended in 100  $\mu$ L of saline (0.85%) by lateral tail vein injection and were left for 24 hours before starting the treatment (29).

The infected mice were randomly divided into three experimental groups (n=21): Ebselen (animals were treated with 10 mg/kg of EbSe), voriconazole (treated with 10 mg/kg of Vor) and control (treated with diluent: PBS, 4.2% of DMSO and 1.25% of Pluronic F127). All treatments were intraperitoneally administered, twice daily for four days. On day 5 post-infection, animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine®, Cristália, SP, BR) and blood samples were collected in microtubes, centrifuged (5000 rpm for 5 min). The serum were then stored at -80 °C for cytokine measurement. After that, the animals were euthanized and the right kidneys were aseptically removed, weighed, and mechanically homogenized in sterile saline (0.85%). Serial 10-fold dilutions of the homogenates in saline were placed on PDA and incubated for 48 h at 35 °C to evaluation of the efficacy of the treatment by reduction of tissue burden in the kidneys presented for log<sub>10</sub> CFU.g<sup>-1</sup> of tissue. The kidney homogenates were centrifuged (11000 rpm for 13 min) and tissue supernatants were collected and stored at -80 °C for cytokine measurement.

### 2.5. Histopathological analysis

For histopathological evaluations, left kidney of all animals were collected, immediately fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded and cut into thin sections (5  $\mu$ m). The sections were stained by Grocott-Gomori's methenamine silver (GMS) to visualize fungi, and counterstaining with haematoxylin and eosin (H&E) for characterization of host cells (11). Slides were observed and photographed using a binocular light microscope (Motic BA310), with a camera (Moticam 5) coupled to a computer using Motic Images Plus 2.0 software.

### 2.6. Cytokines

Cytokines in serum samples and kidney homogenates supernatants were measured with BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). The kit was used for the simultaneous detection of mouse interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumor Necrosis Factor (TNF), and Interleukin-12p70 (IL-12p70) in a single sample following the manufacturer's protocol. Samples were measured on the BD FACSCalibur Flow Cytometer and analyzed by FCAP Array™ Software Version 3.0 (BD Bioscience).

### 2.7. Statistical analysis

Comparisons between groups were performed by the one-way analysis of variance (ANOVA) multiple comparisons test using the GraphPad Prism 5 software package (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).  $p < 0.05$  were considered significant in these analyses.

## 3. RESULTS

In general, all strains tested showed the same susceptibility profile standard (Table 1). *A. fumigatus* reference strain, Af1 and Af2 clinical isolates showed the same MICs values for EbSe and VOR: 4.0  $\mu$ g/mL and 0.25  $\mu$ g/mL, respectively. *A. flavus* clinical isolate (Af1) showed susceptibility profile a little more elevated than *A. fumigatus* strains for all antifungals tested.

The immunosuppressed condition of each mouse was monitored by counting the polymorphonuclear from the blood on days -3, 0 and +4 post-infection (d.p.i.). All animals were immunosuppressed on day 0 and continued in this condition until day +4 (data not shown).

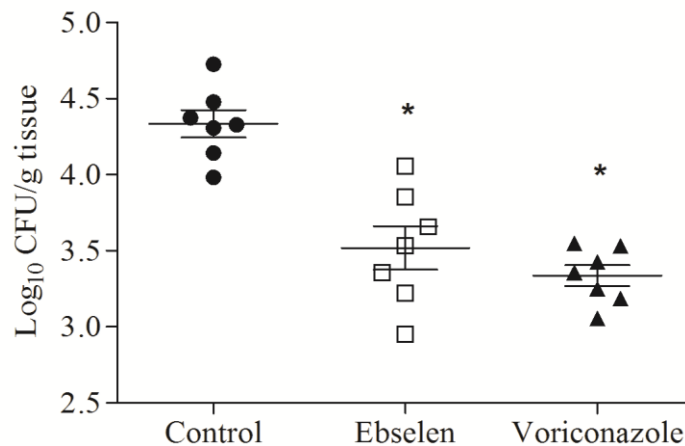


**Table 1. Susceptibility profile of *A. fumigatus* and *A. flavus* clinical strains against EbSe and standard antifungals**

Strains	Antifungal (concentration range)		
	EbSe (256-0.5 ug/mL)	AMB (16-0.03 ug/mL)	VOR (16-0.03 ug/mL)
ATCC 64026 ( <i>A. fumigatus</i> )	4.0	0.25	0.25
Af1 ( <i>A. fumigatus</i> )	4.0	0.25	0.25
Af2 ( <i>A. fumigatus</i> )	4.0	0.125	0.25
Afl1 ( <i>A. flavus</i> )	8.0	1.0	0.5

EbSe: Ebselen; AMB: Amphotericin B; VOR: Voriconazole; ATCC: American type culture collection; Af1: *Aspergillus fumigatus* clinical isolate 1; Af2: *A. fumigatus* clinical isolate 2; Afl1: *Aspergillus flavus* clinical isolate 1.

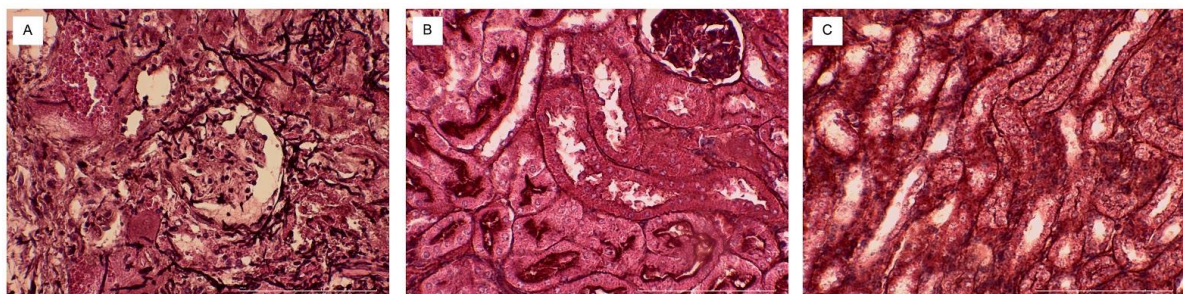
As shown on Figure 1, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed between control group ( $\log_{10} 4.33 \pm 0.23$ ) and EbSe group ( $\log_{10} 3.51 \pm 0.37$ ). Vor was used as standard antifungal and showed reduced fungal burden ( $\log_{10} 3.33 \pm 0.18$ ) compared with control ( $p < 0.05$ ). However, EbSe and Vor group showed no significant difference ( $p > 0.05$ ).



**Figure 1. Fungal burden in the kidney after systemic infection by *A. fumigatus* (ATCC 64026).** Control: Mice treated with diluent; Ebselen: Mice treated with 10 mg/kg of Ebselen and Voriconazole: Mice treated with 10 mg/kg of Vor. All groups were treated intraperitoneally twice daily for 4 days starting 1 day after infection. \* $p < 0.05$

Histopathological analysis showed that the conidia were massively disseminated to the kidney in the control group (Figure 2A). Fungal hyphae were numerous and centered on the pelvis and secondarily extending to renal tubes of the medulla and cortex with presence of hyphae across the Bowman's capsule. Additionally, severe lesions with extended area of necrosis and bleeding.

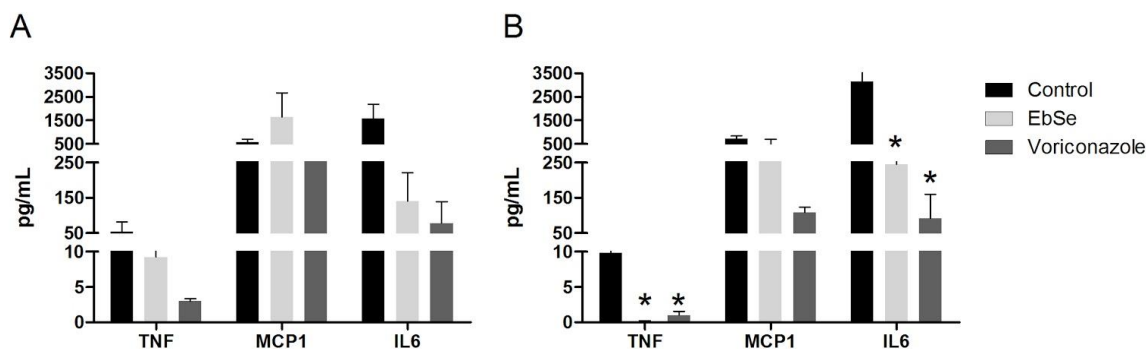
Concerning the groups treated either with Vor or EbSe (Figure 2B and C, respectively), both showed the same standard of absence of fungus on the entire kidney section observed. Kidney tissue was preserved and no evidence of inflammation was noted.



**Figure 2. Histopathological analysis from kidney sections of (A) Control: Mice treated with diluent; (B) Ebselen: Mice treated with 10 mg/kg of Ebselen and (C) Voriconazole: Mice treated with 10 mg/kg of Vor.** All groups were treated intraperitoneally twice daily for 4 days starting 1 day after infection. The sections were stained with Grocott-Gomori's methenamine silver and counterstained with H&E.

From the total of six cytokines that can be measured by the Inflammatory cytokine kit, only three were detected (Figure 3). Local and systemic cytokines showed the same pattern of expression (Figure 3). Both

treatment groups, EbSe and Vor, down-regulated the expression of proinflammatory cytokine TNF and IL-6 in serum (Figure 3A) and in kidney homogenates ( $p < 0.05$ ) (Figure 3B) compared with control group.



**Figure 3. Systemic and local inflammatory cytokine evaluation in mice after EbSe or Vor treatment. (A) cytokines recovered from serum and (B) kidney homogenates from mice treated with EbSe or Vor and control not treated after invasive aspergillosis model infection.**  $p < 0.05$ , significant difference compared with control from each cytokine. TNF: Tumor necrosis factor; MCP-1: Macrophage/Monocyte Chemoattractant Protein-1; IL-6: Interleukin-6.

#### 4. DISCUSSION

Aspergillosis remains as one of the main causes of death by invasive fungal infections, despite this the antifungal arsenal available are not enough to prevent high mortality rates (8 - 10).

Recently, Marshall et al. (2019) (22) elucidated the crystal structure of Thioredoxin reductase from *A. fumigatus* (AfTrxR) and its interaction with Ebselen catalytic site and brought us consistent data about their molecular interaction providing insights into the specific mechanism of inhibition EbSe/AfTrxR. However, only *in vitro* studies were performed. Thus, this study brings for the first time animal evidence of EbSe efficacy for the treatment of invasive aspergillosis.

As patients with prolonged neutropenia are frequently affected by *Aspergillus* infection (3) an immunosuppressed condition was established and maintained during the course of infection (data not shown). Study performed by Sionov et al., (2013) (30), showed that the i.p administration of 200 mg/kg of cyclophosphamide causes an immunosuppressed state 3 days after induction and the effect was mostly due to the neutrophils reduce. The inoculum used in this study was sufficient to establish a systemic aspergillosis with significant fungal accumulation on the main target organ in this via of infection, the kidney (29).

Clinical trials in humans demonstrated that EbSe overcome the hematoencephalic barrier acting in the central nervous system (16). This feature is interesting for the treatment of cerebral aspergillosis in which fatality rates reach to over 90% even when treated (31).

As elucidated by Marshall et al. (2019) (22), the main mechanism of action of EbSe over *A. fumigatus* is the inhibition of AfTrxR. There are studies about drugs candidates for repurposing antifungals targeting the thioredoxin system, Auranofin, EbSe and PX-12. Auranofin and PX-12 had *in vitro* antifungal activity against *A. fumigatus* with MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (32 - 34). A few reports suggest *in vitro* fungicidal activity of EbSe against some species of *Aspergillus*, but this activity has not yet been investigated *in vivo*. For *A. flavus*, *A. nidulans* and *A. terreus*, the MIC was 6.25, 1.56 and 1.56, respectively (19). Another drug candidate for repurposing drug against invasive pulmonary aspergillosis is Sertraline, a psychotropic agent commonly used as an antidepressant (35). Our study showed similar EbSe MIC for clinical strains of *A. fumigatus* and *A. flavus* (Table 1).

To the best of our knowledge, the *in vivo* evaluation of efficacy of EbSe in murine aspergillosis model has not been reported thus far. Our murine invasive aspergillosis model showed significant results in mice treated with EbSe. The reduction in the fungal burden was comparable with the reduction obtained with mice treated with VOR (Figure 1). Corroborating with reduction in the fungal burden in the kidneys, histopathological analysis showed absence of fungal or inflammation and preservation of tissue architecture in the groups treated.

Significant differences in expression of local cytokines, present in kidney homogenates, showed down regulation of IL-6 and TNF when treated with EbSe or Vor (Figure 3). The decrease of this proinflammatory cytokines could be associated with reduction of infection and absence of hyphae, once the marked release of IL-6 was due to the exposition of hyphal fragments of *A. fumigatus* (36). TNF plays an important role in host immune defense against invasive fungal infections (37). In mice, the amount of TNF increases after 24h, acute phase response, associated with accumulation of large numbers of leukocytes at foci of infection (38). In this sense, the decrease of TNF levels could be correlated with kidney clearance as corroborated with histopathological images that showed absence of fungal presence in kidney treated with EbSe or Vor (Figure 2).

## 5. CONCLUSION

As repurposing drug candidate, EbSe has already been approved in clinical trials phase I, in which safety, pharmacokinetic profile and oral bioavailability in healthy humans are tested (17). Therefore, we showed for the first time murine evidence of EbSe efficacy against systemic invasive aspergillosis. Vor was used as standard drug and showed similar efficacy as the treatment with EbSe. In addition, the selective manner in which EbSe links to human and fungi/prokaryotes TrxR, confers to TrxR an excellent drug target (26). Thus, more animal studies are required in order to evaluate the potential role of EbSe as alternative option for management of disseminated aspergillosis in humans.

## REFERENCES

1. Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Mar;72(1):i39-i47.
2. Ostrosky-Zeichner L, Al-Obaidi M. Invasive fungal infections in the intensive care unit. *Infect Dis Clin North Am.* 2017 Sep;31(3):475-87.
3. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016 Aug;63(4):e1-e60.
4. Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet.* 2016 Feb;387(10020):760-9.
5. Shirley M, Scott LJ. Isavuconazole: A review in invasive aspergillosis and mucormycosis. *Drugs.* 2016 Nov;76(17):1647-57.
6. Bassetti M, Poulakou G, Ruppe E, Bouza E, Van Hal SJ, Brink A. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Med.* 2017 Oct;43(10):1464-75.
7. Jenks JD, Mehta SR, Hoenigl M. Broad spectrum triazoles for invasive mould infections in adults: Which drug and when? *Med Mycol.* 2019 Apr;57(2):S168-S178.
8. Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Missel B, Meersseman W, Cardoso T, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care.* 2015 Jan;19(1):7.
9. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 2017 Dec;17(12):e383-e392.
10. Webb BJ, Ferraro JP, Rea S, Kaufusi S, Goodman BE, Spalding J. Epidemiology and clinical features of invasive fungal infection in a US health care network. *Open Forum Infect Dis.* 2018 Jul;5(8):ofy187.
11. Price CL, Parker JE, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag Sci.* 2015 Aug;71(8):1054-8.
12. Issa NT, Kruger J, Byers SW, Dakshanamurthy S. Drug repurposing a reality: from computers to the clinic. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2013 Mar;6(2):95-7.
13. Butts A, Krysan DJ. Antifungal drug discovery: something old and something new. *PLoS Pathog.* 2012 Sep;8(9):e1002870.
14. Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nature Microbiol.* 2019 Mar;4:565-77.
15. Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, et al. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke.* 1998 Jan;29(1):12-7.
16. Singh N, Sharpley AL, Emir UE, Masaki C, Herzallah MM, Gluck MA, et al. Effect of the putative lithium mimetic ebselen on brain myo-inositol, sleep, and emotional processing in humans. *Neuropsychopharmacology.* 2016 Jun;41(7):1768-78.
17. Kil J, Lobarinas E, Spankovich C, Griffiths SK, Antonelli PJ, Lynch ED, et al. Safety and efficacy of ebselen for the prevention of noise-induced hearing loss: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2017 Sep;390(10098):969-79.
18. Pietka-Ottlik M, Wójtowicz-Młochowska H, Kołodziejczyk K, Piasecki E, Młochowski J. New organoselenium compounds active against pathogenic bacteria, fungi and viruses. *Chem Pharm Bull.* 2008 Oct;56(10):1423-7.
19. Ngo HX, Shrestha SK, Garneau-Tsodikova S. Identification of ebsulfur analogues with broad-spectrum antifungal activity. *ChemMedChem.* 2016 Jul;11(14):1507-16.
20. Thangamani S, Eldesouky HE, Mohammad H, Pascuzzi PE, Avramova L, Hazbun TR, et al. Ebselen exerts antifungal activity by regulating glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017 Jan;1861(1 Pt A):3002-10.



21. Kubiça TF, Denardi LB, Silva de Loreto É, Zeni G, Weiblen C, Oliveira V, et al. In vitro activity of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Trichosporon asahii*. *Mycoses*. 2019 May;62(5):428-33.
22. Marshall AC, Kidd SE, Lamont-Friedrich SJ, Arentz G, Hoffmann P, Coad BR, et al. Structure, mechanism, and inhibition of *Aspergillus fumigatus* thioredoxin reductase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 26;63(3). pii:e02281-18.
23. Capoci IRG, Faria DR, Sakita KM, Rodrigues-Vendramini FAV, Bonfim-Mendonça PS, Becker TCA, et al. Repurposing approach identifies new treatment options for invasive fungal disease. *Bioorg Chem*. 2019 Mar;84:87-97.
24. 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 Jun 4;13(6):e0007441.
25. Zhao R, Masayasu H, Holmgren A. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8579-84.
26. Ren X, Zou L, Lu J, Holmgren A. Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic. *Free Radic Biol Med*. 2018 Nov;127:238-47.
27. Rudramurthy SM, Seyedmousavi S, Dhaliwal M, Chakrabarti A, Meis JF, Mouton JW. Pharmacodynamics of voriconazole against wild-type and azole-resistant *Aspergillus flavus* isolates in a nonneutropenic murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Dec 27;61(1):e0149-16.
28. Monteiro MC, de la Cruz M, Cantizani J, Moreno C, Tormo JR, Mellado E, et al. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J Biomol Screen*. 2012 Apr;17(4):542-9.
29. Desoubieux G, Cray C. Rodent models of invasive aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: Still a long path toward standardization. *Front Microbiol*. 2017 May;8:841.
30. Sionov E, Segal E. Polyene and cytokine treatment of experimental aspergillosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Dec;39(3):221-7.
31. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001 Feb;32(3):358-66.
32. May HC, Yu JJ, Guentzel MN, Chambers JP, Cap AP, Arulanandam BP. Repurposing auranofin, ebselen, and PX-12 as antimicrobial agents targeting the thioredoxin system. *Front Microbiol*. 2018 Mar;9:336.
33. Wiederhold NP, Patterson TF, Srinivasan A, Chaturvedi AK, Fothergill AW, Wormley FL, et al. Repurposing auranofin as an antifungal: In vitro activity against a variety of medically important fungi. *Virulence*. 2017 Feb;8(2):138-42.
34. Leal SM Jr, Vareechon C, Cowden S, Cobb BA, Latgé JP, Momany M, et al. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *J Clin Invest*. 2012 Jul;122(7):2482-98.
35. Treviño-Rangel RJ, Villanueva-Lozano H, Méndez-Galomo KS, Solís-Villegas EM, Becerril-García MA, Montoya AM, et al. In vivo evaluation of the antifungal activity of sertraline against *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Mar;74(3):663-66.
36. Øya E, Becher R, Ekeren L, Afanou AKJ, Øvrevik J, Holme JA. Pro-inflammatory responses in human bronchial epithelial cells induced by spores and hyphal fragments of common damp indoor molds. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Mar 26;16(6):1085.
37. Filler SG, Yeaman MR, Sheppard DC. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug;41 Suppl 3:S208-12.
38. Herbst S, Shah A, Carby M, Chusney G, Kikkeri N, Dorling A, et al. A new and clinically relevant murine model of solid-organ transplant aspergillosis. *Dis Model Mech*. 2013 May;6(3):643-51.

**Keywords:** *Aspergillus* spp.; ebselen; antifungal.

## **PROTEOMIC ANALYSIS OF INDUCED POLYMYXIN RESISTANT *Klebsiella pneumoniae* AND ITS SUSCEPTIBLE COUNTERPART WITH KPC PRODUCING PROFILE**

**Paula Assis Queiroz<sup>1</sup>; Jean Eduardo Meneguello<sup>1</sup>; João Vitor de Oliveira<sup>2</sup>; Bruna Renata Silva<sup>3</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>4</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>4</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>4</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá<sup>4</sup>; Rogério Marchiosi<sup>5</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR.

<sup>2</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR.

<sup>3</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR.

<sup>4</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR.

<sup>5</sup>Professor, Department Biochemistry, State University of Maringá, Maringá, PR.

e-mail: paulaa\_queiroz@hotmail.com

### **1. INTRODUCTION**

*Klebsiella pneumoniae* is emerging as an important nosocomial pathogen due to rapidly increasing resistance to practically all currently available antibiotics, in particular carbapenems (1, 2). Due to increasing multidrug resistance (MDR) among gram-negative bacteria, including *K. pneumoniae*, and the lack of novel antibiotics to treat infections caused by MDR Gram-negative bacteria, there is a renewed interest in polymyxins (polymyxin B and colistin) as a therapy of last resort (3). Once discarded due to concerns regarding nephrotoxicity and neurotoxicity, polymyxins now hold an important role in the antibiotic armamentarium (4).

Polymyxin is a cationic polypeptide with a lipid tail which targets anionic lipopolysaccharide (LPS) molecules in the outer membranes of gram-negative bacteria, introducing changes in the permeability of the membrane which lead to leakage of cell contents and, finally, cell death (4, 5). Polymyxins resistance rates among *Enterobacteriaceae* in clinical isolates are increasing worldwide (6-8).

Gram-negative bacteria, such as *K. pneumoniae*, employ several strategies to protect themselves from polymyxin antibiotics, including a variety of lipopolysaccharide (LPS) modifications, such as modifications of lipid A with phosphoethanolamine and 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, in addition to the use of efflux pumps, the formation of capsules and overexpression of the outer membrane protein OprH, which are all effectively regulated at the molecular level. The increased understanding of these mechanisms is extremely vital and timely to facilitate studies of antimicrobial peptides and find new potential drugs targeting clinically relevant gram-negative bacteria (9).

The most common LPS modification is the cationic substitution of the phosphate groups by L-Ara4N, which decreases the net negative charge of lipid A to 0, and the second most common is the PEtN modification, which decreases the net charge from -1.5 to -1. The L-Ara4N modification is the most effective of the two modifications due to the nature of the charge alteration. The resultant net positive charge of the modified LPS reduces its binding to polymyxins, leading to resistance. The activation of two-component systems (TCSs) involving PhoP/PhoQ and PmrA/PmrB is triggered by environmental stimuli and specific mutations within the TCSs that result in their constitutive activation and subsequent overexpression of LPS-modifying genes (9-11).

In this context, special attention is needed to the transcriptome and proteome, that might play an important role in the development of drug resistance (12). During drug stress, internal harmony of the bacterial system is disturbed and rapidly bacteria adopt alternative cellular functions mediated by proteome to overcome the effect. Proteomics coupled with bioinformatics are the potential strategy to explore the biological problems. Differential expression proteome analysis of drug resistant bacteria under drug stress could unravel the novel mechanism of the bacteria to overcome the effects of drugs. Comparative proteomic studies addressing the whole cell proteome of drug resistant microbial strains with or without drug stress have been reported (13-15).

Therefore, to provide insights on shared and exclusive proteins among polymyxin heteroresistant *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) producing and its susceptible counterpart, this study reports for the first time a comparative proteomic analysis of polymyxin-sensitive ATCC® BAA-1705™ and its polymyxin-resistant mutant (heteroresistant) counterpart. The qualitative and quantitative differences in the proteins identified have potential to help understand the factors that might contribute for development of polymyxins resistance.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Clinical isolates

*K. pneumoniae* (ATCC® BAA-1705™) carbapenemase (KPC-2) positive was used in this study. The ATCC® BAA-1705™ polymyxin B minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method using cation-adjusted Mueller-Hinton broth and interpreted according EUCAST breakpoints (MIC  $\leq$  2  $\mu$ g/ml were considered susceptible). For heteroresistance, resistance induction was performed in cultures with increasing concentration of polymyxin B sulfate, by methodology adapted from Li et al. (2006) (16). The MIC was confirmed by broth microdilution method and heteroresistant ATCC® BAA-1705™ was submitted to the subculture on agar in the absence of polymyxin B. The initial ATCC® BAA-1705™ polymyxin B MIC was  $<$ 0.25  $\mu$ g/ml, and the mutant polymyxin B MIC was 32  $\mu$ g/ml. In this study, by convention, the sensitive ATCC was named S-Kp/ATCC (susceptible *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™), and mutant was named R-Kp/ATCC (resistant *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™).

To confirm genetic similarity, polymyxin-sensitive ATCC® BAA-1705™ and its polymyxin-resistant mutant were investigated by *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)(17).

### 2.2. Proteomic analysis

For proteome analysis, samples were grown in Luria Bertani agar (LBA) at 37°C/ 24 hours and cells were collected and centrifuged for 5 min at 3,000 rpm. The pellet was washed three times with ultrapure water and resuspended in 1,100  $\mu$ L of buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, and 40 mM DTT (18). Then, the suspension was sonicated (30 bursts of 10 s ON, 30 s OFF at 100% amplitude). The lysate was centrifuged at 4,800 rpm for 10 min at 4°C, and stored at  $-80^{\circ}$ C. The Bradford assay was performed for protein quantification, using bovine serum albumin (Sigma) as a standard (19). Prior to digestion, proteins were denatured with 8 M urea, then reduced with 5 mM dithiothreitol (DTT) and alkylated with 14 mM iodoacetamide (IAA). To quench the remaining IAA, 5 mM DTT was added. Samples were diluted with four volumes of 50 mM ammonium bicarbonate, and 1 mM calcium chloride was added, followed by trypsin (V5280–Promega) digestion at 37°C overnight (ratio of 1  $\mu$ g enzyme to 100  $\mu$ g protein) and then, acidified with 0.4% trifluoroacetic acid to inactivate the trypsin and desalted using SepPak tC18 cartridges (Waters, Milford, EUA).

### 2.3. Liquid Chromatography - Electrospray High Definition Mass Spectrometry (LC-HDMS<sup>F</sup>) analysis, data processing, database searching and quantification

Two-dimensional reversed phase (2D RP $\times$ RP) Nano Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (nanoUPLC-MS) approach with multiplexed Nano Electrospray High Definition Mass Spectrometry (nanoESI-HDMSE) were used for qualitative and quantitative proteomics analysis according to methodology described by Silva et al. 2017 (20, 21). All analyses were performed using nanoelectrospray ionization in the positive ion mode nanoESI (+) and a NanoLockSpray (Waters, Manchester, UK) ionization source (21).

Following the identification of proteins, the quantitative data were packaged using dedicated algorithms and searching against a database with default parameters to account for ions (21, 22). Protein Lynx Global Server v.2.5.2 (PLGS) with IdentityE and ExpressionE informatics v.2.5.2 (Waters) were used for spectra processing and database searching conditions.

We have utilized a database from genome annotation of *K. pneumoniae* 30660/NJST258\_1 (redundant for ATCC® BAA-1705™) and following the identification, UniProtKB with manually reviewed annotations was used, the search conditions were based on the taxonomy (*K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™). The collected proteins were organized by the PLGS ExpressionE tool algorithm into a statistically significant list that corresponded to higher or lower regulation ratios among *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 polymyxin resistant and susceptible. Thus, these data were organized and analyzed in excel spreadsheets, and were considered only statistically significant proteins, according to the analyzes described below.

For protein quantitation, the PLGS v2.5.2 software was used with the IdentityE algorithm (21). According to Silva et al. 2017, the quantitative values were averaged over all samples, and the standard deviations at  $p < 0.05$  were determined using the Expression software (significant  $p = 1$  for up-regulated protein and  $p = 0$  for down-regulated protein – table 1). Non-redundant proteins were disregarded and only proteins with a differential expression log<sub>2</sub> ratio between the two conditions greater than or equal to 1.2 were considered (21, 23).

All proteins were classified according to molecular functions and/or biological processes obtained from UniProt (<https://www.uniprot.org/>) and searches in different databases (pubmed, uniprotKB, and others).

### 3. RESULTS

In this study, we applied the 2D nanoUPLC-HDMS<sup>E</sup> approach to characterize the proteome of the polymyxin-sensitive ATCC® BAA-1705<sup>TM</sup> and its polymyxin-resistant mutant (heteroresistant) counterpart. Both strains were grown in LBA, subsequently proteins were extracted and digested in solution, and then the peptides were analyzed by LC-HDMS<sup>E</sup>. A total of 238 proteins were identified and quantified and proteins were compared (S-Kp/ATCC: R-Kp/ATCC). For quantitative analysis, only proteins with a differential expression between the two conditions were considered.

Thiol peroxidase, Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta and Acriflavin resistance periplasmic protein are up-regulated in polymyxin B resistant *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (down-regulated in polymyxin B susceptible *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705). Outer membrane protein A (OMP A) was the only protein up-regulated in S-Kp/ATCC (Table 1). Exclusive proteins are identified in S-Kp/ATCC and R-Kp/ATCC (Table 2).

**Table 1: Differentially regulated proteins between polymyxin B susceptible *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 (S-Kp/ATCC) and polymyxin B resistant *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 (R-Kp/ATCC)**

Accession	Description	Score	S-Kp/ATCC: R-Kp/ATCC Log(2)Ratio <sup>(a)</sup>	p- value <sup>(a)</sup>	Function/ Biological Process (BP)
A0A0E1CGD9	Outer membrane protein A	8954,82	1,29	1	Structural molecule activity; Cell outer membrane Integral component of membrane; Lipid A acts as a hydrophobic anchor with the tight packing of the fatty acyl chains helping to stabilize the overall outer membrane structure (24).
A0A0E1CJT5	Thiol peroxidase	4190,69	-1,2	0	Thioredoxin peroxidase activity; Thiol-specific peroxidase that catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides to water and alcohols, respectively. Plays a role in cell protection against oxidative stress by detoxifying peroxides. BP: cell redox homeostasis
A0A0E1CH76	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	1277,5	-1,57	0	ATP binding; Magnesium ion binding; Succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity; Catalytic activity. BP: tricarboxylic acid cycle
A0A0E1CIT3	Acriflavin resistance periplasmic protein	2287,41	-1,24	0	AcrA and acrB genes encode a multi-drug efflux system that is believed to protect the bacterium against hydrophobic inhibitors (25). Transmembrane transporter activity

**Table 2: Exclusive proteins identified in polymyxin B susceptible *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 polymyxin susceptible (S-Kp/ATCC) and polymyxin B resistance *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 (R-Kp/ATCC)**

Description	Biological Process/ Function
<b>S-Kp/ATCC</b>	
D-threo-aldose 1-dehydrogenase	D-threo-aldose 1-dehydrogenase activity; Oxidoreductase
ATP synthase subunit alpha	Catalytic activity
Transaldolase	Carbohydrate metabolic process; Pentose-phosphate shunt
Thioredoxin peroxidase	Peroxidase activity; Peroxiredoxin activity
Ecotin	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor
Aminotransferase	Pyridoxal phosphate binding; Transaminase activity
Transporter_ drug/metabolite exporter family protein	Transmembrane protein EamA: integral component of membrane
Phosphate acetyltransferase	Phosphate acetyltransferase activity
<b>R-Kp/ATCC</b>	
UPF0325 protein KPNJ1_04542	Coiled coil
PTS system_ diacetylchitobiose-specific IIA component	Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system: D-glucosamine PTS permease activity; metal ion binding; protein-N(PI)-phosphohistidine-sugar phosphotransferase activity



<b>Short chain dehydrogenase</b>	Oxidoreductase activity
<b>3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase</b>	Oxidoreductase; fatty acid biosynthetic process
<b>Aldo/keto reductase family protein</b>	Oxidoreductase activity
<b>Citrate synthase</b>	Catalytic activity: citrate (Si)-synthase activity; Biological process: tricarboxylic acid cycle
<b>Transketolase <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	Catalytic activity: Catalyzes the transfer of a two-carbon ketol group from a ketose donor to an aldose acceptor, via a covalent intermediate with the cofactor thiamine pyrophosphate. Metal ion binding; transketolase activity.
<b>Aminoglycoside N6'-acetyltransferase</b>	N-acetyltransferase
<b>PTS system_ glucose-specific IIA component</b>	Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system
<b>Autonomous glycyl radical cofactor</b>	Acts as a radical domain for damaged PFL and possibly other radical proteins. Transferase activity.
<b>Lysozyme</b>	Metabolic process: lysozyme activity
<b>Glutaredoxin</b>	Molecular function: electron transfer activity; protein disulfide oxidoreductase activity; Cell redox homeostasis
<b>DNA-binding protein parB</b>	DNA binding
<b>Putative membrane spanning protein</b>	Transmembrane protein: integral component of membrane; plasma membrane.
<b>Transcriptional regulator_ LysR family protein</b>	Integral component of membrane (Transmembrane) - DNA-binding transcription factor activity
<b>2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component</b>	Tricarboxylic acid cycle: Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) activity; thiamine pyrophosphate binding.
<b>Ribosome-associated factor Y</b>	Primary metabolic process
<b>Transaldolase</b>	Transaldolase is important for the balance of metabolites in the pentose-phosphate pathway. Carbohydrate metabolic process; pentose-phosphate shunt
<b>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</b>	Phosphoglycerate dehydrogenase activity
<b>Cell division topological specificity factor</b>	Cell cycle; cell division; regulation of division septum assembly. Prevents the cell division inhibition by proteins MinC and MinD at internal division sites while permitting inhibition at polar sites. This ensures cell division at the proper site by restricting the formation of a division septum at the midpoint of the long axis of the cell.

#### 4. DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study on comparative proteomic analysis of polymyxin-sensitive *K. pneumoniae* and its polymyxin-resistant mutant (heteroresistant) counterpart.

In this study, OMPA, an integral component of membrane, is up-regulated in S-Kp/ATCC. OmpA is a well-characterized OMP. LPS is composed of three domains, a conserved inner core 2-keto-3-deoxyoctonic acid (Kdo) bound to lipid A and a variable O-antigen composed of repeating units of various polysaccharides. Lipid A acts as a hydrophobic anchor with the tight packing of the fatty acyl chains helping to stabilize the overall outer membrane structure (24). Polymyxins exert their antimicrobial action by permeabilizing the bacterial outer membrane via direct interaction with the lipid A component of the LPS. The narrow spectrum of activity of polymyxins for Gram-negative bacteria is coincident with their binding selectivity for LPS (5, 24). The amphipathicity of the polymyxins and, possibly, their ability to form porelike aggregates may be responsible for their outer membrane permeabilizing action (5, 6).

According to Llobet et al. (2009), the absence of OmpA may interfere with the expression of systems dedicated to ameliorate antimicrobial peptides (AP) cytotoxicity. If this is so, a brief exposure of *K. pneumoniae* to polymyxin B should increase its resistance to APs in an OmpA-dependent manner (26). These literature data corroborate to our results. The decrease of OMPA in ATCC heteroresistant contributes to polymyxin resistance, an exposure of *K. pneumoniae* in cultures with increasing concentration of polymyxin B should increase its resistance to polymyxin B.

Thiol peroxidase, Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta and Acriflavin resistance periplasmic protein are upregulated in polymyxin B resistant *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (down-regulated in polymyxin B susceptible *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705). Analysis of functional enrichment revealed that the functions involved among the upregulated proteins were peroxidase activity, transmembrane, catalytic activity and transporter activity, respectively (Table 1).

Thiol peroxidase plays a role in cell protection against oxidative stress by detoxifying peroxides. According to Ulrich & Jakob (2019), thiols are carefully balanced to maintain redox homeostasis in various



cellular compartments, protect organisms from oxidative and xenobiotic stressors and partake actively in redox-regulatory and signaling processes (27). These proteins are from major metabolic pathways or are involved in cell detoxification and stress response in Gramnegative and Grampositive bacteria (28, 29).

In Gramnegative bacteria, acriflavin resistance periplasmic protein genes encode a multi-drug efflux system that is believed to protect the bacterium against hydrophobic inhibitors (25).

We suggest that cumulative effect of overexpressed proteins, mapped pathways and interactive proteins partner of the over expressed proteins might be involved in polymyxin drugs cleavage, modifications and transport which may contribute to the polymyxin resistance.

## 5. CONCLUSION

To concise, the present study focused the whole proteome of polymyxin heteroresistant *K. pneumoniae* carbapenemase producing and its susceptible counterpart through proteomic approaches. The evaluation of proteins differentially expressed in this study suggested their direct or indirect role in the polymyxin resistance. Proteins up-regulated in heteroresistant ATCC and OMPA down-regulated in this group may contribute to the polymyxin resistance. Protein targets and their pathways might open a new vistas of drug resistance and could be used for the development of novel therapeutics against the resistance. Thus, the situation of emergence of polymyxin resistance in Gram negative bacteria could be prevented.

## REFERENCES

1. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016;7:895.
2. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(9):785-96.
3. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat.* 2010; 13(4-5): 132-8.
4. Landman D, Georgescu C, Fau - Martin DA, Martin Da Fau - Quale J, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(3): 449-65.
5. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet.* 1997; 349(9049): 418-22.
6. Zhu Y, Galani I, Karaiskos I, Lu J, Aye SM, Huang J, et al. Multifaceted mechanisms of colistin resistance revealed by genomic analysis of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from individual patients before and after colistin treatment. *J Infect.* 2019 Jul 30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.07.009> [Epub ahead of print]
7. Malchione MD, Torres LM, Hartley DM, Koch M, Goodman J. Carbapenem and Colistin Resistance in *Enterobacteriaceae* in Southeast Asia: Review and Mapping of Emerging and Overlapping Challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Jul 29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.07.019> [Epub ahead of print]
8. Mammìna C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill.* 2012 Aug 16; 17(33). pii: 20248.
9. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014; 5:643.
10. Gunn JS, Ryan SS, Van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Infect Immun.* 2000;68(11):6139-46.
11. Gunn JS. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* 2008;16(6):284-90.
12. Freiberg C, Brotz-Oesterhelt H, Labischinski H. The impact of transcriptome and proteome analyses on antibiotic drug discovery. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7(5):451-9.
13. Sharma D, Garg A, Kumar M, Khan AU. Proteome profiling of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* clinical isolate (NDM-4): Exploring the mechanism of resistance and potential drug targets. *J Proteomics.* 2019; 200:102-110.
14. Khan A, Sharma D, Faheem M, Bisht D, Khan AU. Proteomic analysis of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain in response to meropenem stress. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017; 8:172-178.

15. Santos KV, Diniz CG, Veloso LC, Andrade HM, Giusta MS, Pires SF, et al. Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Research in microbiology*. 2010; 161(4):268-75.
16. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(9):2946-50.
17. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(24):6823-31.
18. Fiorini A, Rosado FR, Bettega EM, Melo KC, Kukolj C, Bonfim-Mendonca PS, et al. *Candida albicans* protein profile changes in response to the butanolic extract of *Sapindus saponaria*L. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016; 58: 25.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microGram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
20. Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *J Sep Sci*. 2005; 28(14): 1694-703.
21. Silva, WM, Folador EL, Soares SC, Souza GHM, Santos AV, et al. Label-free quantitative proteomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between *Biovars ovis* and *equi* strains. *Genomics*. 2017; 18:451.
22. Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*. 2009; 9(6): 1696-719.
23. Levin Y, Hradetzky E, Bahn S. Quantification of proteins using data-independent analysis (MSE) in simple and complex samples: a systematic evaluation. *Proteomics*. 2011; 11(16): 3273-87.
24. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(4): 593-656.
25. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, et al. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1995 Apr;16(1):45-55.
26. Llobet E, March C, Giménez P, Bengoechea JA. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(1): 298-302.
27. Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035. [Epub ahead of print].
28. Xie K, Bunse C, Marcus K, Leichert LI. Quantifying changes in the bacterial thiol redox proteome during host-pathogen interaction. *Redox Biol*. 2019; 21:101087.
29. Hajaj B, Yesilkaya H, Benisty R, David M, Andrew PW, Porat N. Thiol peroxidase is an important component of *Streptococcus pneumoniae* in oxygenated environments. *Infect Immun*. 2012; 80(12): 4333-43.

**Keywords:** proteomics; *Klebsiella pneumoniae*; polymyxin resistance.



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology

Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Novas abordagens para tratamento das infecções fúngicas

## NEW APPROACH FOR TREATMENT OF DERMATOPHYTOSIS BY HYPERICIN-MEDIATED PHOTODYNAMIC

Camila Barros Galinari<sup>1</sup>; Pollyanna Cristina Vicenzi Conrado<sup>1</sup>; Valéria Aparecida Baquetti Mosca<sup>2</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>2</sup>; Raquel Cabral Melo<sup>1</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>2</sup>; Daniella Renata Faria<sup>2</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>; Erika Seki Kioshima Cotica<sup>3</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Graduate student (Doctorate degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Clinical Analyzes and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR  
e-mail: camisgalinari@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Superficial fungal infections are relevance in dermatological clinical practice (1) mainly represented by the dermatophytic fungi affecting 20-25% of the world population (2). Essential characteristic of these fungi is the consumption of the keratin as nutrition, thus the possible infection sites comprise the skin, hair and nails (3). Epidemiological data demonstrated an increase in cases involving the genus *Microsporum* spp., especially *M. canis* species, being a major agent of *Tinea capitis* and may develop *Tinea corporis* in humans (4). Among the risk factors related to the increasing prevalence of dermatophytosis is the inefficiency of conventional therapy, hepatotoxic effects, besides being of long duration and expensive, decreasing patient adherence (5). Consequently, these conditions suggest the search for new strategies for the elimination of such fungi.

The superficial nature of dermatophytosis and consequent ease of application of a light source, highlights photodynamic therapy (PDT) as a promising technique for treatment of the dermatophytosis (6). In recent years, studies have pointed Hypericin (Hyp) as an important photosensitizer for use with PDT, and is naturally found in plant species *Hypericum perforatum* (7). There are no research determining the use of Hyp-PDT against *M. canis*. Thereby, the aim of this study was to evaluate the efficiency of PDT conducted with Hyp against planktonic cells and murine model of dermatophytosis occasioned by *M. canis*.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Ethics statement

Clinical isolates were used in accordance with the authorization of the Human Research Ethics Committee COPEP-UEM (nº 2.748.843), and all procedures with animals were approved by the Ethics Committee for Animal Use, under the protocol number CEUA-UEM (nº 5708300418).

#### 2.2. Microorganisms

Clinical isolates of *M. canis* were selected from the culture collections of the Laboratory of Medical Mycology of State University of Maringá (UEM), Brazil. The strains were grown in potato dextrose agar (PDA), incubated for seven days at 25 °C. The number of microconidia was counted in Neubauer chamber and the inoculum was adjusted for the next assays.

#### 2.3. Photosensitizer solutions and light sources

The Nucleus of Research in Photodynamic Systems (NUPESF-UEM) synthesized the Hyp, incorporated into 0.025% de Pluronic P123 micelle (Sigma-Aldrich). Light-emitting diode (LED) lamp emitting at 650 nm with an irradiance of 3.0 mW/cm<sup>2</sup>, and fluence 16.2 J/cm<sup>2</sup> was used for *in vitro* assay. LED with an irradiance of 26.4 mW/cm<sup>2</sup> emitting a wavelength at 650 nm, and fluence of the 93.6 J/cm<sup>2</sup> for *in vivo* assays.

#### 2.4. *In vitro* Photodynamic Inactivation (PDI)

To determine antifungal activity of Photodynamic Inactivation with hypericin (Hyp-PDI) against planktonic cells of *M. canis*, the inoculum was adjusted to final concentration of 1x10<sup>5</sup> microconidia ml<sup>-1</sup>. Equal volume of inoculum and Hyp at nine different concentrations (25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 and 0.09 µmol/L), were added in microtiter plates and incubated in the dark at 25 °C for 120 minutes. After incubation, the samples were irradiated with LED. The PDI was evaluated at two times, immediately after irradiation (0h) and 24h after re-incubation of samples at 25°C. For this, the minimum fungicidal concentration (MFC) was evaluated using logarithmic colony forming units per mL (log CFU/mL) count for to quantify the

reduction of fungal cell viability. Aliquots of each concentration were plated on PDA and incubated for five days at 25°C. Light control (without hypericin) and fungal control (without LED and hypericin), were included.

## 2.5. Toxicity *in vivo*

These assays were performed to evaluate acute or metabolic effects of the use of Hyp-PDT after its application to the skin.

### 2.5.1. Topical toxicity

An area of 2.5 cm x 2.5 cm (6.25 cm<sup>2</sup>) on the back of animals was delimited and the hair epilation was performed. Thereby, the animals were arranged in four groups with four animals each one: control group treated with 0.85% sterile saline, one group treated with LED, one group treated with Hyp and another group treated with Hyp-PDT. Visual skin assessment was performed one day after each treatment session, dividing it in four same quadrants of 1.25 cm x 1.25 cm (2.5 cm<sup>2</sup>), following the score from 0 to 4: 0 = without changes; 1 = erythema; 2 = edema; 3 = peeling and 4 = wound formation (8). For each session of the treatment these scores were summed and divided by the number of animals per group, according to the following formula:  $Msl = Ssl/N$ ; where Msl= mean scores of lesions per group; Ssl= sum of lesion scores per group and N= number of animal per group (9).

### 2.5.2. Biochemical examination

On the last day, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), creatinine and glucose (Gold Analisa, Brazil) were evaluated. Furthermore, mice were weighed on the first and last day of the experiment.

## 2.6. Photodynamic therapy in murine skin infection model

### 2.6.1. Experimental animal work

Animals were divided into four groups with ten animals each one: negative control without infection; infected group with *M. canis* (control); infected and treated group with Hyp-PDT (Hyp-PDT); infected and treated group with terbinafine 1% (terbinafine).

### 2.6.2. Technique of animal inoculation

Animal infection was performed based on the method described by Ghannoum et al. (2004) with modifications. First, animals were anaesthetized by Isoflurane and an area 6.25 cm<sup>2</sup> on the back of animals was delimited, being performed in this region the epilation of the hairs and stratum corneum was reduced by abrasion with a fine sandpaper. A cell suspension containing 1x10<sup>8</sup> conidia/mL of *M. canis* was applied to the demarcated area. The application of the inoculum was carried out three consecutive days, according timeline (Figure 2).

### 2.6.3. Photodynamic therapy (PDT)

The PDT was initiated on the fifth day post infection, using Hyp at 6.25 µmol/L applied to the skin of mice, 30 minutes before LED irradiation. The treatment was performed every 48h and the animals were euthanized after three sessions according timeline (Figure 2). Terbinafine 1% was conducted on the same days as PDT as a treatment control.

### 2.6.4. Clinical evaluation of the lesions

Changes related to the presence of erythema, scaling, tegument damage or hair-loss at the site of inoculation were visually examined and recorded on the 4th, 10th and 16th day of the infection, and were used in the clinical assessment of efficacy of the Hyp-PDT. To determine the treatment efficiency, the infected area (2.5 cm<sup>2</sup>) on back of each mice was divided into four equal quadrants, following the semiquantitative score based on the previously described method (9): 0 = no signs of infection; 1 = few slightly erythematous areas on the skin; 2 = well-defined redness and incrustation; 3 = large areas of marked redness and scaling; 4 = partial damage to the integument and swelling with bristling hairs; and 5 = extensive damage to the integument and loss of hair at the around the infection site. For the evaluation of the score was used the same calculation described in section 2.3.

### 2.6.5. Mycological evaluation

Skin sections were weighted and macerated with lysis buffer to quantify the colony forming units (CFU). Fifty microliters of epidermal cell suspension of each animal were cultured in PDA plates and the logarithmic CFU values were determined after 7 days, expressed as CFU number/g skin.

The hair root invasion (HRI) test, was applied to evaluate the ability of the infection to progression to the hairs and of mycological cure resulting from antifungal treatment previously described. Thus, the infected area was divided into four 1.25 cm x 1.25 cm (2.5 cm<sup>2</sup>) equal quadrants as described in topical toxicity. The same proportion of hairs were uprooted per quadrant in each animal both in the treatment and control groups, planted on the surface on PDA and after incubation at 25°C for seven days, the results were evaluated qualitatively by the presence or absence of fungal growth. Additionally, pieces of skin were planted in PDA under the same conditions as HRI test, in order to observe the efficiency of the treatment.



### 2.6.6. Histopathology analysis

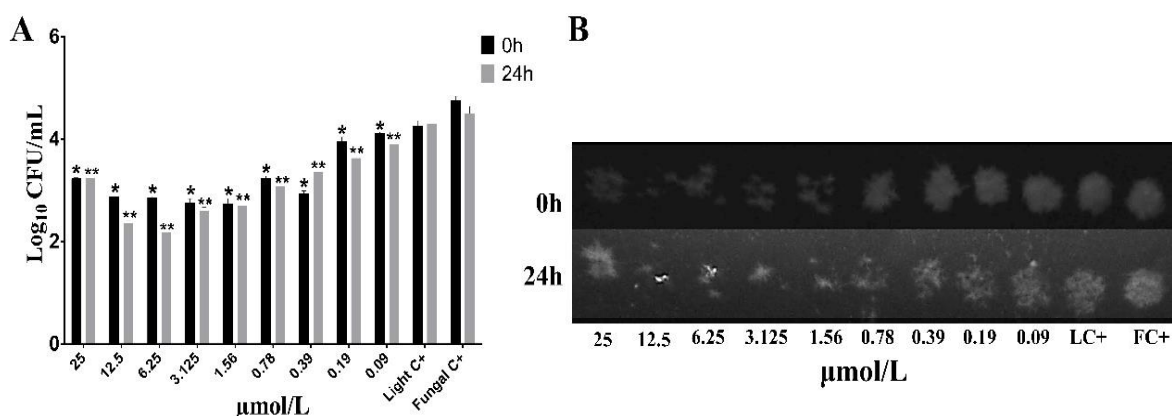
Skin biopsies of all groups were immediately fixed buffered in 10% (v/v) formalin (pH 7.4), dehydrated in ethyl alcohol and embedded in paraffin. Sections were cut and stained with haematoxylin and eosin (H/E) to examine tissue response to microorganism and grocott's methenamine silver stain (GMS) stains to identify the fungal structures and examined under light microscopy.

### 2.7. Statistical analysis

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

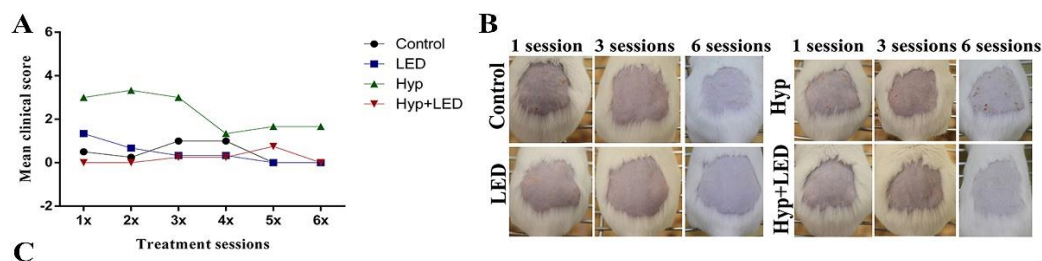
## 3. RESULTS

*In vitro* assays demonstrated that *M. canis* is susceptible to treatment using Hyp-PDI, Figure 1. Statistically significant inhibition ( $p < 0.05$ ) was observed from 0.09  $\mu\text{mol/L}$ , at both times evaluated. Reduction of fungal viability of approximately 2log was observed at a concentration of 6.25  $\mu\text{mol/L}$ , representing the minimum fungicidal concentration. Shortly after Hyp-PDT, a reduction of 1.8  $\log_{10}$  CFU/mL ( $p = 0.0010$ ) was observed. After 24-Hyp-PDT, there was an increase in fungal death, and the reduction was 2.3  $\log_{10}$  CFU/mL ( $p = 0.0019$ ).



**Figure 1. Representation of *in vitro* antifungal activity of photodynamic inactivation with hypericin against *Microsporum canis*.** (A) Quantitative evaluation of the Colony Forming Units ( $\log_{10}$  CFU/mL). (B) Qualitative evaluation of the Minimal Fungicidal Concentration (MFC). Strain was exposed to decreasing concentrations of Hyp (25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 and 0.09  $\mu\text{mol/L}$ ), with fluence 16.2 J/cm<sup>2</sup>. The evaluations were performed in two stages: after irradiation 0h and 24h after. Light C+ (LC+): without hypericin. Fungal C+ (FC+) without LED and hypericin. *t*-test: \* $p < 0.05$  (0h) and \*\* $p < 0.05$  (24h) in relation to the fungal control.

The Figure 2 summarizes the findings associated with acute toxicity of Hyp-PDT in animal skin. Evaluation of clinical signs did not show erythematous areas, edema or peeling, between control and treated groups. Only some animals treated with hypericin without LED exposure showed small skin regions with erythema (Figure 2-A-B). Additionally, biochemical serum parameters and weight, showed that the treatments had no metabolic imbalance in animals (Figure 2-C). The assessment of topical toxicity confirmed the reliability of the application of photodynamic treatment conducted with hypericin that enabled the progress of antifungal activity assays.

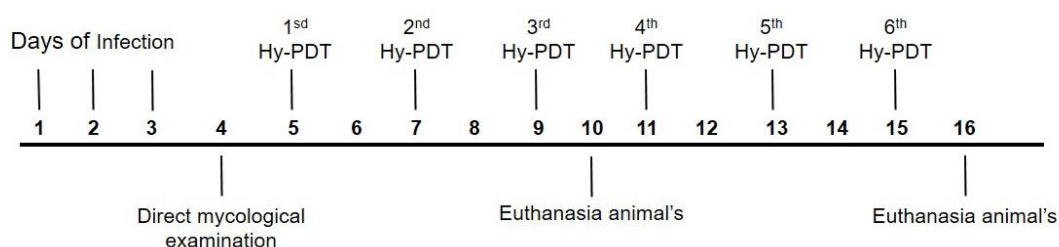


	Biochemical Analysis ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) mg/dL				Animal weight ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) gram	
	AST	ALT	Creatinine	Glucose	Weight 1 <sup>th</sup>	Weight 13 <sup>th</sup>
Control	45 $\pm$ 9.89	38.66 $\pm$ 8.02	0.5 $\pm$ 0.28	152.56 $\pm$ 3.42	44.2 $\pm$ 5.31	44.50 $\pm$ 5.78
LED	54.33 $\pm$ 2.51	37.0 $\pm$ 9.84	0.26 $\pm$ 0.05	173 $\pm$ 49.99	41.85 $\pm$ 5.03	42.04 $\pm$ 4.26
Hyp	55.33 $\pm$ 18.47	36.66 $\pm$ 12.05	0.2 $\pm$ 0.1	155 $\pm$ 18.89	42.69 $\pm$ 3.48	42.73 $\pm$ 3.00
Hyp+LED	64.33 $\pm$ 7.57	35.0 $\pm$ 17.52	0.25 $\pm$ 0.07	153.13 $\pm$ 10.95	43.13 $\pm$ 2.62	44.15 $\pm$ 3.90

**Figure 2. Topical toxicity assays of treatment applying Photodynamic therapy on murine model of dermatophytosis occasioned by *Microsporum canis*.** (A) Clinical changes score after each treatment session (1x to 6x).

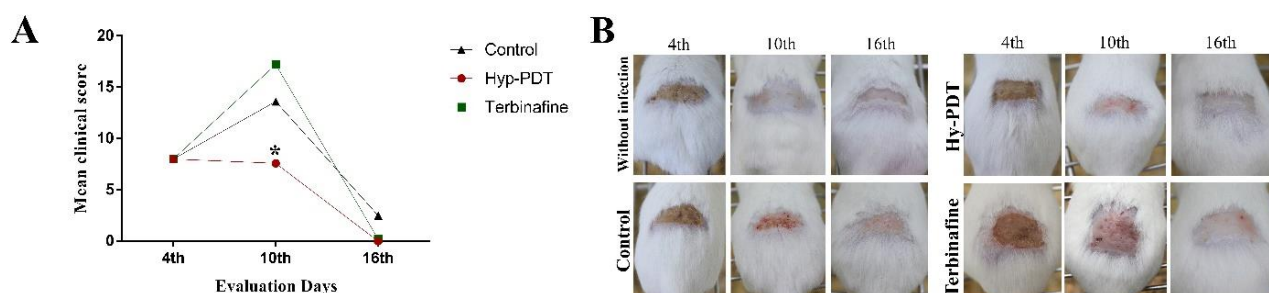
(B) Representative photographs of the treated dorsal area after one, three and six sessions. (C) Table with biochemical analysis data in serum and weight of animals. Aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and creatinine parameters were evaluated by kinetic methodology and Glucose by colorimetric reaction. Control: animals treat with 0.85% saline.

Experimental animal model of cutaneous dermatophytosis induced by *M. canis* used in this work was consistent. Clinical and microscopic signs of fungal infection were observed since the 4th to the last day of experiment. Figure 3 explains the protocol of experimental animal work.

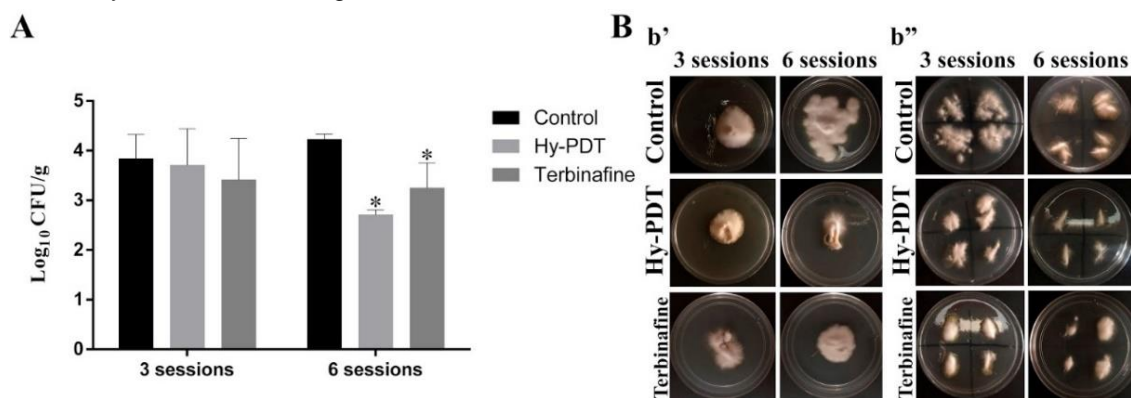


**Figure 3. Timeline of the infection and treatment of the experimental murine model of dermatophytosis occasioned by *Microsporum canis*.** The animals were infected 3 consecutive days. The 4th day confirmed the infectious condition. The treatment was conducted by six sessions, every 48h (5th, 7th, 9th, 11th, 13th and 15th day). Antifungal efficacy were evaluated on 10th day and 16th day treatment.

Clinical evaluations (Figure 4) showed that at the last time evaluated (16th day) the groups presented similar lesions. However, it should be noted that the Hyp-PDT group showed early clinical improvement of the infectious process. After three treatment sessions (10th day), the control ( $p = 0.0276$ ) and terbinafine ( $p = 0.0177$ ) groups exhibited statistically more edema, tegument damage and scales, compared with Hyp-PDT group.



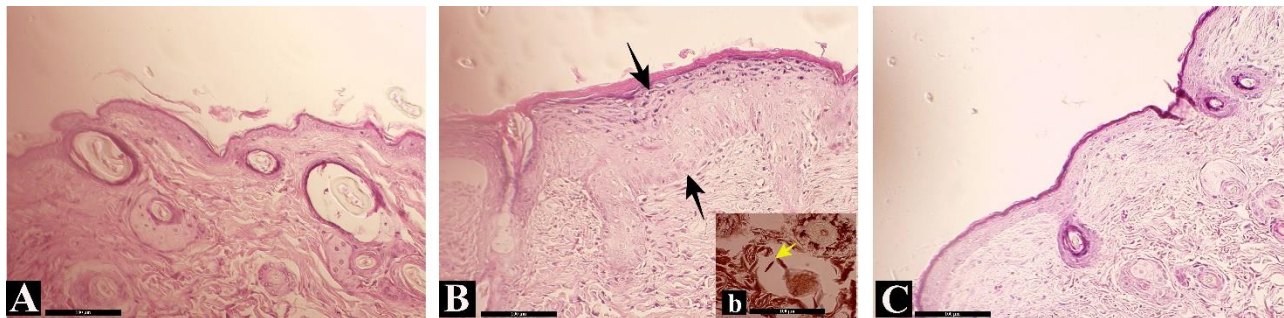
The Figure 5 shows the efficiency of Hyp-PDT in murine model of dermatophytosis occasioned by *M. canis*. After three sessions of treatment (10th day) there was no difference in the quantification of fungal viability (Figure 5A) and in the qualitative tests between the groups (Figure 5B). Interestingly, after six treatment sessions (16th day) the Hyp-PDT showed fungal burden decrease of  $1.5 \log_{10}$  CFU/g skin ( $p < 0.0001$ ) compared to the control group. This reduction was greater than that exhibited by treatment with terbinafine, which resulted in a reduced number of  $0.97 \log_{10}$  CFU/g skin ( $p = 0.0400$ ). Corroborating with these results, the qualitative assays illustrate the fungal reduction found.



**Figure 5. Mycological evaluation of antifungal efficiency of treatments against murine model of dermatophytosis occasioned by *Microsporum canis*.** (A) Quantitative evaluation of the colony forming units ( $\log$  CFU/g) and (B) Qualitative evaluation of the colony forming units ( $\log$  CFU/g).

and (B) Qualitative evaluation antifungal activity: b') pieces of skin planted in potato dextrose agar and b'') hair root invasion test. 10th: three treatment sessions and 16th: six treatment sessions. t-test: \* $p < 0.05$  compared with the control group.

On microscopic examination, histopathological changes were identified in the infected control group, which presented proliferation of the epidermis with hyperkeratosis, with the thick stratum corneum.



**Figure 6. Histopathological assessment of the skin of mice induced to *Microsporum canis* dermatophytic infection, with H/E and GMS staining.** (A) Without infection, (B) infected control without treatment and (C) infected and treated with Hyp-PDT. (b) GMS staining: fungal presence inside hair follicles (yellow arrow). The black arrows represent the presence of thickening in the skin of the infected control group.

#### 4. DISCUSSION

*Microsporum canis* is a pathogenic fungus distributed worldwide with increasing epidemiology in the last decades in cases of *Tinea capitis* and *Tinea corporis*, reported on different geographical regions (4). Infections by this species are characterized by recurrence and treatment failure has been recorded in 25–40% of treated patients, potentially due to lack of patient compliance, lack of drug penetration into tissue, variable medication bioavailability, and resistance phenomena (5). The present work shows for the first time in the literature, significant results about the use of Hyp associated PDT as a potential treatment for the cases of dermatophytosis by *M. canis*.

Our results highlight that Hyp-PDI was significantly effective in reducing the viability of *M. canis* planktonic cells. Other authors (10) showed the activity of the Hyp (without PDI) with fungicide concentrations 2-fold higher (11.7  $\mu\text{g/mL}$ ) compared to the present study (6.5  $\mu\text{mol/L}$ , respective to 3.2 mg/mL). Our research group has been studying Hyp-PDT in different fungal infection models (11), and also showed that there is no *in vitro* cytotoxicity at fungicidal concentrations found in this study (unpublished data). So, we were encouraged to conduct *in vivo* studies in murine model of dermatophytosis occasioned by *M. canis*.

The first step was the *in vivo* toxicity analysis of the Hyp-PDT treatment. Our results (Figure 1) show that treatment with Hyp-PDT did not express significant difference compared with placebo treatment, even after six PDT sessions. These results combined with the efficient *in vitro* antifungal activity validate the next steps for *in vivo* antifungal evaluation.

Hyp-PDT efficiency was conducted in two stages, clinical evaluation and mycological cure. Satisfactorily, Hyp-PDT-treated animals revealed expressive improvements and early in clinical signs resulting from infection after three treatment sessions, compared to conventional therapy and positive control. In fact, recent studies, reinforce PDT efficiency in tissue regeneration (12). It is known that although *M. canis* infection does not source mortality, visible problems in infectious sites such as erythematous papules and pustules on the skin, as well as severe scalp itching, hair breaks and reddish papules around of these affect the patient's psychological and self-esteem, promoting a high degree of morbidity and social isolation (13). The results of the rapid tissue change caused by Hyp-PDT in infected animals, suggests the opportunity for higher self-esteem of the patient, enabling social inclusion and especially adherence to treatment. In addition, to the clinical improvement occasioned by Hyp-PDT, it was possible to observe effective antifungal activity *in vivo*. After six treatment sessions, Hyp-PDT was able to significantly reduce the fungal burden of *M. canis* in skin of infected animals. Superficial nature of these infections qualify the antifungal photodynamic action, this is conducted by a light source emitting a specific wavelength, thus exposure stimulates the production of reactive oxygen species (ROS) by the photosensitizer, resulting in fungal death by apoptosis, necrosis or autophagy (6).

Hyp-PDT antifungal activity was reinforced by findings related to the hair root invasion assay and histology. Figure 5Bb'' show lower fungal growth on the hair after Hyp-PDT treatment. These results may be associated with clinical findings, where it was possible to observe a limited lesion in the treated animals, conferring less invasive potential of *M. canis* after treatment. Furthermore, histopathological examination showed that infection by *M. canis* may cause histopathologic abnormalities of the skin of animals, such as epidermal thickening and inflammation (Figure 6B). On the other hand, Hyp-PDT treatment was able to reverse epithelial damage showed lower epidermis proliferation and inflammation (Figure 6C). This tissue



characteristic has been evaluated by different studies involving experimental dermatophytosis, and is considered one of the cure criteria (14).

In general, dermatophytic treatment is long, and this fact can be attributed to the slow growth these pathogens (15). In fact, despite clinical improvement and reduction in fungal burden, it was not possible to observe complete removal of fungal viability after six sessions of Hyp-PDT treatment. Other studies using PDT also show significant reduction in fungal burden in dermatophytes in an *in vivo* model, but with maintenance of fungal viability until the last evaluated time (16).

## 5. CONCLUSION

In this research, antifungal potential of hypericin-mediated photodynamic therapy against *M. canis* was evidenced for the first time. This is a promising therapy for the treatment of *Tinea capitis* and *Tinea corporis* developed by this fungus, as it shows expressive improvements in clinical signs and fungal reduction, without developing topical toxicity. Thus, further studies should be proposed, analyzing the behavior of Hyp-PDT on *M. canis* experimental infections in longer treatment periods.

## FINANCIAL SUPPORT

CAPES and CNPq

## REFERENCES

1. Lipozenčić J, Skerlev M, Pašić A. Overview: changing face of cutaneous infections and infestations. *Clin Dermatol* 2002; 20:104-8.
2. Teklebirhan G, Bitew A. Prevalence of dermatophytic infection and the spectrum of dermatophytes in patients attending a tertiary hospital in Addis Ababa, Ethiopia. *Int J Microbiol* [Internet]. 2015; 2015:5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/653419>
3. Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep*. 2015; 9(3):164–79.
4. Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*. 2017;182(1–2):77–86.
5. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2019; 103255. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S108718451930177X>
6. Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Front Microbiol*. 2015; 6(MAR):1–11.
7. Gattuso H, Marazzi M, Dehez F, Monari A. Deciphering the photosensitization mechanisms of hypericin towards biological membranes. *PhysChemChemPhys*. 2017;19(34):23187–93.
8. Brasil. Guia para a condução de toxicologia e segurança. 2013; 1–48. Available from: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
9. Ghannoum MA, Hossain MA, Long L, Mohamed S, Reyes G, Mukherjee PK. Evaluation of antifungal efficacy in an optimized animal model of *Trichophyton mentagrophytes* - dermatophytosis. *J Chemother*. 2014; 16(2):139–44.
10. Sytar O, Švedienė J, Ložienė K, Paškevičius A, Kosyan A, Taran N. Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. *Pharm Biol*. 2016;54(12):3121–5.
11. Sakita KM, Conrado PCV, Faria DR, Arita GS, Capoci IRG, Rodrigues-Vendramini FAV, et al. Copolymeric micelles as efficient inert nanocarrier for hypericin in the photodynamic inactivation of *Candida* species. *Future Microbiol*. 2019;14(6):519–31.
12. Sigusch BW, Dietsch S, Berg A, Voelpel A, Guellmar A, Rabe U, et al. Antimicrobial photodynamic active biomaterials for periodontal regeneration. *Dent Mater* [Internet]. 2018; 34(10):1542–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.06.026>
13. Grimalt R. A practical guide to scalp disorders. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2007;12(2):10–4.
14. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
15. Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008;166(5–6):267–75.
16. Tawfik AA, Noaman I, El-Elsayyad H, El-Mashad N, Soliman M. A study of the treatment of cutaneous fungal infection in animal model using photoactivated composite of methylene blue and gold nanoparticle. *hotodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2016; 15:59–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpdpdt.2016.05.010>

**Keywords:** *Microsporum canis*; hypericin; photodynamic therapy.

# PRÓPOLIS: ANTIFÚNGICO NATURAL QUE ATUA SOBRE O CICLO CELULAR DE FUNGOS DE INTERESSE MÉDICO SEM AFETAR CÉLULAS ANIMAIS

**Pamela Stéphanie Tymniak Rezende<sup>1</sup>; Beatriz Paes Silva<sup>2</sup>; Melyssa Negri<sup>3</sup>; Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha<sup>4</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Laboratório de Micologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: pamelatymniak@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são de grande importância na vida humana, pois várias espécies podem causar doenças, desde infecções superficiais até invasivas e sistêmicas (1). Enquanto as superficiais afetam cerca de 25% da população mundial, as infecções fúngicas invasivas são mais alarmantes tanto pelo aumento em frequência quanto por estarem associadas à alta morbidade e mortalidade (2,3).

No gênero *Aspergillus*, várias espécies são clinicamente significativas, capazes de causar infecções em seres humanos. As formas invasivas afetam principalmente os pulmões, seios paranasais, sistema nervoso central, ouvidos e pele (4,5). *Aspergillus fumigatus* é o principal agente da aspergilose pulmonar invasiva, considerada uma infecção com altos índices de mortalidade em pacientes imunocomprometidos, enquanto *Aspergillus flavus* está mais associado à produção de toxinas alimentares, mas também é causa de infecções que envolvem seios paranasais, pele, mucosas, olhos podendo ocorrer também disseminação sistêmica (6,7). Por outro lado, *Aspergillus nidulans* tem baixo potencial de virulência e é pouco relacionado a infecções humanas, mas tem sido usado como bom modelo para estudos genéticos e controle para o estudo da embriogênese (8,9).

As infecções pelo gênero *Aspergillus* representam grandes desafios devido à complexidade da doença, dificuldade de tratamento e altos índices de mortalidade. A resistência aos azólicos é um problema emergente (10,11).

Assim, a busca por alternativas terapêuticas, incluindo produtos naturais com propriedades antifúngicas, tem sido amplamente valorizada, destacando-se como bons candidatos os compostos fenólicos, óleos essenciais e extratos de produtos naturais (12,13). A própolis é uma mistura complexa produzida por abelhas, com o objetivo de proteger e vedar a colmeia (14). É produzida a partir de substâncias vegetais e botânicas coletadas nas proximidades da colmeia. A própolis vem se tornando um composto natural promissor por apresentar vantagens como baixo custo, importante ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade (15). A própolis mostrou-se eficiente mesmo em fungos organizados na forma de biofilmes (16-18). Essas propriedades juntas permitem considerar a própolis como candidata promissora ao uso terapêutico, como antifúngico tópico. Contudo, apesar de resultados promissores obtidos sobre leveduras, ainda não são conhecidos seus efeitos sobre fungos filamentosos. Bem como não está totalmente elucidado o mecanismo de ação sobre a célula fúngica.

Desta forma, a proposta deste estudo foi determinar a atividade antifúngica do extrato de própolis (EP) sobre isolados de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e avaliar o efeito sobre a embriogênese de espécies de interesse médico deste gênero usando como referência *A. nidulans*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Isolados

O estudo foi realizado com um isolado clínico de *A. fumigatus* e outro de *A. flavus*, além da linhagem biA1methG1 (Bimeth) de *A. nidulans* fornecida pelo Laboratório de Genética Molecular e do Desenvolvimento da Universidade Estadual de Maringá. Os isolados clínicos estavam mantidos na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

### 2.2. Extrato de Própolis (EP)



O EP foi obtido de colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., de apiário localizado em Maringá, região Noroeste do Paraná. O EP foi preparado por turbólise, na concentração de 30% (p/p) em etanol 96 °GL.

### 2.3. Teste de susceptibilidade para ao EP

O teste de susceptibilidade *in vitro* das células planctônicas foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, adaptado de Galletti et al. (19) e Clinical and Laboratory Standards Institute (20) M38-A2, utilizando RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute – Gibco) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS (3-N morfolinopropanosulfônico 0,165M, pH 7,2) (Sigma), acrescido de 2% de glicose. Cultivos prévios de 120 horas, em Sabouraud Dextrose Agar (SDA), de cada fungo foram usados para preparo de suspensões de conídios, em salina fisiológica as quais foram ajustadas, por contagem em câmara de Neubauer para  $1,0 - 1,2 \times 10^6$  conídios por mililitro (UFC/mL). A partir desta suspensão, foram realizadas diluições até se obter o inóculo final de  $0,4 - 5 \times 10^4$  UFC/mL. Uma diluição seriada do EP, na razão 2, com 10 concentrações variando de 113 a 57.200 µg/mL em polifenóis totais (PFT). Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços e foram incubadas a 35 °C por 48 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração de EP, expressa sobre o teor de polifenóis totais (TPC) capaz de inibir o crescimento fúngico, evidenciado pelo corante resazurina. Foi também determinada a concentração fungicida mínima (CFM), a menor concentração de TPC capaz de matar os fungos. Para isso, amostras do conteúdo de todos os poços, após determinação da CIM foi transferido para SDA, na forma de “spot” e incubado a 35 °C por 48 a 72 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 2.4. Avaliação da viabilidade celular

Para verificar a viabilidade dos fungos expostos ao EP e inferir sua influência sobre o crescimento fúngico, após o teste de susceptibilidade, o conteúdo foi sonificado e uma alíquota de 10 µL de cada concentração foi semeada sobre placas de SDA e espalhado com alça. As placas foram incubadas a 35 °C e analisadas a cada 24h por quatro dias. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

### 2.5. Análise da germinação

Experimento realizado segundo Berti et al. (21), com algumas adaptações para EP. Os conídios foram coletados de colônias com cinco dias de crescimento a 35 °C. As suspensões de conídios foram filtradas em lâ de vidro, aferidas para conter  $200 \times 10^4$  UFC/mL e inoculadas em meio líquido Sabouraud Dextrose Broth (SDB), na presença de EP (concentração subinibitória para cada espécie) ou água, ou álcool (na concentração usada no preparo do extrato etanólico), esses últimos como controles.

Em seguida, foram transferidos para lâminas de microscopia e incubadas a 35 °C, em câmara úmida, por 9h. As análises, ao microscópio óptico, iniciaram após 3h de incubação e, foram feitas a cada 2h, até completar 9h, em cada leitura foram analisados 200 conídios e calculadas as porcentagens de cada uma das fases da germinação (conídio dormente, embebido, botão e germinado).

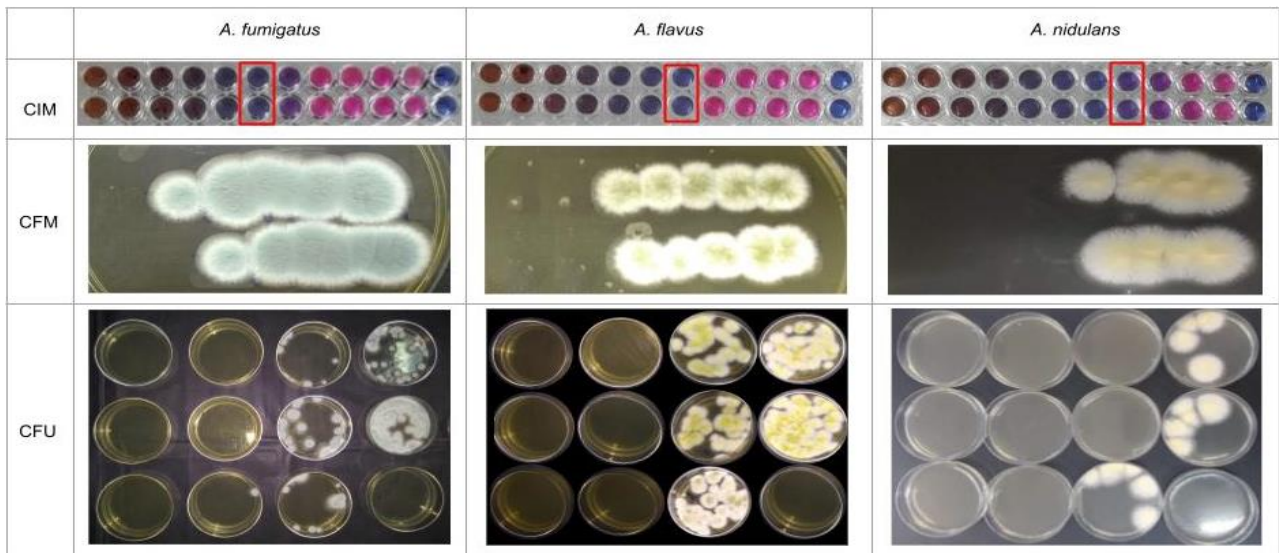
Para este estudo, foi considerada exclusivamente a leitura das 9 horas após contagem dos conídios em cada fase, foi feita uma estimativa de sobrevivência. Foram considerados mortos aqueles conídios que evoluíram apenas até as fases iniciais do desenvolvimento (dormentes, embebidos e botões) e vivos os conídios que atingiram a última fase do desenvolvimento natural, ou seja, a formação de tubo germinativo, caracterizando o conídio germinado. Separadamente, foi determinada a porcentagem de conídios germinados, porém malformados. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 3. RESULTADOS

Foram observadas variações entre as três espécies do gênero *Aspergillus* frente ao EP. De modo geral, *A. fumigatus* exigiu concentrações maiores de TPC (1788µg/mL e 3575µg/mL) respectivamente a CIM e CFM, enquanto *A. nidulans* foi o mais sensível (447µg/mL e 894µg/mL) para os mesmos referenciais. Já em relação a *A. flavus* esses valores foram intermediários (894µg/mL e 1788µg/mL). Em relação à viabilidade celular de *A. fumigatus*, a concentração de EP correspondente à CIM (1788µg/mL de TPC) foi capaz de reduzir  $2\log^{10}$  nas células viáveis do fungo representando um crescimento 100x menor em relação ao controle não tratado. Para *A. flavus* 1788µg/mL de TPC provocaram redução ainda maior  $> 3\log^{10}$ , enquanto para *A. nidulans* a concentração capaz de inviabilizar 100% do crescimento foi 447 µg/mL. Esses resultados estão ilustrados na Figura 1.

Estudos sobre a influência do EP sobre a germinação de fungos foram realizados com os mesmos isolados fúngicos, após 3h, 5h, 7h e 9h. Foram reportados exclusivamente os resultados observados às 9h, pois nesse tempo havia todas as fases do desenvolvimento para serem comparadas. Constatou-se que o EP é capaz de inibir a germinação nas três espécies do gênero *Aspergillus*. As contagens dos conídios incubados com o álcool foram semelhantes às encontradas no controle positivo, sem própolis, em todos os tempos.

Na Figura 2A é possível observar que *A. fumigatus* apresentou 30,20% de conídios que morreram sem sequer sair da fase de dormência. Alguns conídios chegaram a fase de embebidos (6,40%) e outros a botão (8,30%) sem concluir a germinação. Menos da metade dos conídios germinados foram normais (46%), mas curiosamente a quantidade de malformados (9,10%) foi muito baixa em relação aos controles (44,30% e 39,10%).

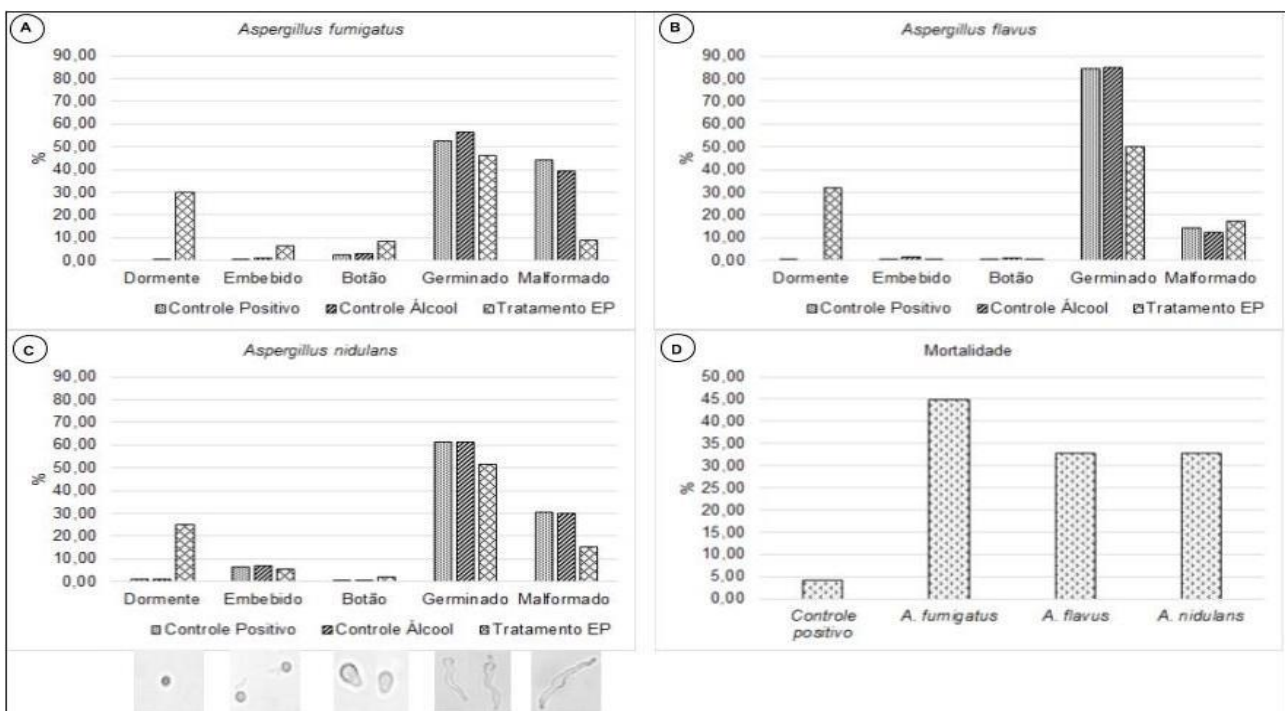


**Figura 1. Ilustração dos resultados quanto à atividade antifúngica de EP frente a três espécies do gênero *Aspergillus*.** Concentração inibitória mínima (CIM); Concentração fungicida mínima (CFM); Unidade formadora de colônia (CFU).

Quanto a *A. flavus*, conforme a Figura 2B, 31,80% dos conídios morreram ainda na fase de dormência. Alguns conídios chegaram a fase de embebido (0,37%) e outros a de botão (0,37%), mas morreram sem concluir a germinação. Houve 50,03% de germinados, bem menos do que nos controles. A quantidade de conídios malformados (17,22%) foi muito próxima aos controles (14,50% e 12,50%).

Já em *A. nidulans* encontramos 25,13% de conídios mortos sem sair da dormência (Figura 2C). Alguns conídios se tornaram embebidos (5,62%) e outros chegaram a botão (2,16%), mas morreram sem concluir a germinação. Houve 51,75% de germinados, menos do que nos controles, mas curiosamente a quantidade de malformados (15,34%) foi muito baixa em relação aos controles (30,50% e 30%).

A Figura 2D, mostra os altos níveis de mortalidade dos conídios expostos à própolis para as três espécies, atingindo mais de 8x a média de mortalidade dos conídios dos controles positivos (água ou álcool).



#### 4. DISCUSSÃO

Na última década foram descritas diversas atividades biológicas da própolis, como antioxidante, anti-inflamatório, antibiótico e antifúngico (22). Os resultados deste estudo confirmam a atividade antifúngica do EP, já evidenciada para leveduras (16,17) agora também sobre fungos filamentosos.

Tanto *A. fumigatus* quanto *A. flavus*, principais espécies associadas a infecções humanas, exigiram CIM mais elevadas do que as leveduras. Apesar disso, os resultados são promissores, pois 2xCIM, correspondeu à CFM e provocou a redução de  $3\log^{10}$ , portanto, foi fungicida para as espécies avaliadas. Os valores dessas CIM e CFM variaram entre os três isolados, por essa razão supomos que própolis tem uma ação fungicida para espécies do gênero *Aspergillus* em uma resposta dose-espécie-dependente.

Além disso, ficou claro que EP atuou sobre a embriogênese destes fungos. *A. nidulans* é um organismo muito utilizado em estudos de genética do desenvolvimento, por evidenciar diversos processos morfogenéticos que exigem refinado sistema de regulação da expressão gênica (23,24). Estas características tornam essa espécie um modelo amplamente reconhecido, em estudos sobre efeitos genéticos de compostos sobre células eucarióticas (25). Seu desenvolvimento ocorre em fases distintas começando com a quebra da dormência do conídio, levando ao aumento de volume causado pela embebição. A embebição caracteriza-se pelo crescimento isotrópico e a ativação do metabolismo do conídio. Em seguida a morfogênese é iniciada, marcando o início do crescimento polarizado, indicando o local no conídio onde surgirá a primeira hifa. Assim o conídio apresenta uma região mais dilatada e, é chamado de botão. Este crescimento polarizado, resulta na formação de um tubo germinativo, caracterizando o conídio germinado (26,27).

Nossos resultados demonstram que o EP foi um inibidor efetivo na germinação dos conídios não só para *A. nidulans* como para as outras espécies avaliadas. Os conídios incubados com o álcool forneceram os mesmos resultados que o controle positivo, em todos os tempos, certificando que nas concentrações utilizadas no EP, o álcool não causou interferência no desenvolvimento do fungo.

Essa inibição, poderia representar um risco para a integridade das células animais, o que contraindicaria o emprego do EP como tratamento antifúngico em humanos. No entanto, algumas considerações foram decisivas à conclusão de que esse efeito inibitório não afeta células animais. Inicialmente, a maior mortalidade ocorreu na fase de dormência, independentemente da espécie. O fato de EP ter dificultado o desenvolvimento da germinação dos conídios, nas fases iniciais do processo nos faz pensar que a própolis estaria atuando sobre a sinalização (possivelmente a síntese de proteínas que atuariam especificamente sobre a quebra de dormência como a giberelina) e não sobre o metabolismo ou ciclo celular do fungo propriamente dito. Esse mecanismo já foi descrito para EP sobre plantas (28-30). Importante frisar ainda que aproximadamente 50% dos conídios atingiram as fases finais de desenvolvimento, porcentagem semelhante às encontradas nos controles. Isso indica que os conídios que não morreram nas fases iniciais, conseguiram completar o ciclo naturalmente, diferenciando-se em germinados mesmo na presença da própolis. Esses achados somados à capacidade reparadora da própolis (31) permitem concluir que própolis não exerceria efeito prejudicial às células animais. Essa hipótese é corroborada por vários estudos, em culturas de células animais, que EP não é citotóxico (16) e não inibe funções vitais, como relatado por Roberto et al. (31) que mostraram ausência de genotoxicidade e mutagenicidade no tratamento com EP.

Neste estudo, as espécies *A. fumigatus* e *A. flavus* apresentaram baixa porcentagem de conídios malformados, comparáveis ao encontrado em *A. nidulans*, usado como referência, comprovando que o EP não é mutagênico. Importante destacar que após 9h de incubação, os conídios que não evoluíram para as fases mais avançadas da germinação, ou seja, permaneceram nas fases de embebido ou botão representam senescência (parada permanente de ciclo celular). Esse comportamento sugere que EP teria provocado uma seleção dos conídios menos aptos, impedindo o seu desenvolvimento para as fases finais do processo de germinação. Dessa forma, fica explicado a menor porcentagem de conídios malformados.

Assim, as altas taxas de mortalidade (Figura 2D) indicam que EP exerce uma ação importante sobre fungos, atuando provavelmente sobre a sinalização para síntese proteica. O conjunto de informações geradas, indicam uma semelhança do efeito da própolis encontrado sobre a germinação de plantas.

#### 5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que o EP inibe drasticamente a germinação dos conídios, além disso, supostamente afeta os mecanismos sinalizadores da cascata do ciclo celular, sem, contudo, comprometer as fases finais da germinação, caracterizando assim, um mecanismo fungo específico. Essas propriedades, aliado à potente atividade antifúngica, conferem à própolis uma potencial opção terapêutica no tratamento de infecções fúngicas em mamíferos.

#### FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

#### AGRADECIMENTOS



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

## REFERÊNCIAS

1. Goyal S, Castrillón-Betancur JC, Klaile E, Slevogt H. The interaction of human pathogenic fungi with C-type lectin receptors. *Front Immunol*. 2018 Jun;9:1261.
2. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008 Sep;51(4):2–15
3. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012 Dec;4(165):165rv13.
4. Geffer WB. The spectrum of pulmonary aspergillosis. *J Thoraci Imaging*. 1992;7(4):56–74. doi: 10.1097/00005382-199209000-00009.
5. Cray JA, Bell ANW, Bhaganna P, Mswaka AY, Timson DJ, Hallsworth JE. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb Biotechnol*. 2013 Sep;6(5):453–92.
6. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. 2007 Jun;153(6):1677–92.
7. Prasad A, Agarwal K, Deepak D, Atwal SS. Pulmonary aspergillosis: What CT can offer before it is too late! *J Clin Diagn Res*. 2016 Apr;10(4):1–5.
8. Todd RB, Davis MA, Hynes MJ. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: Meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc*. 2007;2(4):811–21.
9. Kniemeyer O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*. 2011 Aug;11(15):3232–43.
10. Seyedmousavi S, Mouton JW, Melchers WJG, Brüggemann RJM, Verweij PE. The role of azoles in the management of azole-resistant aspergillosis: From the bench to the bedside. *Drug Resist Updat*. 2014 Jul;17(3):37–50.
11. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, et al. Ecology of aspergillosis: Insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol*. 2017 Mar;10(2):296–322.
12. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, et al. Corrigendum to “The biology and chemistry of antifungal agents: A review” [Bioorg Med Chem. 20 (2012) 5678–5698], *Bioorg Med Chem*. 2013;21(3):834. doi: 10.1016/j.bmc.2012.11.022.
13. Paiva JA, Pereira JM. New antifungal antibiotics. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Apr;26(2):168–74.
14. Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:388–95. doi: 10.1590/s0102-695x2007000300015.
15. Oliveira FP de, Lima EO, Siqueira Júnior JP, Souza EL, Santos BHC, Barreto HM. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (*Verbenaceae*) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(4):510-6. doi: 10.1590/s0102-695x2006000400013.
16. Capoci IRG, Bonfim-Mendonça PS, Arita GS, Pereira RR, Consolaro MEL, Bruschi ML, et al. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:1–9. doi: 10.1155/2015/287693.
17. Tobaldini-Valerio FK, Bonfim-Mendonça PS, Rosseto HC, Bruschi ML, Henriques M, Negri M, et al. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiol*. 2016 Aug;11:1035–46.
18. Veiga FF, Gadelha MC, da Silva MRT, Costa MI, Kischkel B, de Castro-Hoshino LV, et al. Propolis extract for onychomycosis topical treatment: From bench to clinic. *Front Microbiol*. 2018 Apr;9:779.
19. Galletti J, Tobaldini-Valerio FK, Silva S, Kioshima ÉS, Trierveiler-Pereira L, Bruschi M, et al. Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future Microbiol*. 2017 Nov;12:1311–21.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard, 2nd ed. CLSI document M27-A2 [Internet]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008 [citado 8 de agosto de 2019]; Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10026406912>.
21. Berti AP, Máximo Júnior JR, Barros FS, Rocha CLMSC. Efeitos do suco comercial de *Aloe vera* L. na germinação e antimutagenese em *Aspergillus nidulans* e pelo ensaio cometa em ratos Wistar. *Rev Bras Biocienc*. [Internet]. 2016 Jun 14 [citado 2019 Ago 7];14(2). Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3634>.
22. López-Romero D, Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, Madrigal-Bujaidar E, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M, et al. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: Plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients*. 2018 Dec;10(12). doi: 10.3390/nu10121954.

23. Clutterbuck AJ. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 1969 Oct;63(2):317–27.
24. Timberlake WE, Clutterbuck AJ. Genetic regulation of conidiation. *Prog Ind Microbiol*. 1994;29:383–427.
25. Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma L-J, Wortman JR, Batzoglou S, et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 2005;438:1105–15. doi: 10.1038/nature04341.
26. Guidoti DGG. Isolamento químico e bioatividades de frações de pericarpo e sementes de pinha (*Annona squamosa* L.). [Dissertação]. Universidade Estadual de Maringá; 2016.
27. Reis MFD. Determinação da atividade antioxidante de extratos de *Pleurotus ostreatoroseus* Singer e seus efeitos sobre o desenvolvimento de *Aspergillus nidulans* (=Emericella). [Tese]. Universidade Estadual de Maringá; 2014.
28. Pereira DS, Holanda-Neto JP, Oliveira MS, Pereira NS, Maracajá PB, Souza Filho APS. Phytotoxic potential of the geopropolis extracts of the *Jandaira stingless Bee* (*Melipona subnitida*) in weeds. *Rev Caatinga*. 2017;30(4):876–84. doi: 10.1590/1983-21252017v30n407rc.
29. Fernandes-Silva CC, Lima CA, Negri G, Salatino MLF, Salatino A, Mayworm MAS. Composition of the volatile fraction of a sample of Brazilian green propolis and its phytotoxic activity. *J Sci Food Agric*. 2015 Dec; 95(15):3091–5.
30. Pereira H, Ferreira AM, Aguiar CA, Oliveira R, Cunha A. Portuguese propolis: Genotoxic, phytotoxic and protective effects against oxidative stress. *Planta Med*. 2014;80. doi: 10.1055/s-0034-1394800.
31. Roberto MM, Matsumoto ST, Jamal CM, Malaspina O, Marin-Morales MA. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. *Toxicol In Vitro*. 2016 Jun;33:9–15.

**Palavras-chave:** atividade antifúngica da própolis; fungos patogênicos; genética do desenvolvimento.



## HYPERICIN-PHOTODYNAMIC THERAPY AS ALTERNATIVE TREATMENT FOR ONYCHOMYCOSIS

**Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado<sup>1</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>2</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>2</sup>; Camila Barros Galinari<sup>1</sup>; Renato Sonshine Gonçalves<sup>3</sup>; Gabriel Batista Cesar<sup>3</sup>; Wilker Caetano<sup>3</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>4</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>4</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, PR

<sup>2</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, University of Maringa, Maringa, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Chemistry, State University of Maringa, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, PR

e-mail: pollyconrado@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

*Fusarium* genus contemplates filamentous fungi widely distributed in tropical regions. Many species have been described as phytopathogens, generating high costs for the agriculture sectors. However, *Fusarium* is able to cause a broad spectrum of infections in humans. In the immunocompetent host can generally cause a local infection such as onychomycosis (1). Although onychomycosis is mainly caused by dermatophyte fungi (DM), approximately 29% of cases have as *Fusarium* etiologic agent (2). Due to the opportunistic characteristic of this genus, it is believed that onychomycosis to be a risk factor for other infections, besides that studies show that this genus has high resistance to conventional antifungals (3). Thus, the search for alternative treatments are necessary, providing therapeutic resources more efficient.

Photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive therapy that use the combination of three components, photosensitizer (PS), oxygen and light source, generating reactive oxygen species (ROS) responsible for killing target cells, tissues or microorganisms by necrosis or apoptosis (4). Nowadays, several studies have highlighted the use of Hypericin (Hyp) with successful photodynamic effect, such as anti-tumor activity (5), inhibits virus replication (6), fungicidal effect against *Candida* spp. (7) and *Trichophyton* spp. (8). However there are no studies of Hyp+PDT on *Fusarium* species in literature. Therefore, the aim was to evaluate the efficacy of Hyp-PDT against *Fusarium* spp by *in vitro* and *ex vivo* assays.

### 2. MATERIAL AND METHODS

#### 2.1. Fungal strains and *in vitro* antifungal susceptibility

For this study, *Fusarium oxysporum* (ATCC 48112), *Fusarium solani* (ATCC 36031) and seven clinical isolates were provided by Medical Mycology - LEPAC/UEM (ethics committee nº 2.748.843). The descriptive data study, retrospective, cross-sectional, observational were performed in sample of clinical isolates received between 2015 and 2019 with suspected onychomycosis. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determination for conventional drugs was performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M38-A2, 2008) (10). *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) were used as control. Two conventional drugs were tested: Itraconazole (ITZ, 0.313-16 µg/mL) and Terbinafine (TER, 0.015-8 µg/mL). The MIC values was determined as the concentration capable to inhibit 80% of fungal growth as compared to control.

#### 2.2. Photosensitizer solutions and light sources

Hyp was synthesized by Nucleus of Research in Photodynamic Systems (NUPESF-UEM), and incorporated into 0.025% of Pluronic P123 micelle (Sigma-Aldrich), according to Sakita, et al. (2019) (7). Light-emitting diode (LED, 450 at 450 to 750 nm) with an irradiance of 3.0 mW/cm<sup>2</sup>, and fluence between 10.8 J/cm<sup>2</sup> and 27J/cm<sup>2</sup> was used.

#### 2.3. Hyp-PDT on planktonic cells

The Hyp-PDT effect on *Fusarium* conidia was evaluated at time 0h (shortly after irradiation) and 24h after irradiation. Briefly, *Fusarium* (1x10<sup>4</sup> conidia) was incubated with Hyp concentrations (0.04-12.5 µmol/L) for 2h in the dark at 25°C, at 90 rpm, and irradiated 10.8 J/cm<sup>2</sup>. The four controls were used: inoculum in sterile saline (C), inoculum in micelle P123 (CM), inoculum with Hyp without irradiation (dark control-DC), inoculum in sterile saline irradiated (light control-LC). After irradiation, the samples were plated on Potato Dextrose Agar

(PDA), incubated at 25°C/48h. Colony forming units (CFU) reduction  $\geq 3 \log_{10}/\text{mL}$  was considered to Minimal Fungicidal Concentration (MFC) in relation to the C.

#### 2.4. Detection of reactive oxygen species

*Fusarium* strains ( $2 \times 10^4$  conidia) were incubated with Hyp (6.25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2h/dark/25°C and irradiated (10.8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). After treatment, the conidia were resuspended in 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , 0.1M), according to Chang, et al. (2013) (10). For positive control, Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1 mM) for 20 min at 37°C was used. The 10.000 events were evaluated at 488-535 nm in Flow Cytometer BD FACSCalibur™.

#### 2.5. Hyp-PDT effect on *Fusarium* biofilm

The assay was performed according to Pierce, et al. (2008) (11), with modifications. For adhesion phase, *Fusarium* conidia ( $2 \times 10^5$  cells) were incubated without agitation for 2h. Biofilm formation (2h-post-adhesion phase) and mature biofilm (24h-post-adhesion phase), were treated with Hyp in concentrations 4xMFC (25  $\mu\text{mol/L}$ ), 2xMFC (12.5  $\mu\text{mol/L}$ ) and MFC (6.25  $\mu\text{mol/L}$ ), incubated for 2h/dark/25°C and irradiated (27  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). DC, LC and C controls were included. Hyp-PDT effect on biofilms were evaluated 24h after irradiation by Crystal Violet.

#### 2.6. Cytotoxicity on humans cell line

For the cytotoxicity test on line keratinocytes cells (HaCat) ( $2 \times 10^4$  cell) were used. Briefly, cells were incubated for 2h with Hyp (0.09-50  $\mu\text{mol/L}$ ) in the dark at 37°C in 0.5%  $\text{CO}_2$ . The cytotoxic action of Hyp-PDT was evaluated at 24h after irradiation (27  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), using the colorimetric MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay.

#### 2.7. Hyp-PDT on *ex vivo* nail in biofilm formation and mature biofilm

This assay was performed according to Rashid, et al. (1995) (12), with modifications. Nail fragments (0.5 cm) from healthy male volunteers were sectioned and sterilized. These nail fragments were infected with *Fusarium* conidia ( $5 \times 10^3$  cells) in ventral surface. The nails were incubated for biofilm formation (2h) and for mature biofilm (24h), at 25°C. Posteriorly, the infected nails were divided into eight groups: control, light control, three different Hyp concentration (4xMFC, 2xMFC, MFC) and their respective dark controls (4xMFC-DC, 2xMFC-DC, MFC-DC). Each group has twelve nails. On ventral nail surface, Hyp solution were added and incubated at 25°C/2h in dark. The controls (LC and C) were incubated with sterile saline. The nails with biofilm formation were exposed to 10.8  $\text{J}/\text{cm}^2$  and the nails with mature biofilm were exposed to 21.6  $\text{J}/\text{cm}^2$ . The Hyp-PDT effect was evaluated by CFU determination at 24h after irradiation. Briefly, the biofilm was detached by agitation in vortex (60s) with glass beads. The suspensions was transferred to PDA plates and incubated at 25°C/48h. The Hyp-PDT effect on the structure biofilm also was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) (13). Briefly, samples were fixed in cacodylate buffer (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde and 0.1 M sodium cacodylate) and dehydrated in an ethanol series. Samples were critical-point dried with  $\text{CO}_2$ , coated with gold (Shimadzu, IC-50 ion coater) and observed using a Quanta 250 Scanning Electron Microscope™ (FEI Company, USA), used images with x1000 and 3000 magnification.

#### 2.8. Statistical analysis

The analyses were carried out using GraphPad Prism software (version 7.0, La Jolla, CA). The results were compared using the one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), by applying Bonferroni multiple-comparisons test, being considered statistically significant, p-values less than 0.05. For Statistical analyses, data were obtained from three independent experiments in triplicate.

### 3. RESULTS

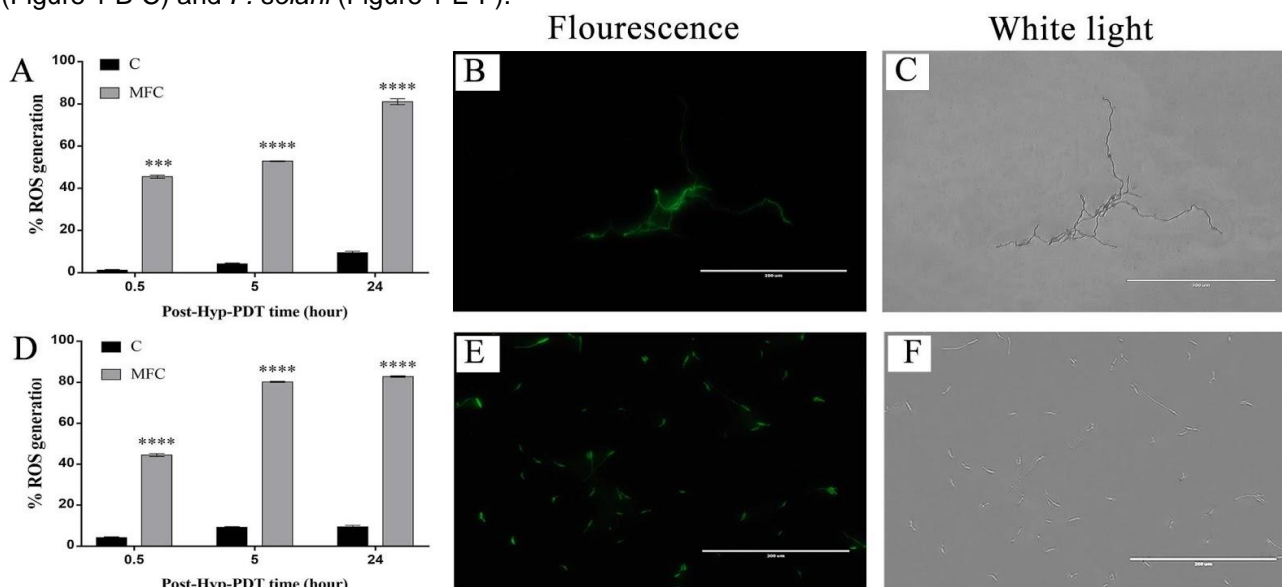
In the northwestern region of Paraná State, 566 cases of onychomycosis were confirmed in the last 5 years (2014-2019). Our results showed that 12.9% cases were caused by non-dermatophytes species, in which *Fusarium* spp was the most prevalent (12%). Seven clinical isolates were selected for this study. The antifungal susceptibility profile of *Fusarium* spp. isolates are shown in Table 1. All *Fusarium* clinical isolates presented MIC values  $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$  for ITZ. The most clinical isolates (77.8%) were susceptible to TER with MIC values  $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Only, two isolates presented MIC values  $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Surprisingly, Hyp-PDT antifungal activity was very efficient with MFC values ranging from 0.39 to 6.25  $\mu\text{mol/L}$ . For 55.5% of isolates, Hyp-PDT showed fungicidal profile ( $\geq 3 \log_{10}$  CFU/mL). The best antifungal activity were observed after 24h irradiation, the MCF values decreased significantly, ranging from 0.09 to 6.25  $\mu\text{mol/L}$ . Controls (DC, LC, CM) showed no significant difference in relation to the Control (C) (data not shown).

**Table 1. The antifungal susceptibility *in vitro* on *Fusarium* spp.**

STRAIN	MIC µg/mL		MFC Hyp µmol/L	
	ITZ	TER	0 h Hyp-PDT	24 h post-Hyp-PDT
<i>F. oxysporum</i> ATCC 48112	≥16	0.25	6.25	3.12
<i>F. oxysporum</i> LMMC 30	≥16	0.5	-	1.56
<i>F. oxysporum</i> LMMC 40	≥16	0.5	3.12	0.09
<i>F. oxysporum</i> LMMC 44	≥16	2	-	0.19
<i>F. oxysporum</i> LMMC 45	≥16	≥8	-	6.25
<i>F. solani</i> ATCC 36031	≥16	0.5	0.39	0.39
<i>F. solani</i> LMMC 33	≥16	1	0.78	0.09
<i>F. solani</i> LMMC 47	≥16	4	-	3.12
<i>F. solani</i> LMMC 100	≥16	≥8	0.78	0.09

Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the minimal concentration required to inhibit 80% of the growth compared the drugs-free control well. The values MIC and MFC of Hyp-PDT were the same. Minimal fungicidal concentrations (MFC) was defined concentration's Hyp with reductions of  $\geq 3 \log_{10}$  CFU has \*\*\*\* $p < 0.0001$  in relation the control growth. Strains with reduction  $< 3 \log_{10}$  CFU were indicated as -. ATCC 36031 *F. solani* and ATCC 48112 *F. oxysporum*.

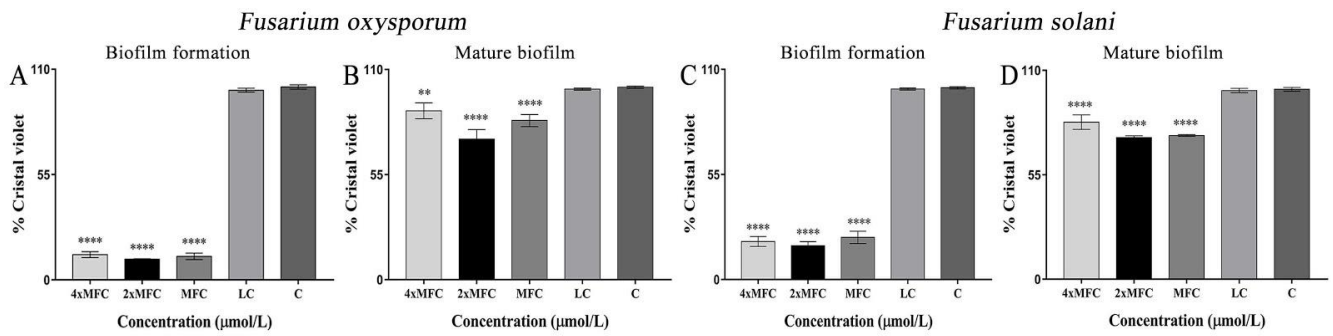
The reactive oxygen species generation was analyzed, considering the action mechanism of Hyp-PDT, (Figure 1). For both *Fusarium* species, the ROS generation are significantly higher than those found in the control group, soon after photoinactivation (0.5 h). For *F. oxysporum*, the effect appears to be gradual, with ROS values of 52.7% at 5h and 82% at 24h after irradiation (Figure 1 A). For *F. solani*, the Hyp-PDT effect is already evident after 5h with ROS values of 80.4%, reaching its maximum value after 24h (83 %) (Figure 1 D). The Hyp-PDT effect was confirmed by fluorescence microscopy at 24h after irradiation, for *F. oxysporum* (Figure 1 B-C) and *F. solani* (Figure 1 E-F).



**Figure 1. Hyp-PDT effect on ROS generation.** The *F. oxysporum* ATCC 48112 (A) and *F. solani* ATCC 36031 (D) were irradiated (10.8 J/cm<sup>2</sup>) with Hyp (MIC concentration). ROS quantification were measured at 0.5h, 5h and 24h-post-Hyp-PDT by flow cytometry. (B-C and E-F) ROS intracellular analyses after 24h irradiation, by Fluorescence Microscopy using H<sub>2</sub>DCFDA. *F. oxysporum* (B-C) and *F. solani* (E-F) \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  statistically significant increased ROS generation in relation to the control (C).

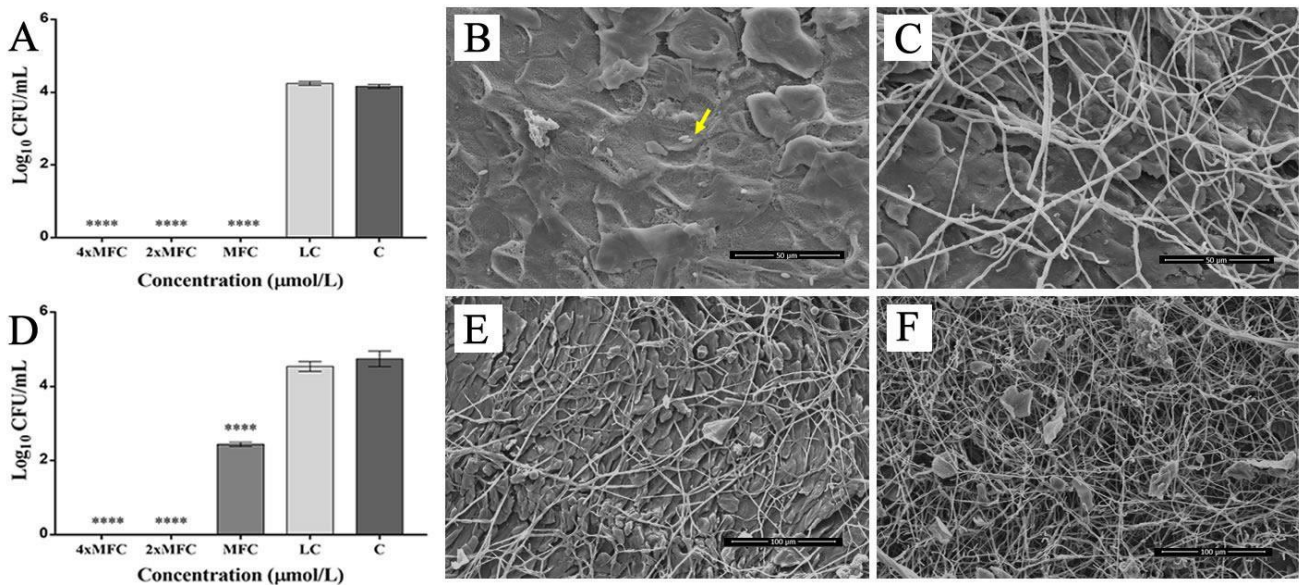
Hyp-PDT was able to disrupt the biofilm formation process (Figure 2). For both *Fusarium* species, Hyp-PDT was able to interfere mainly in biofilm formation (Figure 2 A and Figure 2 C). These profile was observed for all Hyp concentration tested with a biomass reduction until 83% for *F. solani* (Figure 2 A) and 89% for *F. oxysporum* (Figure 2 B). For mature biofilm, this effect was less pronounced (Figure 2 B and 2 D), in which the reduction was approximately 26% for both species.



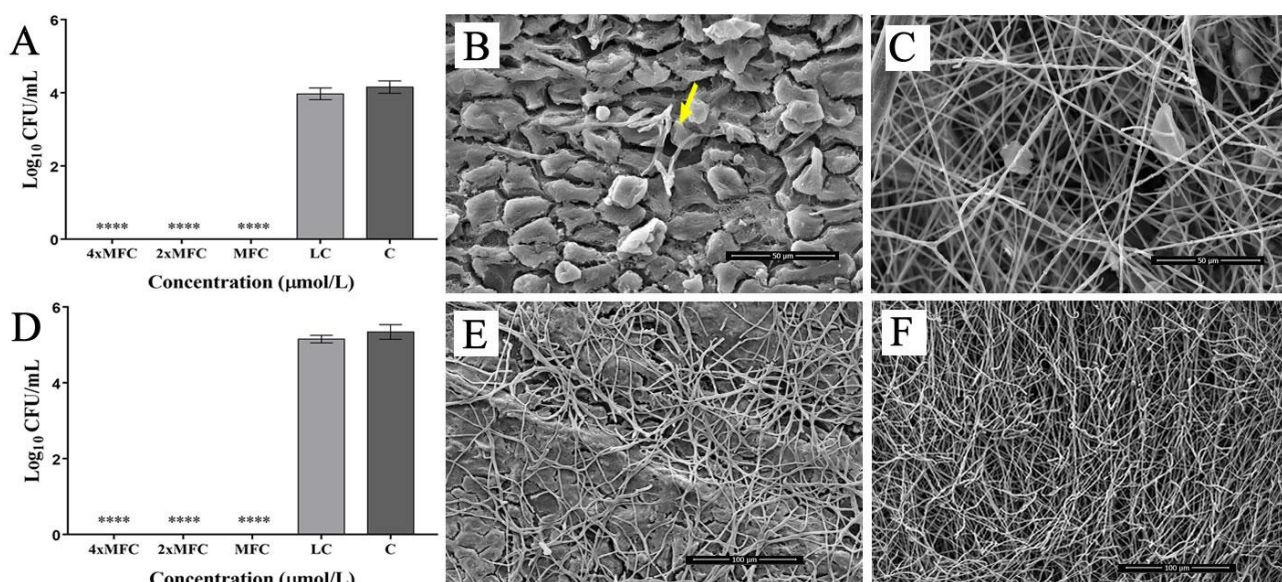


**Figure 2. Inhibition of biofilm formation after exposure to Hyp-PDT.** *F. oxysporum* (ATCC 48112) and *F. solani* (ATCC 36031) were submitted three Hyp concentration and irradiated with a dose of 27 J/cm<sup>2</sup>. After 24h, the biomass was determined by crystal violet. (A and C) Biofilm formation. (B and D) mature biofilm. DC there not statistical difference between the controls, data not show. All for controls were considered 100%. \*\* p<0.01, \*\*\* p< 0.001, \*\*\*\*p<0.0001 statistically significant reduction in relation to the control (C).

*In vitro* cytotoxic effect of Hyp-PDT was evaluated on keratinocytes cells (HaCat). The cell viability was 80% in the Hyp concentration used for all assays (6.25 µmol/mL). Whereas the *in vitro* results were promising, assays *ex vivo* were performed. The biofilm formation from *F. oxysporum* in nails presented susceptibility to all Hyp concentration tested (Figure 3 A). Unlikely, the mature biofilm was less sensible at MFC concentration, with a reduction of 2.4 log<sub>10</sub> CFU/mL as compared to the controls (Figure 3 B). The SEM analysis showed that Hyp-PDT prevented microconidia germination in biofilm formation (Figure 3 B) and interrupted the process in mature biofilm (Figure 3 E). For *F. solani*, the Hyp-PDT effect was considered fungicidal in all concentrations Hyp tested for both conditions: biofilm formation (Figure 4 A) and mature biofilm (Figure 4 D). SEM analysis demonstrated that Hyp-PDT effect on *F. solani* biofilms in nails was similar to those found for *F. oxysporum*. The photoinactivation prevented the microconidia germination (Figure 4 B) and the biofilm structuring (Figure 4 E). For both *Fusarium* species, in the nails untreated microconidia germinated (Figure 3 C and 4 C) and the nails surfaces were covered by interconnected hyphae after 24h (Figure 3 F and 4 F).



**Figure 3. Hyp-PDT effect in nail infected by *F. oxysporum* (ATCC 48112).** Three Hyp concentration were tested (4xMIC, 2xMIC and MIC) on biofilm formation and mature biofilm in nails infected by *F. oxysporum*. The cell viability of biofilm formation (A) and mature biofilm (B) was determined by CFU determination after 24h irradiation. SEM analysis was performed of nail fragments infected by *F. oxysporum* and submitted to Hyp-PDT (B and E). Monitoring of nails fragments infected untreated (C and F). Microconidia (yellow arrow). Magnification x3000 to biofilm formation and x1000 to mature biofilm. The controls LC, C and DC there not statistical difference between. \*\*\*\*p<0.0001 statistically significant reduction in relation to the control (C).



**Figure 4. Hyp-PDT effect in nail infected by *F. solani* (ATCC36031).** Three Hyp concentration were tested (4xMIC, 2xMIC and MIC) on biofilm formation and mature biofilm in nails infected by *F. solani*. The cell viability of biofilm formation (A) and mature biofilm (B) was determined by CFU determination after 24h irradiation. SEM analysis was performed of nail fragments infected by *F. solani* and submitted to Hyp-PDT (B and E). Monitoring of nails fragments infected untreated (C and F). Microconidia (yellow arrow). Magnification x3000 to biofilm formation and x1000 to mature biofilm. The controls LC, C and DC there not statistical difference between. \*\*\*\*p<0.0001 statistically significant reduction in relation to the control (C).

#### 4. DISCUSSION

Onychomycosis caused by *Fusarium* spp. is reported often to high resistance of fungi to the main antifungal agents (14), and photodynamic therapy has been shown as an effective alternative strategy for different fungal infections. This work shows for the first time efficient antifungal activity of Hyp-PDT against different clinical isolates of *Fusarium* spp. *in vitro* and in an experimental model of nail infection.

In agreement with the literature, the clinical isolates used in this study also showed high MIC values to the most used antifungals in clinical practice for onychomycosis. However, it should be noted that the antifungal activity of Hyp-PDT was able to kill *Fusarium* cells, regardless of antifungal susceptibility profile to the ITZ and TER (1, 3). The result of Hyp-PDT activity on planktonic cells showed fungicidal in 55.5% (9/5) strains (Table 1), according to literature (8, 10). Additionally, we observed a late increase of Hyp-PDT activity, with significant reduction in fungicidal concentration, after 24h of evaluation. Considering PDT employs non-toxic photosensitizer (PS) associated with visible light, an after photon absorption, the PS reaches an energized triplet state, and to recover their fundamental status there are the generation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, both microbicidal agents. We invest efforts to know the ROS generation after the Hyp-PDT. Using the MFC of Hyp-PDT it was possible to observe that the release of ROS was increasing over the evaluated time, regardless of *Fusarium* species. Other researchers also report the continuity of the Hyp-PDT effect in cell glioma (5). In addition, *in vitro* Hyp-PDT results associated with ROS data, explain the early susceptibility of *F. solani*, since this specie allows apparent greater penetration of Hyp and 30% more release of ROS than *F. oxysporum* in 5h. These data confirm that ROS generation is determinant for PDT antifungal activity.

The onychomycosis infection has been recognized as a biofilm structure, considered communities surrounded by extracellular polymeric substances that confer resistance to treatment and may act as a persistent source of infection, possibly accounting for the resistance to antifungal agents in onychomycosis (2). Thus, the proposed new therapy should also address antifungal activity on this structure. Hyp-PDT was able to prevent biofilm formation *in vitro* (Figure 2) and in nail fragments (Figure 3 and 4). The formation of biofilm is crucial for microbial survival, sheltering microbes from a variety of environmental assaults (2). In this way, antibiofilm activity is important in preventing the common chronicity of onychomycosis.

Although *F. solani* develops a more consistent mature biofilm compared to *F. oxysporum*, both species show a biofilm composed of a network of hyphae that grow in all directions and with the presence of extracellular matrix (Figure 4). These biofilm characteristics explain the difficulty of treating nails with antifungals. Hyp-PDT was able to penetrate the complex structure of a biofilm formed (*in vitro* and nail fragments) and disrupt the architecture of the biofilm of both *Fusarium* species. The Figures 3 and 4 shows that fungus growth was inhibited after Hyp-PDT, while controls contained the germination process. These data corroborate the literature, showing that Hyp-PDT is able to inhibit *in vitro* biofilm formation of *Candida* species (7). The literature considers that biofilm pathogens can tolerate 1000-fold higher levels of antimicrobial agents



(2). It is important to highlight that Hyp-PDT had biofilm activity in an experimental onychomycosis model, and these data reinforce our idea that Hyp-PDT may be efficient and promisor for the topical treatment of onychomycosis.

## 5. CONCLUSION

Our results expand the knowledge regarding the Hyp-PDT effect with focus in the treatment of infectious diseases. The assay *in vitro* of Hyp-PDT was efficient in inhibiting the growth of *Fusarium* spp., both planktonic cultures and biofilms. *Ex vivo* model represented an important tool for initial testing and validation of these approaches. The Hyp-PDT effects against an important etiologic agents of onychomycosis, proving that hypericin may be used as a photosensitizing agent for photodynamic therapy application. However, investigations including *in vivo* experimental and clinical studies to be necessary to determine safe this application in clinical practice.

## REFERENCES

1. Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Ranque S, Sybren de Hoog G, Verweij PE, Meis JF. Current antifungal treatment of fusariosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Mar;51(3):326-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.06.017. Epub 2017 Jul 10.
2. Gupta C, Jongman M, Das S, Sneha K, Bhattacharya SN, Seyedmousavi S, et al. Genotyping and *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Fusarium* isolates from onychomycosis in India. *Mycopathologia*. 2016 Aug;181(7-8):497-504. doi: 10.1007/s11046-016-0014-7. Epub 2016 May 2.
3. Ranawaka RR, Nagahawatte A, Gunasekara TA. *Fusarium* onychomycosis: prevalence, clinical presentations, response to itraconazole and terbinafine pulse therapy, and 1-year follow-up in nine cases. *Int J Dermatol*. 2015 Nov;54(11):1275-82. doi: 10.1111/ijd.12906. Epub 2015 Jul 29.
4. Bhatta AK, Keyal U, Wang XL. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Sep;15:228-35. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.010. Epub 2016 Jul 28.
5. Misuth M, Horvath D, Miskovsky P, Huntosova V. Synergism between PKC $\delta$  regulators hypericin and rottlerin enhances apoptosis in U87 MG glioma cells after light stimulation. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:267-74. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.03.018. Epub 2017 Mar 31.
6. Shih CM, Wu CH, Wu WJ, Hsiao YM, Ko JL. Hypericin inhibits hepatitis C virus replication via deacetylation and down-regulation of heme oxygenase-1. *Phytomedicine*. 2018 Jul 15;46:193-8. doi: 10.1016/j.phymed.2017.08.009. Epub 2017 Aug 16.
7. Sakita KM, Conrado PC, Faria DR, Arita GS, Capoci IR, Rodrigues-Vendramini FA, et al. Copolymeric micelles as efficient inert nanocarrier for hypericin in the photodynamic inactivation of *Candida* species. *Future Microbiol*. 2019 Apr;14:519-31. doi: 10.2217/fmb-2018-0304. Epub 2019 Apr 29.
8. Paz-Cristobal MP, Gilaberte Y, Alejandre C, Pardo J, Revillo MJ, Rezusta A. *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Trichophyton* spp. *Mycopathologia*. 2014 Oct;178(3-4):221-5. doi: 10.1007/s11046-014-9797-6. Epub 2014 Aug 17.
9. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
10. Chang H, Huang H, Huang T, Yang P, Wang Y, Juan H. Flow cytometric detection of reactive oxygen species. *Bio-protocol*. 2013 Apr;3(8):e431. doi: 10.21769/BioProtoc.431.
11. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1494-500. doi: 10.1038/nprot.2008.141.
12. Rashid A, Scott EM, Richardson MD. Inhibitory effect of terbinafine on the invasion of nails by *Trichophyton mentagrophytes*. *J Am Acad Dermatol*. 1995 Nov;33(5 Pt 1):718-23.
13. de Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Navarro MO, da Silva CS, Barazetti A, et al. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citrisub* sp. citri. *Front Microbiol*. 2016 Feb 9;7:113. doi: 10.3389/fmicb.2016.00113.
14. Rosa PD, Heidrich D, Corrêa C, Scroferneker ML, Vettorato G, Fuentefria AM, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis. *Mycoses*. 2017 Sep;60(9):616-22. doi: 10.1111/myc.12638. Epub 2017 Jun 28.

**Keywords:** photodynamic therapy; onychomycosis; *Fusarium* spp.

## EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE LMM6 COMPOUND AGAINST *Candida tropicalis*

Raquel Cabral Melo<sup>1</sup>; Daniella Renata Faria<sup>2</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>2</sup>; Camila Barros Galinari<sup>1</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>2</sup>; Franciele Abigail Villugron Rodrigues-Vendramini<sup>2</sup>; César Armando Contreras Lancheros<sup>3</sup>; Isis Regina Grenier Capoci<sup>4</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>4</sup>; Erika Seki Kioshima<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, PR

<sup>4</sup>Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR  
e-mail: raquelcmelo97@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Severe invasive fungal infections (IFIs) are becoming increasingly frequent in critically ill patients worldwide in recent decades (1). The genus *Candida* is the most common agent of IFI, accounting for 80% of fungal infections of the circulatory bloodstream. Among *Candida* non-*C. albicans* species (CNCA), *Candida tropicalis* stands out due to high incidence in cancer patients and the high mortality rates (2, 3). *C. tropicalis* presents several virulence factors, such as the ability to form biofilms, which allows community interaction, nutrient maintenance and protection against environmental threats. In addition, antifungal prophylaxis has been recommended in risk population. This frequent exposure increases the selection pressure resulting in antifungal resistance. It has become increasingly common in originally susceptible species. In this context, the development of new antifungal agents is an urgent demand (4).

*In silico* approaches, such as virtual screening and drug repositioning have been performed to reduce the high cost and long time required for the early development stages (5). In this sense, our group has been exploring molecules directed against an important target the thioredoxin reductase. An oxadiazole compound (LMM6), recently selected by drug repositioning, has shown the most promising results against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides* spp. Thus, this study aimed to evaluate the antifungal activity of new oxadiazole in the experimental model of systemic candidiasis, caused by *Candida tropicalis*.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Antifungal agents

The LMM6 Compound was selected by drug repositioning and commercially purchased from Life Chemicals Inc. (Burlington, ON, Canada). The commercial antifungals: Amphotericin B (AmB), Caspofungin (CAS), Micafungin (MCF), Fluconazole (FLZ) and Voriconazole (VRZ).

#### 2.2. Antifungal susceptibility testing

Six isolates of *Candida tropicalis* (five from urine and one from blood) and a standard strain (*C. tropicalis* ATCC 750) were used. The antifungal susceptibility profile was performed by the broth microdilution method, according to the CLSI (M27-A3), with modifications. The LMM6 concentration ranging from 0.5 to 256 µg/mL. For FLZ, ranged was 0,125 to 64 µg/mL, for VRZ, CAS, MCF and AMB from 0,032 to 16 µg/mL. For MCF only 4 isolates were tested. For CFU determination, aliquots were plated on SDA. The synergistic interaction between LMM6 and conventional antifungals was evaluated against *C. tropicalis* (ATCC 750), by the checkerboard assay (7). The fractional inhibitory concentration (FIC) values were calculated as the sum of  $FIC_A + FIC_B = MIC_{combined} / MIC_{drug A alone} + MIC_{combined} / MIC_{drug B alone}$  in which A is the conventional drug and B the compound. The results were classified as proposed by Mor V. et al: strongly synergistic effect,  $FIC < 0.5$ ; synergistic effect,  $FIC < 1$ ; additive effect,  $FIC = 1$ ; no effect,  $1 < FIC < 2$ ; antagonistic effect,  $FIC > 2$  (8). The Bliss-independent interactions were analyzed by Combenefit software (9).

#### 2.3. Time-kill curve

The time-kill curve was determined as proposed by Klepser et al. (1997), with modifications. Briefly, yeasts ( $2-3 \times 10^3$  cells/mL) from the standard strain were subcultured in RPMI in the presence of LMM6 (32, 64 and 128 µg/mL). The FLC (0.125 µg/mL) was used as drug control and only RPMI medium, as positive control.

The plates were incubated at 35°C. For CFU determination, aliquots were plated in SDA at 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 28 and 36h.

#### 2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

*C. tropicalis* ATCC 750 was treated with LMM6 (32 µg/mL) for 24h at 35°C. Then, the yeast were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Afterwards, cells were treated with 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated an increasing acetone gradient and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and images were obtained on a Zeiss 900 TEM.

#### 2.5. Antibiofilm activity of LMM6

The antibiofilm effect was evaluated during the formation phase of biofilm, of a standard strain and a clinical isolate of *C. tropicalis*, as proposed by Tobaldini et al (2016). The concentrations of 32, 64 and 128 µg/mL were tested. The antibiofilm activity of the LMM6 compound was evaluated by scanning electron microscopy (SEM), quantification of viable yeasts and total biomass (violet crystal staining).

#### 2.6. Cytotoxicity

For the cytotoxicity test the Vero, HaCat and HeLa cell lines (2x10<sup>4</sup> cell) were used. The cytotoxic action of LMM6 was evaluated at 24 and 48h using the MTS colorimetric assay. Ten different concentrations ranging from 1 to 512 µg/mL were tested. The 50% cytotoxicity concentration (CC<sub>50</sub>) was determined by logarithm regression analysis. The selectivity index (SI) was determined by the CC<sub>50</sub>/MIC<sub>50</sub> ratio for each compound tested (12).

#### 2.7. In vivo antifungal activity

The procedures were performed following the rules of the Animal Experimentation Ethics Committee of the Maringá State University, Brazil (Approval No. 3855010719). Female balb/c mice (6-8 week old, ~23g) were infected with *C. tropicalis* ATCC 750 (1x10<sup>6</sup> cells), by lateral tail vein. The intraperitoneal treatment was started 3h after infection and performed twice daily. Mice were divided into four groups: LMM6 (treated with 5 mg/kg), MCF+LMM6 (treated with 1 mg/kg of MCF and 5 mg/kg of LMM6) MCF (treated with 1 mg/kg of MCF) and control (treated with PBS, Pluronic® F-127 at 0.025% and DMSO at 2.4%). After 5 days of treatment, the mice were euthanized with isoflurane (5%). Kidneys and Spleen were collected aseptically for fungal burden determination and cytokine dosage. The cytokine levels were measured using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit, according to the manufacturer's instructions, with modifications and analyzed on BD™ FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Kidney and serum from all groups were analyzed.

#### 2.8. Statistical analysis

Data were statistically analyzed using Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Reduction of fungal burden from *in vivo* treatment was reported as log<sub>10</sub> of mean ± standard deviation using unpaired Student's T-test. The others results were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA), by applying Bonferroni multiple-comparisons test, being considered statistically significant, *p*-values less than 0.05.

### 3. RESULTS

LMM6 showed potent inhibitory activity with concentrations ranging from 8-32 µg/mL (Table 1). The majority of clinical isolates and the reference strain (*C. tropicalis* ATCC 750) were susceptible to VRZ and at FLZ, with the exception of one isolate that was considered resistant to both antifungals. The MIC for CAS ranged from 0.125 to 1 µg/mL and all isolates were considered susceptible, as well as for MCF and AmB.

**Table 1. Susceptibility profile of *C. tropicalis* isolates to the LMM6 compound and conventional antifungals**

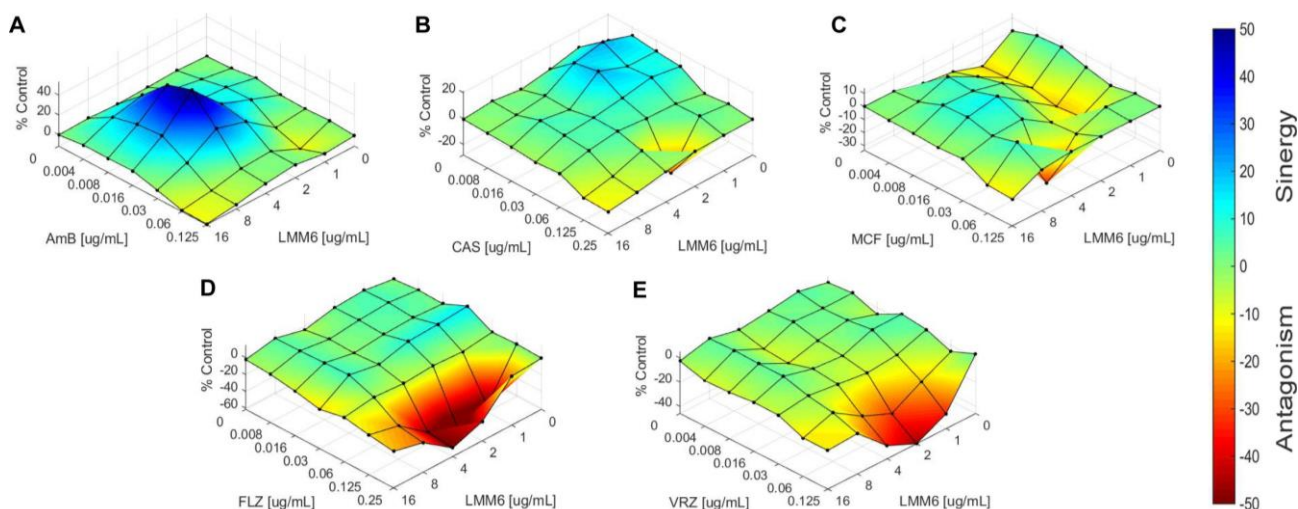
Antifungal agents	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)						FIC values	Interpretation
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Sensible	DDS	Resistant		
LMM6	8-32	8	32	-	-	-	-	-
Amphotericin B	0.25	0.25	0.25	-	-	>1	0.5	Synergistic
Caspofungin	0.125-1	0.25	1	≤ 2	-	-	0.75	Synergistic
Micafungin	0.003-0.015	0.007	0.015	≤ 2	-	-	1	Additive
Fluconazole	0.125-32	0.5	1	≤ 8	16-32	≥ 64	4.25	Antagonistic
Voriconazole	0.03-8	0.06	0.125	≤ 1	2	≥ 4	4.5	Antagonistic

\*DDS: dose-dependent susceptible

The synergistic interaction between LMM6 and conventional antifungals was evaluated, by FIC value (Table 1) and Bliss independence surface analysis (Figure 1). Oxadiazole demonstrated synergistic interaction with AmB and CAS, with FIC values of 0.5 and 0.75 respectively. When combined with MCF, the effect was

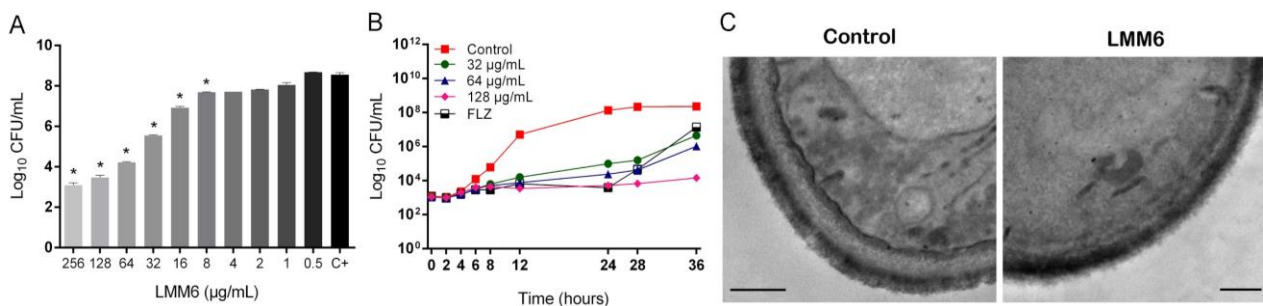


additive, whereas with FLZ and VRZ, the interaction was considered antagonistic (FIC>2). Bliss independence surface analysis corroborated the effects demonstrated by the FIC values, with predominance of blue areas in the synergistic interaction and presence of red areas when there was antagonistic interaction.



**Figure 1. The Bliss independence surface analysis for *in vitro* combinations of conventional antifungals and LMM6 compound against *C. tropicalis* ATCC 750.** A: Amphotericin. B: Caspofungin. C: Micafungin. D: Fluconazole. E: Voriconazole.

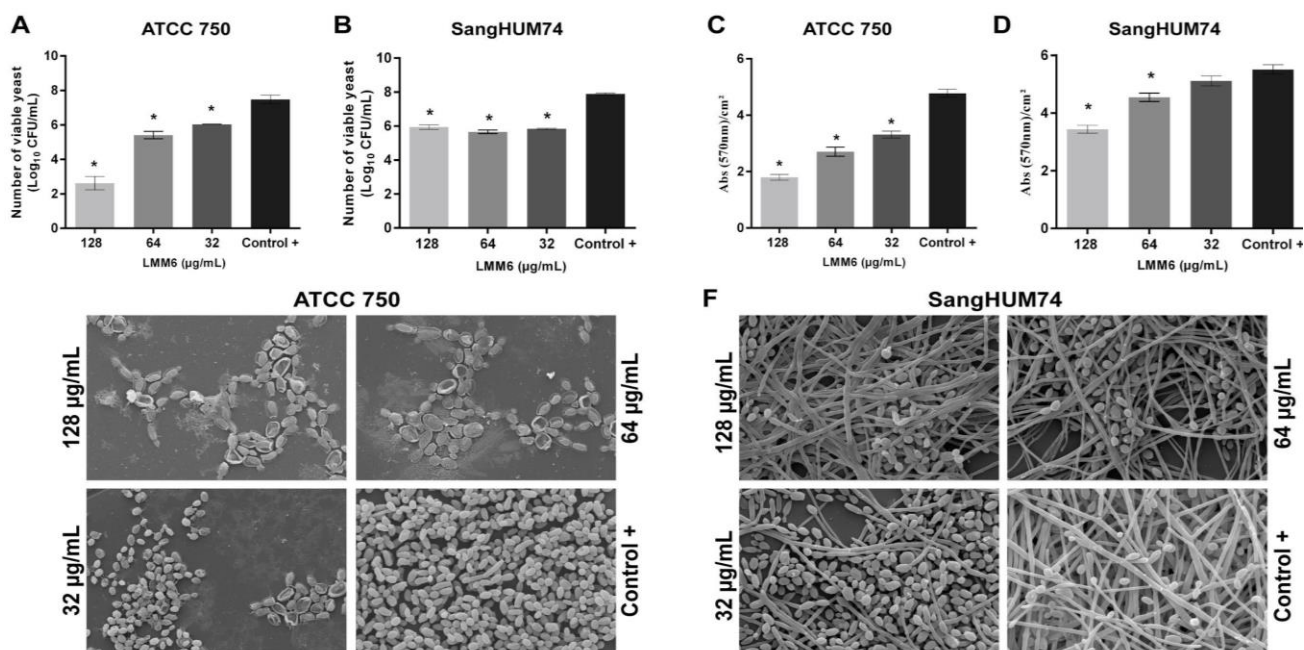
The compound demonstrated important antifungal activity against *C. tropicalis*, as shown in the CFU quantification (Figure 2A). This results pointed to a significant CFU reduction ( $p < 0.05$ ) from 8  $\mu\text{g/mL}$ , apparently an activity dose-dependent. At the two highest concentrations, the reduction was more pronounced ( $\sim 5.5$  log). The time-kill curve results corroborate the promisor antifungal activity of LMM6 (Figure 2B), which can already be observed from 8h. For all LMM6 concentration tested, a substantial reduction in the number of viable yeast ( $\sim 3$  log, 99.90%) was observed in 12h, as compared to the control. After 36h, the LMM6 was able to reduce until  $\sim 4$  log (99.99%) as compared to control. Otherwise, the effect caused by fluconazole resulted in a reduction of  $\sim 1$  log. Therefore, the LMM6 activity profile proved to be more efficient than fluconazole, suggesting a fungicidal effect at higher concentrations. *C. tropicalis* treatment with LMM6 caused significant alterations in the cytoplasmic membrane (Figure 2C).



**Figure 2. Antifungal activity of new oxadiazole against *C. tropicalis*.** (A) Quantitative analysis of LMM6 effect against *C. tropicalis*. The bars indicate the standard deviation. C+: Positive control (without LMM6). \* $p < 0.05$  statistically significant CFU reduction in relation to the control. (B) Time-kill curve of *C. tropicalis* after exposure to the LMM6 (32, 64 and 128  $\mu\text{g/mL}$ ) and Fluconazole (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ). The antifungal profile was monitored over time (0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 36h). (C) *C. tropicalis* ultrastructural analysis after treatment with LMM6.

The LMM6 demonstrated important antibiofilm activity against *C. tropicalis*, as it was able to significantly reduce ( $p < 0.05$ ) the number of viable yeasts and total biomass of biofilm of the standard strain (Figure 3A and C) and the isolate (Figure 3B and D). In addition, SEM images show disruption of the biofilm, change in fungal cell shape with apparent extravasation of cellular content and loss of membrane integrity of the standard strain (Figure 3E) and disruption of the biofilm of the isolate (Figure 3F).

In order to search for compounds with therapeutic potential, it is important to determine their cytotoxic effects on the host cells. The cytotoxic activity of LMM6 was evaluated in three cell lineages, Vero, HaCat and HeLa. The CC 50 values ranged from 85.07 at  $>512$   $\mu\text{g/mL}$ . All cells tested showed SI  $> 10$  (ranging from 10.63 to  $>64$ ) (Table 2). These results indicate that LMM6 was more selective for the pathogen than for host cells.

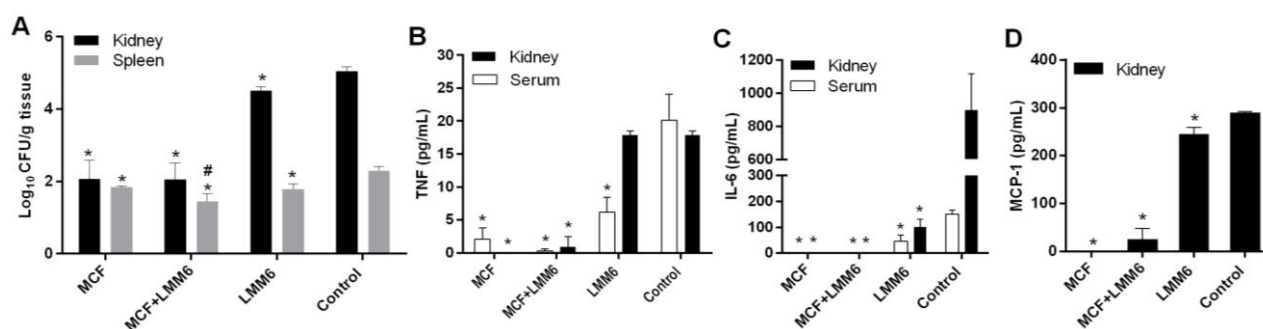


**Figure 3. Activity of compound LMM6 against *C. tropicalis* biofilm.** Quantification of viable yeasts (A and B) and total biomass (C and D). Scanning electron microscopy images of the *Candida tropicalis* ATCC 750 (E) and Isolate SangHUM74 (F) biofilm, treated with the concentrations 128, 64 and 32 µg/mL of LMM6 compound. The bars indicate the standard deviation. Control +: Positive control (without LMM6). \* $p < 0.05$  statistically significant reduction in relation to the control.

**Table 2. Cytotoxic activity of LMM6 compound on HaCat, HeLa and Vero cells**

Cell lines	24h			48h		
	CC50	MIC50	SI	CC50	MIC50	SI
HaCat	106.7	8.0	13.33	85.07	8.0	10.63
HeLa	127.4	8.0	15.93	97.33	8.0	12.17
Vero	>512	8.0	>64.0	90.60	8.0	11.33

SI: selectivity index; CC<sub>50</sub>: Cytotoxic activity. \*CC<sub>50</sub> and MIC<sub>50</sub> values: µg/mL



**Figure 4. Evaluation of fungal burden and cytokine expression in a murine model of systemic candidiasis, after treatment with compound LMM6.** A: Fungal burden in kidney and spleen. MCF: treated with 1 mg/kg of micafungin. MCF+LMM6: treated with 1 mg/kg of micafungin and 5 mg/kg of LMM6. LMM6: treated with 5 mg/kg of LMM6. Control: treated with vehicle. B: TNF expression. C: IL-6 expression. D: MCP-1 expression. \* $p < 0.05$  statistically significant reduction in relation to the control. # $p < 0.05$  statistically significant reduction in relation to the MCF or LMM6 alone.

The *in vivo* antifungal activity of LMM6, was evaluated by the experimental systemic candidiasis model (Figure 4). The treatment with LMM6 (5 mg/kg), MCF and MCF+LMM6 were able to reduce organ fungal burden as compared to the control group (Figure 4A). The additive effect of MCF and LMM6 was evidenced in the spleen. The fungal burden on this organ was better controlled by the combination of antifungals. The CFU reduction was significantly when compared to treatment with MCF or LMM6 alone. The cytokines production were evaluated in kidney and serum (Figure 4B-4D). All treatments were able to reduce significantly ( $p < 0.05$ ) the proinflammatory cytokines secretion as compared to control. This results could be associated with reduction of fungal burden. In *C. tropicalis* infection, TNF- $\alpha$  is a central mediator in inflammation, including control of the IL-6 and MCP-1 expression. Thus, the main changes were observed in this cytokine. Importantly,



mice treatment with LMM6 was able to reduce TNF- $\alpha$  recovered from serum. However, in kidneys TNF levels remained high, although the burden reduction has been significant (Figure 4B).

#### 4. DISCUSSION

The limited therapeutic arsenal associated with increase of resistant strains has led the search for new therapeutic options for *Candida* infections (11). In this study the antifungal activity of new oxadiazole was promising against *C. tropicalis*. The time-kill curve results suggest the fungicidal profile in high concentration. The cell membrane changes observed in LMM6-treated yeast corroborate these results. Arylquinuclidine derivative showed similar antifungal activity against *C. tropicalis* isolates, with MIC values ranging from 2 to 16  $\mu\text{g/mL}$  (12). In addition, the synergistic interaction between different antifungals could reduce the required drug dose, the toxicity and consequently improves the effectiveness of treatment (14). In this context, LMM6 showed synergic interaction with AmB and CAS. Thus, AmB appears to facilitate permeation of LMM6 allowing intracellular target access. Unlike, the FLZ and VRZ presented the effect antagonistic, suggesting a different metabolic pathway. Yin and collaborators (2014) proposed that drug synergy or antagonism can be a property of target-related. Finally, the interaction LMM6 and MCF was additive. This combination was used for *in vivo* antifungal evaluation with success.

The cytotoxicity profile of LMM6 indicated that new oxadiazole was more selective for the pathogen than for host cells, with SI ranging from 10.63 to  $>64$ . Records suggest that for a compound to be promising, the values must be  $\text{SI} > 10$  (13). Based on this, LMM6 can be considered a promising candidate in the antifungal development pipeline. Preclinical *in vivo* research is essential for assessing the competence of new candidates. Here, LMM6 been shown to be effective in treating systemic candidiasis caused by *C. tropicalis* in mice, with significant reduction of fungal burden and control of proinflammatory cytokines secretion. In addition, the additive interaction between LMM6 and MCF found in the *in vitro* experiments was also emphasized in the *in vivo* assays. The reduction of fungal burden in spleen of animals treated with the drug combination (LMM6 and MCF) was greater than that found in the monotherapy.

Interestingly, the LMM6 showed anti-biofilm activity, opening a perspective for the medical devices treatment to prevent nosocomial infections. The biofilm contribute widely in the establishment of infection and is strongly associated with the development of antifungals resistance. Interestingly, LMM6 was able to inhibit extracellular matrix production. Since the matrix can act as a physical barrier, also contributes to increased antifungal resistance in biofilm (4).

#### 5. CONCLUSION

LMM6 demonstrated potent *in vitro* and *in vivo* antifungal activity against *C. tropicalis*, therefore it is considered a highly promising candidate in the development of new therapeutic options for systemic candidiasis treatment.

#### FINANCIAL SUPPORT

CAPES and CNPq.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

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

#### REFERENCES

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1–53.
2. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373.
3. Tang HJ, Liu WL, Lin HL, Lai CC. Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(6):e99103.
4. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Front Microbiol*. 2017;8:1927.
5. Capoci IRG, Faria DR, Sakita KM, Rodrigues-Vendramini FAV, Bonfim-Mendonça PS, Becker TCA, et al. Repurposing approach identifies new treatment options for invasive fungal disease. *Bioorg Chem*. 2019 Mar;84:87–97.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. 3rd ed. CLSI M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
7. Singh S, Fatima Z, Ahmad K, Hameed S. Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. *PLoS One*. 2018 Aug 29;13(8):e0203079.

8. Mor V, Rella A, Farnoud AM, Singh A, Munshi M, Bryan A, et al. Identification of a new class of antifungals targeting the synthesis of fungal sphingolipids. *MBio*. 2015;6(3):e00647.
9. Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, Mollard S, Bramhall JL, Richards FM, et al. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*. 2016;32(18): 2866–8.
10. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against a *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(6),1392–5.
11. Tobaldini-Valerio FK, Bonfim-Mendonça PS, Rosseto HC, Bruschi ML, Henriques M, Negri M, et al. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiol*. 2016 Aug;11:1035–46.
12. Ishida K, Rodrigues JCF, Cammerer S, Urbina JA, Gilbert I, Souza W. Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2011;10:3.
13. Orme I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jul; 45(7):1943–6.
14. Spitzer M, Robbins N, Wright GD. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence*. 2017 Feb 17;8(2):169–85.
15. Yin N, Ma W, Pei J, Ouyang Q, Tang C, Lai L. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PLoS One*. 2014 Apr 8;9(4):e93960.

**Keywords:** *Candida tropicalis*; antifungal activity; oxadiazole.

## Estratégias para o controle e combate a infecções causadas por bactérias MDR

## RESGATE DA AÇÃO DA POLIMIXINA B PELA TIOSEMICARBAZIDA DERIVADA DO (-)-CANFENO CONTRA ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

**Bruna Renata Silva<sup>1</sup>; Beatriz Cardoso de Freitas<sup>1</sup>; Paula Assis Queiroz<sup>2</sup>; Pedro Henrique Rodrigues do Amaral<sup>3</sup>; Fabio Vandresen<sup>4</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>5</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>5</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>5</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>5</sup>**

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

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

<sup>3</sup>Graduando curso de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente da Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Londrina, PR

<sup>5</sup>Docente do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá  
e-mail: bruna-emilio@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um agravo frequentemente associado ao ambiente hospitalar. Infecções causadas por bactérias com algum perfil de resistência têm limitado as opções terapêuticas e gerado altos custos especialmente pelo período prolongado de internações (1). Bactérias Gram-negativas pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, conhecidas como enterobactérias, são responsáveis por causar severas infecções sistêmicas, urinárias e pulmonares (2).

Em enterobactérias diversos mecanismos podem levar a resistência, entre eles destaca-se a produção de  $\beta$ -lactamases. Essas enzimas são capazes de degradar os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, importante opção para o tratamento de infecções graves (3). As  $\beta$  lactamases do tipo carbapenemases, capazes de degradar até a última geração de  $\beta$ -lactâmicos, como os carbapenêmicos, são frequentemente associadas às enterobactérias, especialmente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Mudanças na permeabilidade celular e hiperexpressão de bombas de efluxo representam outros mecanismos de resistência nestas espécies bacterianas (3).

A resistência aos carbapenêmicos tem levado ao uso de outras opções terapêuticas, uma delas a polimixina B, considerada um agente catiônico que possui afinidade pela membrana externa, em especial pelo lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. Essa atração pelo LPS facilita a passagem da molécula pela parede bacteriana e sua ação contra a bicamada fosfolipídica da membrana interna, levando a lise celular (4). A polimixina B foi usada durante décadas para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas, porém seu uso foi reconsiderado devido a sua alta toxicidade e pelo desenvolvimento de novos antibióticos menos tóxicos e efetivos. Contudo, com o surgimento de multirresistência em bactérias Gram-negativas, inclusive enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs), polimixinas voltaram como uma opção terapêutica (5,6). Entretanto, ERCs resistentes às polimixinas têm sido frequentemente relatadas como agentes de infecções em diversos hospitais do mundo (7).

Embora as estratégias terapêuticas busquem por alternativas e melhorias, o desenvolvimento de novos antimicrobianos menos tóxicos não acompanha o ritmo acelerado do avanço da resistência bacteriana, o que contribui para altas taxas de morbidade e mortalidade.

Interações sinérgicas entre antimicrobianos têm sido investigadas para a melhoria dos resultados terapêuticos e diminuição do potencial tóxico dos antimicrobianos empregados em infecções por ERCs (6,8).

As plantas estão historicamente relacionadas como importantes fontes para a descoberta de medicamentos e atualmente a pesquisa por novos compostos ativos pode possibilitar novas abordagens terapêuticas (9). O canfeno, um monoterpeneo natural encontrado em altas concentrações no óleo essencial de folhas e flores de diversas espécies de plantas com atividade antibacteriana, por meio de transformações químicas possibilitou a síntese de diversos derivados, como a tiossemicarbazida (10). Esses derivados têm demonstrado ação satisfatória contra alguns microrganismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários e a pesquisa *in vitro* tem mostrado atividade antimicrobiana e antiproliferativa em concentrações não tóxicas em

células de mamíferos (11,12). Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) previamente caracterizada (13) foi testada por colaboradores do nosso grupo de pesquisa e mostrou importante ação inibitória sobre *Mycobacterium tuberculosis* e baixa toxicidade em células epiteliais da linhagem VERO (10).

Ni et al (2016) observaram reduções significativas nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da polimixina E (colistina) quando associada ao inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) em bacilos Gram-negativos (14). Embora os mecanismos envolvidos nessa diminuição da CIM não sejam totalmente conhecidos, esses autores sugerem que o CCCP, neste caso, não atue como inibidor de bomba de efluxo, mas sim restaurando a carga negativa das bactérias pelo rompimento da força motriz do próton (14).

O desenvolvimento de novas moléculas com ação semelhante ao CCCP e com potencial citotóxico reduzido poderiam resgatar a atividade da polimixina B e serem usadas como adjuvantes no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade da polimixina B associada a TSC ou CCCP em ERCs.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras bacterianas**

Foram testados 15 isolados clínicos de ERCs sensíveis e resistentes à polimixina, provenientes da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá. Os isolados bacterianos estocados a - 80 °C em caldo tripteína de soja (TSB - Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) adicionado de 15 % de glicerol foram reativadas no momento da realização de cada teste.

### **2.2. Compostos testados**

A TSC foi sintetizada e gentilmente fornecida pelo Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Londrina, sob responsabilidade do professor Dr. Fábio Vandresen. O carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) e o sulfato de polimixina B foram adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA e Inlab, São Paulo, SP, Brasil, respectivamente).

### **2.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

As CIMs dos compostos e da polimixina B foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo usando Muller Hinton Broth com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) segundo recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (15). Para interpretação do perfil de sensibilidade da polimixina B foi utilizado o ponto de corte referente a colistina determinado pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (16). *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 e o antibiótico meropenem (AstraZeneca, Cotia, Brasil) foram utilizados como controles. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e repetidas em dias diferentes.

### **2.4. Determinação da ação combinada**

A avaliação do efeito combinado dos compostos com a polimixina B foi realizada empregando a técnica de microdiluição em CAMHB, usando microplaca de 96 orifícios. A polimixina B foi diluída serialmente na razão 2, em concentrações variáveis, conforme a CIM de cada isolado. Em seguida, o composto a ser combinado (TSC ou CCCP) foi adicionado em cada poço em concentrações fixas (50, 25 e 10 µg/mL de TSC ou 12,5 µg/mL de CCCP). O inóculo bacteriano foi adicionado a cada orifício da microplaca na concentração final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL. A microplaca foi incubada a  $35 \pm 2$  °C por 16 a 20 h. A polimixina B diluída na mesma razão foi utilizada como controle. A CIM da polimixina B sem e com o composto testado foram comparadas. O efeito da ação combinada foi avaliado pelo fator de modulação (FM), no qual  $FM = (CIM \text{ da polimixina B}) / (CIM \text{ de [combinação polimixina B +TSC ou CCCP]})$ . O efeito modulatório foi confirmado com uma diminuição de 4 vezes ou mais da CIM da combinação de Polimixina B +TSC ou CCCP em relação a polimixina B sozinha (17).

### **2.5. Ensaio de curva de tempo-morte**

Para avaliar a ação da combinação polimixina B + TSC e polimixina B + CCCP ao longo de 24 h um ensaio de curva de tempo de morte foi realizado para o isolado clínico IC-5 de ERC polimixina B resistente como previamente descrito por Siqueira et al., 2014 (18) com modificações. A polimixina B foi testada em concentração subinibitória de 1 µg/mL associada a 100 e 50 µg/ml de TSC ou 12,5 µg/ml de CCCP. Os ensaios incluíram um controle de crescimento sem as substâncias. O inóculo bacteriano inicial utilizado foi de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL. Os tubos com crescimento bacteriano foram incubados em agitador e continuamente agitados (120 rpm). Aliquotas (0,1 mL) foram removidas a 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h e diluídas em série em solução salina estéril para contagem de viáveis em ágar triptico de soja (TSA; Difco) em triplicata. O limite inferior de detecção foi de 50 UFC/mL. Os dados foram plotados como  $\log_{10}$  UFC/mL versus tempo (h) para cada ponto de tempo ao longo de 24 h.

## **3. RESULTADOS**

Todos os isolados clínicos ERCs polimixina B-resistentes testados apresentaram reduções das



CIMs quando a polimixina B foi associada às diferentes concentrações de TSC (Tabela 1). A avaliação da ação combinada pelo FM mostrou que em todos os isolados clínicos polimixina B-resistentes a TSC modulou a ação da polimixina B, diminuindo a CIM em mais de 4x, com alteração para a zona de sensível (16). Em isolados ERCs polimixina B-sensíveis, não foi observado reduções das CIMs frente a associação (Tabela 1).

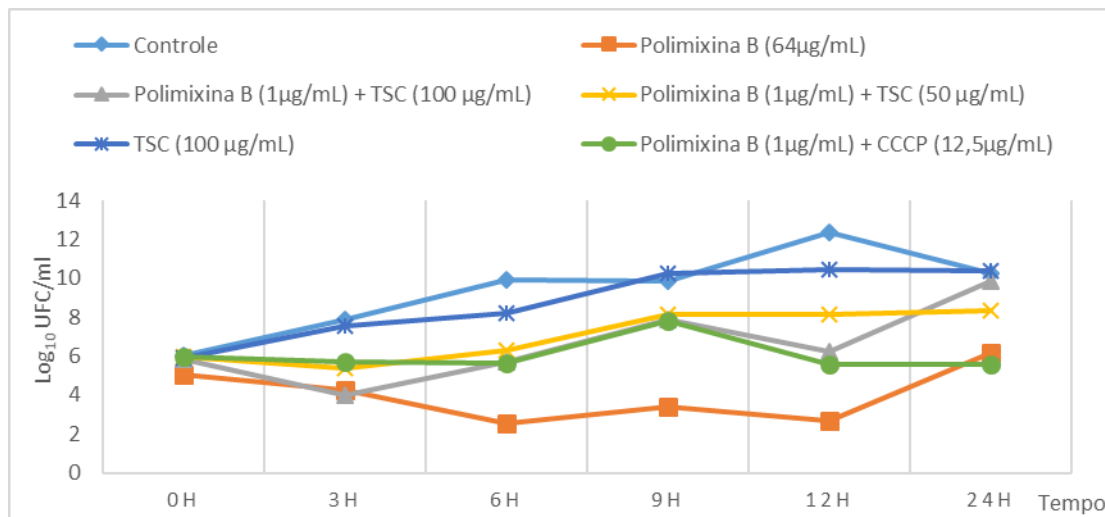
O CCCP também modulou a ação da polimixina B nos isolados clínicos ERC polimixina B-resistentes, reduzindo 4 x ou mais a CIM e não teve ação modulatória nos isolados ERC polimixina B-sensíveis (Tabela 1).

**Tabela 1. Perfil de sensibilidade, concentração inibitória mínima (CIM) e efeito modulatório da polimixina B isoladamente e em associação com tiossemicarbazida derivada do (-)- canfeno (TSC) ou carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) em enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERCs)**

ERCs	Perfil de sensibilidade à polimixina B	CIM (µg/ml)					FM	
		Polimixina B	Polimixina B + TSC (50 µg/mL)	Polimixina B + TSC (25 µg/mL)	Polimixina B + TSC (10 µg/mL)	Polimixina B +CCCP (12,5 µg/mL)	TSC 50 µg/mL	CCCP 12,5 µg/mL
IC 1	R	32	1	1	2	0,5	32	64
IC 2	S	0,25	0,25	0,25	NT	NT	1	NT
IC 3	R	256	1	2	32	0,5	256	512
IC 4	R	256	1	1	NT	NT	256	NT
IC 5	R	64	1	0,5	4	0,25	64	256
IC 6	S	0,25	NT	0,12	NT	NT	2	NT
IC 7	S	0,5	NT	0,5	NT	NT	1	NT
IC 8	S	0,25	NT	0,25	NT	NT	1	NT
IC 9	S	0,25	NT	0,25	NT	NT	1	NT
IC 10	R	64	2	0,5	16	NT	32	NT
IC 11	S	0,25	NT	0,25	NT	NT	1	NT
IC 12	R	32	1	2	8	0,5	32	64
IC 13	R	16	0,5	1	1	NT	32	NT
IC 14	S	0,25	0,25	0,25	NT	0,25	1	1
IC 15	S	0,5	0,5	0,5	NT	0,25	1	1

R: resistente; S: sensível; NT: não testado; IC: Isolado clínico; FM: fator modulatório.

A curva de tempo-morte (Figura 1) mostrou uma redução no número de viáveis  $>2\text{-log}_{10}$  do isolado clínico (IC-5) no tempo 3 h quando uma concentração subinibitória de polimixina B (1 µg/mL) associada a TSC (100 µg/mL) foi empregada, porém esta redução não foi sustentada ao longo das 24 h. O mesmo padrão, mas com redução  $< 2\text{-log}_{10}$ , ocorreu na associação de 1µg/ml de polimixina+ 50 µg/mL de TSC. Em relação a polimixina B testada isoladamente na CIM para o IC-5 (64 µg/mL), houve inicialmente uma diminuição  $>3\text{-log}_{10}$  que também não se manteve ao longo das 24 h. A associação de polimixina B em concentração subinibitória (1 µg/mL) com CCCP (12,5 µg/mL) inibiu o crescimento, mas sem redução no número de viáveis do IC-5 nos tempos avaliados.



**Figura 1. Curva de tempo de morte do isolado clínico 5, com as concentrações de polimixina B e Tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno (TSC) ou carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) associadas.**

#### 4. DISCUSSÃO

Polimixina B representa uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por ERCs e a sua utilização tem sido questionada em relação a toxicidade, principalmente nefrotoxicidade e surgimento de resistência (19). Assim, a busca por novas alternativas para o tratamento dessas infecções torna-se essencial para o sucesso terapêutico.

Em nosso trabalho, observamos que a TSC, uma substância caracterizada quimicamente e com ação antifúngica e antituberculosa definidas em estudos anteriores (10,13), se mostrou ativa para o resgate da atividade da polimixina B contra ERCs. Observamos que além da TSC, o CCCP também foi capaz de diminuir as CIMs de polimixina B para níveis dentro do limite definido de sensibilidade, considerando os pontos de corte que define a sensibilidade para polimixina ( $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  = Sensível e  $> 2 \mu\text{g/ml}$  = Resistente) (16).

Bactérias Gram-Negativas, como as enterobactérias, tornam-se resistentes a polimixina B por diversos mecanismos, incluindo modificações na estrutura da membrana externa bacteriana, em especial o lipopolissacarídeo. Essa modificação do LPS altera a carga da membrana bacteriana, tornando-a menos negativa, diminuindo a interação com agentes catiônicos, como as polimixinas (5).

Ni et al. (2016), trabalhando com inibidores de bombas de efluxo associados a colistina, também observaram reduções significativas nas CIMs da polimixina em bactérias Gram negativas, inclusive em *K. pneumoniae* quando associada ao CCCP. Embora os mecanismos envolvidos nessa alteração de susceptibilidade não sejam totalmente conhecidos, esses autores acreditam que o CCCP não atuou como inibidor de bomba de efluxo, mas sim na restauração da carga negativa das bactérias pelo rompimento da força motriz do próton (14).

Outros autores também observaram a ação do CCCP na diminuição da CIMs de polimixinas em bactérias Gram-negativas. Entretanto, esses autores sugerem uma ação do CCCP como inibidor de bomba de efluxo (20,21).

Em nosso trabalho observamos que o CCCP diminuiu a CIM da polimixina B em todos os isolados polimixina B-resistentes. Entretanto, o mesmo perfil de redução na CIM de polimixina B não foi observado nos isolados polimixina B-sensíveis. Esse fato poderia reforçar a hipótese de ação do CCCP não como um inibidor de bomba de efluxo, mas como um restaurador da carga negativa do LPS dos isolados bacterianos polimixina B-resistentes.

Apesar da importante ação do CCCP no resgate da ação da polimixina B em isolados resistentes, esta substância não pode ser usada na prática clínica devido a sua intrínseca citotoxicidade (14). O desenvolvimento de novas moléculas com ação semelhante ao CCCP e com potencial citotóxico reduzido poderiam ser utilizadas para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes. Nesse sentido a TSC se mostra como um promissor adjuvante no tratamento de ERCs polimixina B-resistentes.

No ensaio de curva de tempo-morte, nós observamos que a CIM de polimixina B levou a uma redução superior a  $2\text{-log}_{10}$  do número de viáveis do isolado bacteriano testado. Entretanto, esse efeito não foi sustentado após a 12ª hora de exposição. Já foi demonstrado que populações bacterianas podem apresentar heterorresistência, o que significa a existência de subpopulações com CIMs maiores em uma população mais susceptível (22). A heterorresistência tem sido relatada após monoterapia com polimixinas

(22), o que poderia justificar o recrescimento bacteriano observado em nosso estudo de curva de tempo de morte. Outros autores trabalhando com polimixina associada ou não a diferentes antimicrobianos em ensaio de curva de tempo de morte observaram que em isolados resistentes a este antimicrobiano, mesmo expostos a concentração superior a CIM, o efeito na diminuição de viáveis não foi sustentado ao longo das 24 horas (23,24).

Como é de nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia a ação modulatória da TSC sobre a polimixina B em isolados de ERCs resistentes e sensíveis à polimixina B. Considerando que a substância química TSC apresenta uma citotoxicidade baixa para células epiteliais da linhagem VERO (10) e atividade semelhante ao CCCP no resgate da ação da polimixina B. Embora mais estudos devam ser realizados para esclarecer a ação da TSC sobre ERCs, esta substância constitui um promissor fármaco a ser utilizado como adjuvante no tratamento de infecções por ERCs polimixina B-resistentes.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que a TSC resgatou a atividade da polimixina B em isolados clínicos de ERCs polimixina B-resistentes e poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento de infecções por esses multirresistentes.

## FINANCIADORES

CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Capes.

## REFERÊNCIAS

1. Cassir N, Rolain JM, Brouqui P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: The revival of old antibiotics. *Front Microbiol.* 2014;5(OCT):1–15.
2. Sheu C, Chang Y, Lin S, Chen Y, Hsueh P. Infections caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An update on therapeutic options. *Front. Microbiol.* 10:80. doi:10.3389/fmicb.2019.00080.
3. Antibacterial agents in clinical development: An analysis, of the antibacterial clinical development pipeline including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017 (WHO/EMP/IAU/2017.12). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=1>
4. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
5. Poirel L, Aurélie Jayol PN. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2017;30(2):557–96. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
6. Lee. Polymyxins and doripenem combination against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res* [Internet]. 2013;5(2):97–100. Available from: <http://www.jocmr.org/index.php/JOCMR/article/view/1220>.
7. Luiz J, Sampaio M, Cristina A. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>.
8. Le J, Mckee B, Srisupha-olarn W, Burgess DS. In vitro activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae*. 2011;3(3):106–10.
9. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-wenzig E. Europe PMC Funders Group Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. 2016;33(8):1582–614.
10. Souza MRP, Coelho NP, Baldin VP, Scodro RBL, Cardoso RF, da Silva CC, et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Nat Prod Res.* 2018 May;1–6.
11. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4449–62.
12. Pitucha M, Woś M, Miazga-Karska M, Klimek K, Mirosław B, Pachuta-Stec A, et al. Synthesis, antibacterial and antiproliferative potential of some new 1-pyridinecarbonyl-4-substituted thiosemicarbazide derivatives. *Med Chem Res.* 2016;25(8):1666–77.
13. Yamaguchi MU, Da Silva APB, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Da Silva CC, Nakamura CV. Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on *Trichophyton mentagrophytes*. *Molecules.* 2009;14(5):1796–

807.

14. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3215–8.
15. Standards P, Testing AS. M100 Performance Standards for Antimicrobial.
16. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.
17. Caleffi-Ferracioli KR, Cardoso RF, de Souza JV, Murase LS, Canezin PH, Scodro RB, et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 2019 Feb;14:185–94.
18. Siqueira VLD, Cardoso RF, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RB, Fernandez MA, Fiorini A, et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin. 2014;58(7):3957–67.
19. Velkov T, Roberts KD. Discovery of novel polymyxin-like antibiotics. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:343–62.
20. Park YK, Ko KS. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone ( CCCP ) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. 2015;53(1):53–9.
21. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):177–83.
22. Bergen PJ, Smith NM, Bedard TB, Bulman ZP, Cha R, Tsuji BT. Rational combinations of polymyxins with other antibiotics. 2019.
23. Sharma R, Patel S, Abboud C, Diep J, Ly NS, Pogue JM, et al. Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: pharmacodynamics and morphological changes. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017 Feb 23;49(2):224–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5786158/>.
24. Huang D, Yu B, Diep JK, Sharma R, Dudley M. In Vitro Assessment of Combined Polymyxin B and Minocycline Therapy against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae*. 2017;61(7):1–9.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriaceae*; polimixina B; tiossemicarbazida.

## METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*: LOCAL DISSEMINATION AMONG HOSPITALIZED PATIENTS AND HEALTHY DOGS AND THEIR OWNERS

Franciele Viana Fabri<sup>1</sup>; Pedro Marquetti Pereira<sup>2</sup>; Danielle Rosani Shinohara<sup>3</sup>; Aline Natália de Santi<sup>2</sup>; Regivaldo Florentino Rodrigues<sup>4</sup>; Rúbia Pazzetto<sup>5</sup>; Mirian Nicéa Zarpellon<sup>5</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Biochemical Pharmacist, Maringá University Hospital, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: franciele\_fabri@hotmail.com

### 1. INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is an important Gram-positive coccus which is generally considered an opportunistic or potential pathogen that can colonize the nasal mucosa of human and companion animals (1, 2). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is one of the most common resistant microorganisms that cause healthcare-associated infections (HAI), restricting therapeutic options and making treatment difficult. However, these isolates can also be found in the nasal mucosa predisposing to infections in the hospital settings (HA-MRSA) and in the community (CA-MRSA) (3, 4).

Methicillin resistance in *S. aureus* occurs by the presence of an altered penicillin-binding protein (PBP)2a that is encoded by the *mecA* gene, which is inserted into a mobile genetic element known as staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) (5). To date, 13 types of SCC*mec* have been described (6). The most prevalent SCC*mec* among HA-MRSA are type I, II, III, in contrast to the CA-MRSA that has SCC*mec* of type IV and V (5).

Although *S. aureus* is frequently involved in hospital infections, this microorganism has also been associated with infections in companion animals, becoming an important pathogen in veterinary medicine and generating concern that animals could act as reservoirs for human infection (6, 7).

Molecular typing is an important tool to establish the epidemiological profile of *S. aureus*, both hospital and community, and to understand the mode of dissemination of this microorganism (8). The propose of the study was to evaluate the local dissemination of *S. aureus* isolates among hospitalized patients (H-SA), community individuals (C-SA) and their dogs (Dog-SA) in southern Brazil.

### 2. METHODS

#### 2.1. Study Setting and population

This epidemiologic study was conducted at two different places. The first one was the University Hospital of Maringá (HUM), in Maringá, Brazil. The second was conducted in 25 Veterinary Clinics (VC) in the same city. In both places, the study was carried out in the same period of two years.

The study evaluated isolates of *S. aureus* recovered from two groups: hospital and community. The hospital isolates (H-SA) were obtained from hospitalized patients in different hospital units. Only first isolate from each patient from clinical or surveillance cultures was included in the study (138 patients). Thus, 129 *S. aureus* were selected for the study.

The community isolates were obtained from families randomly selected that took their healthy dogs for routine consultations or for bath and grooming at VC in the city of Maringá. All human volunteers agreed to participate and signed a free and informed consent form. A total of 449 samples were collected from 208 healthy human individuals and from their respective 241 healthy dogs.

#### 2.2. Isolation, phenotypic characterization and susceptibility testing of *S. aureus*

Hospital *S. aureus* isolates: identification of H-SA isolates and antimicrobial susceptibility profile were performed in the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital of Maringá (HUM) using the automated BD Phoenix™ system (Becton and Dickinson, Sparks, USA). After identification, all the isolates



were sent to the Microbiology Laboratory of the State University of Maringá (Lab-UEM) for molecular techniques.

Regarding community isolates, nasal swabs samples (human and their healthy dogs) were collected from both nostrils and immediately shipped to Lab-UEM. All isolates were identified according to colony morphology, Gram staining, catalase and coagulase production.

In the community samples the sensitivity test for oxacillin and vancomycin was performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (9) and interpreted according to document M100-S29 (10).

### 2.3. Molecular techniques

To perform the molecular techniques, all stored *S. aureus* isolates were reactivated in Tryptic Soy Agar (TSA) for 24-48h at 37°C, to confirm purity. DNA extraction was performed with hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), according to the methodology proposed by Doyle and Doyle (11). The community isolates were submitted to genotypic identification for specie identification of *S. aureus* by Multiplex-PCR according to Sasaki et al (12) The presence of the methicillin resistance gene (*mecA*) was analyzed in all *S. aureus* isolates (both hospital and community) by PCR, according to Vannuffel et al (13) SCC*mec* typing was performed for all *mecA* positive isolates by multiplex PCR assay, as described by Zhang et al (14).

Molecular typing was performed by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction using RW3A primer (rep-PCR-RW3A), according to Del Vecchio et al (15) to the determination of local dissemination of *S. aureus*. The PCR products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (Tris; boric acid; EDTA) stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The interpretation of the fingerprint patterns was performed by Bionumerics® software version 6.5. All *S. aureus* that presented more than six bands after gel interpretation were inserted into a database and a dendrogram was generated. The isolates that showed similarity (Dice correlation coefficient  $\geq 0.80$ ) were considered belonging to the same cluster.

### 2.4. Ethics committee

The study was approved by the research ethics committee involving human beings of the State University of Maringá, by the animal ethics and biosafety committee and it was also approved by Coreia/HUM, Copep/UEM.

## 3. RESULTS

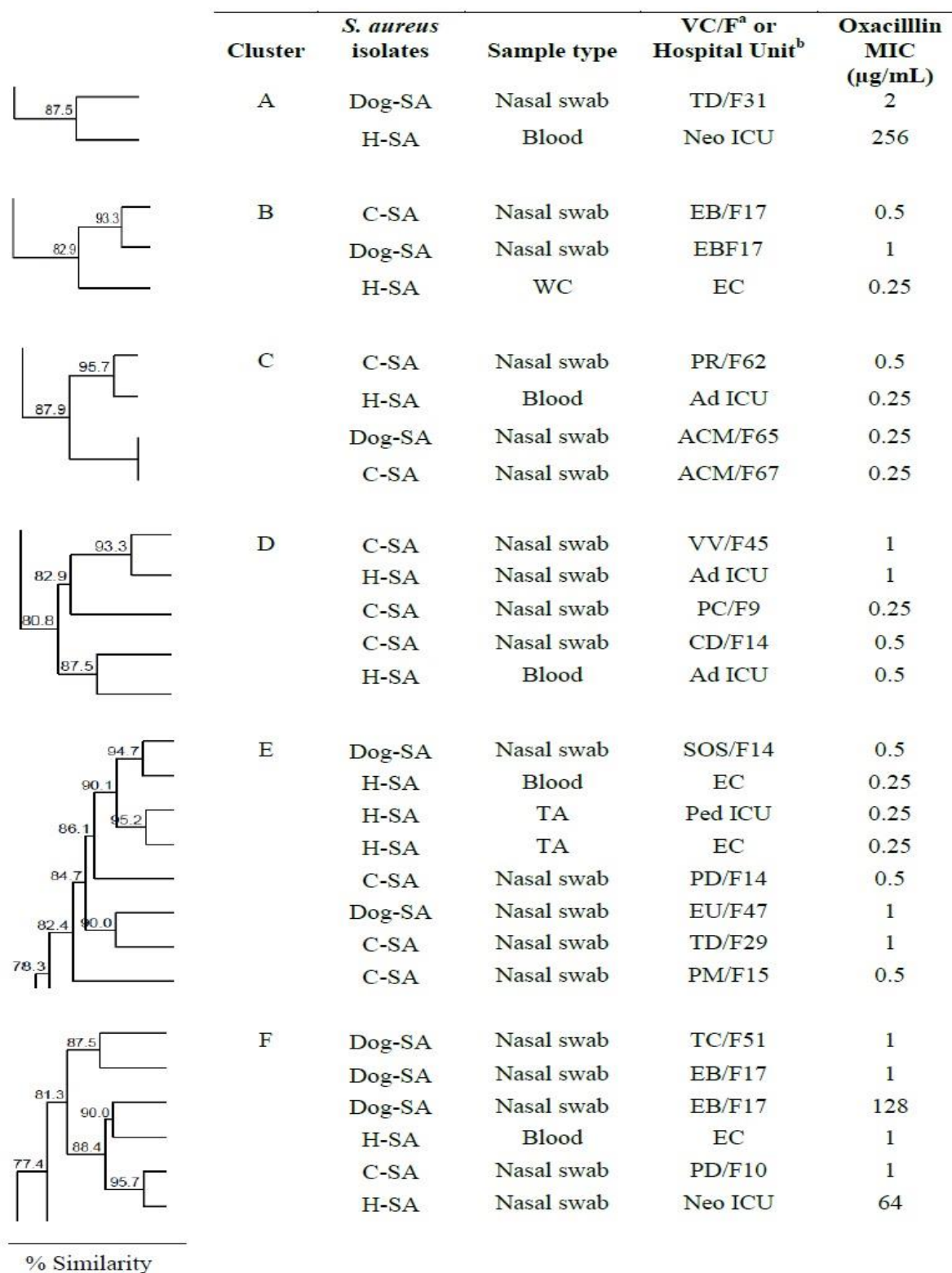
The 129 H-SA came from the following sites: 40 (31%) wound secretions, 39 (30.2%) blood samples, 32 (24.8%) tracheal aspirates, 11 (8.5%) nasal swabs, five (3.9%) urines and two (1.5%) central venous catheters (CVC). The isolates were distributed in different hospital units: emergency care (39.5%), clinical care (12.4%) and ICU (48.1%). Regarding the community samples, nasal carriage by *S. aureus* was identified in 57/208 (27.4%) of human samples (C-SA) and in 38/241 (15.8%) of dogs samples (Dog-SA).

The distribution of MIC to methicillin among the isolates ranged from 0.125 µg/ml to 128 µg/ml. MIC  $> 2$  µg/mL for methicillin (MRSA) was observed in 46.5% (60/129) H-SA, in 3.5% (2/57) C-SA and in 2.6% (1/38) Dog-SA. All isolates had MIC  $\leq 2$  µg/mL for vancomycin. All these MRSA isolates were molecularly confirmed presenting the *mecA* gene, including two *S. aureus* phenotypically identified as methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA).

Among the hospital isolates, the most prevalent SCC*mec* was type I (43%), followed by types II (11%), IVc (8%) and IVa (3%). In 35% of these isolates SCC*mec* was not typable. Among the 2 MSSA isolates positive for the *mecA* gene, 1 presented SCC*mec* of type IVc and the other was not typable. The 3 isolates from the community that harbored *mecA* gene had SCC*mec* type II.

Of the 224 isolates of typed *S. aureus* by RW3A, only 170 had several bands greater than 6 and were then analyzed by Bionumerics® to assess clonality. Among the 170 isolates, 113 were H-SA, 31 C-SA and 26 Dog-SA, resulting in 60 distinct clusters. Fifteen clusters were comprised of MSSA and MRSA isolates. It can be verified that five clusters had isolates with different types of SCC*mec* (more than one type). A major cluster, with 15 community isolates, presented dissemination between human and dog, including resistant methicillin isolates (2 C-MRSA carrying SCC*mec* type II).

Figure 1 shows the clonal distribution among hospital and community isolates (C-SA and Dog-SA). Four clusters presented only dissemination of MSSA (B, C, D and F) and in the other two clusters (A and F) could be verified the presence of MRSA.



**Figure 1. Dendrogram obtained from six clusters that had both hospital and community isolates using REP-PCR - RW3A. H-SA: *Staphylococcus aureus* from hospitalized patients; C-SA: *Staphylococcus aureus* from community dog owners; Dog-SA: *Staphylococcus aureus* from dogs.**

a VC/F: Veterinary Clinic/Family: in relation to community isolates (C-SA e Dog-SA).

b Hospital units: in relation to hospital isolates (H-SA).

Neo ICU: neonatal intensive care unit; Ped ICU: pediatric intensive care unit; Ad ICU: adult intensive care unit; WC: wound secretion; TA: tracheal aspirate. EC: Emergency care

From the 25 VC evaluated, *S. aureus* isolates were found in 17 of them. Five of these clinics presented genetic similarity interfamily (in different families) or intrafamily (in the same family), shown in the

Table 1.

**Table 1. Characteristics of *S. aureus* isolated from veterinary clinics which presented interfamily and/or intrafamily cluster dissemination**

Veterinary clinic	Cluster	Family	n of isolate / origin <sup>a</sup>	Bacterial species	SCC <i>mec</i> type
PD		F63	2 / C	MSSA	-
		F4	1 C	<b>MRSA</b>	II
		F5	1 C	MSSA	-
OD	G	F56	2 Dog + 1 C	MSSA	-
PR		F59	1 C	MSSA	
		F59	1 C	<b>MRSA</b>	II
		F62	1 Dog	MSSA	-
ACM	C	F65	1 Dog	MSSA	-
		F67	1 C	MSSA	-
EB	F	F17	1 Dog	MSSA	
		F17	1 Dog	<b>MRSA</b>	II
EB	H	F17	1 Dog + 1 C	MSSA	-

a n: number, origin: community dog owners (C), dog (D). PD, OD, PR, ACM and EB: name of the veterinary clinics' initial letters. The clusters repeated here (C and F) are the same as in figure 1.

#### 4. DISCUSSION

*S. aureus* is one of the main multidrug-resistant microorganisms involved in HAI, and MRSA strains dissemination can occur, both in hospital and community environments (1, 8). The present study observed the presence of clusters of both MSSA and MRSA disseminated among isolates of hospitalized patients and of healthy pets and their community owners in the same period and city.

Molecular characterization of SCC*mec* types and subtypes of MRSA may contribute to control, prevention and therapeutic approaches against this microorganism (2, 5). Among hospital MRSA isolates, our results demonstrated the dissemination of four different types of SCC*mec*. However, unexpectedly, there was no detection of SCC*mec* III (the most prevalent in Brazilian hospitals) and it was observed a type I prevalence, followed by type II and IV (characteristic of community MRSA), demonstrating the presence of these isolates within healthcare settings. The detection of SCC*mec* type II (prevalent in hospital setting) among three community isolates (2 C-MRSA and 1 Dog-MRSA) is a fact very worrisome, since in general the isolates that carry this type of chromosome cassette have resistance to several antimicrobials of clinical use (5), as well as may present greater virulence through Panton-Valentine Leucocidin (PVL) (16).

Molecular typing techniques have often been used in epidemiological studies of MRSA. PCR-based methods, as rep-PCR-RW3A, are quick and have considerable discriminatory power and may contribute in the local study of *S. aureus* (4, 17). A total of 60 different clusters were identified among the groups evaluated in the study. Five clusters presented isolates with high genetic variability of SCC*mec*, presenting up to three different SCC*mec* types. This type of dissemination has been also observed by other authors (18, 19). It was verified a major cluster, with 15 community isolates, that there was human dissemination vs. dog, both in the same household and in the same VC, including between susceptible and resistant methicillin isolates (2 C-MRSA carrying SCC*mec* type II). Some authors have shown the dissemination of *S. aureus* among humans and domestic animals in the same household (20 – 22), however this transmission in VC has been poorly investigated. In the present study, five VC presented genetic similarity (C x Dog; C x C; Dog x Dog), inter or intrafamily, between *S. aureus* isolates (Table 1). We also highlight that in one clinic (PD), four human isolates (including MRSA) from different families (F63, F4 and F5) belonged to a single cluster and in two clinics (PR and ACM), it was verified the dissemination of *S. aureus* in humans and dogs from different families. Thus, the fact that *S. aureus* can be transmitted between human and dogs, independent of belonging to the same family or VC, suggest that VC may play an important role in the dissemination of *S. aureus*, including MRSA, which should be better evaluated in future studies.

Although it has been already demonstrated in the literature the clonal dissemination of *S. aureus* in hospital setting or between dogs and their owners, to the best of our knowledge, this is the first study that demonstrated the local dissemination of *S. aureus* between healthy dogs, their owners and hospitalized patients. It was observed six cluster that presented both hospital and community isolates, including Dog-SA (7 Dog-MSSA e 1 Dog-MRSA) (Figure 1). The finding of MRSA nasal carrier from dogs alerts us to the fact that domestic animals may be a risk, mainly when they carry antimicrobial-resistant bacteria of clinical relevance, as MRSA, favoring its transmission to individuals and vice versa, both community and hospital settings.

## 5. CONCLUSION

The data obtained allow us conclude that in our environment *S. aureus* isolates, both hospital and community, presented a great genetic variability. The data revealed unprecedented dissemination of MRSA among hospital and dog, alerting us to the fact that companion animals may be reservoirs of resistant hospital strains, as MRSA, favoring its dissemination in the community, including household and VC, and also in the hospital setting.

## FUNDING

CAPES e CNPq

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the collaborators of the Medical Microbiology Laboratory of the State University of Maringá.

## REFERENCES

1. Loeffler A, Lloyd DH. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? *Epidemiol Infect.* 2010;138:595-605. doi:10.1017/S0950268809991476.
2. Sabbagh P, Ebrahimzadeh-Namvar A, Ferdosi-Shahandashti E, Javanian M, Khafri S, Rajabnia M. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated among hospital staff nasal carriers of Babol, Iran. *Caspian J Intern Med.* 2017;8:311-6.
3. Prates KA, Torres AM, Garcia LB, Ogatta SF, Cardoso CL, Tognim MC. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in university students. *Braz J Infect Dis.* 2010;14:316-8.
4. Lakhundi S, Zhanga K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31(4):pii:e00020-18. doi:10.1128/CMR.00020-18.
5. Liu J, Chen D, Peters BM, Li L, Li B, Xu Z, et al. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog.* 2016;101:56-67.
6. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, Larsen J, Larsen AR, Stegger M. Novel SCC*mec* type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 2018;61, 74-6.
7. Davis JA, Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Brousse JH, Gustafson J, et al. Carriage of methicillin-resistant staphylococci by healthy companion animals in the US. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(1):1-8.
8. Tang YT, Cao R, Xiao N, Li ZS, Wang R, Zou JM, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Xiangyang, China. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;12:31-6.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition. CLSI Document M07-A10; 2015.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th informational supplement. CLSI Document M100-S29; 2019.
11. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem.Bull.* 1987;19:11-5.
12. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:765-9.
13. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2864-7.
14. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* type I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5026-33.
15. Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, McCleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2141-4.
16. Chamon RC, Ribeiro SD, da Costa TM, Nouér SA, Dos Santos KR. Complete substitution of the Brazilian endemic clone by other methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages in two public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2017;21:185-9.
17. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: Current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis.* 2003;7:32-43.
18. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol.* 2016;16:115.



19. de Oliveira CF, Morey AT, Santos JP, Gomes LV, Cardoso JD, Pinge-Filho P, et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9:743-51.
20. Zuma AVP, Lima DF, Assef APDC, Marques EA, Leão RS. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood in Rio de Janeiro displaying susceptibility profiles to non- $\beta$ -lactam antibiotics. *Braz J Microbiol*. 2017;48:237-41.
21. Cefai C, Ashurst S, Owens C. Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. *Lancet*. 1994;344:539-40.
22. van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:2235-7.
23. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Zarazaga M. High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;36:83-94.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; dissemination.

## SEQUENCIAMENTO TOTAL DO GENOMA DE UM ISOLADO DE *Raoultella planticola* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS

Paulo Victor Batista Marini<sup>1</sup>; Cíntia Werner Motter<sup>1</sup>; Eliandro Reis Tavares<sup>2</sup>, Fabrícia Gimenes<sup>3</sup>, Cecília Saori Mitsugui<sup>4</sup>, Sueli Fumie Yamada Ogatta<sup>2</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Docente, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Bioquímica, Hospital Universitário de Maringá, Maringá, PR

e-mail: pvbmarini@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Raoultella planticola* é uma enterobactéria que nos últimos anos tem sido encontrada no ambiente hospitalar e pode causar infecções em pacientes debilitados (1-4). Uma das principais características dos isolados hospitalares de *R. planticola* é a presença de genes que conferem resistência aos antimicrobianos usados na prática clínica, como os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (1, 4-11).

Inicialmente *R. planticola* foi classificada como *Klebsiella planticola* e era considerado um microrganismo tipicamente isolado do ambiente (12), no entanto, estudos filogenéticos recentes com diversas espécies do gênero *Klebsiella* mostraram que este microrganismo possuía características distintas entre si, formando um grupo autônomo que deu origem ao gênero *Raoultella* (13). Pouco tempo depois, *R. planticola* começou a ser recuperada de infecções em pacientes internados em unidades de tratamento ao redor do mundo (1-5, 8, 9, 14).

Por ainda ser um patógeno sem grande importância clínica são raros os artigos que analisem o genoma de *R. planticola* na íntegra (15). Em outros organismos o sequenciamento do genoma total vem se mostrando como uma eficiente ferramenta de elucidação dos processos de regulação gênica para as enzimas que neutralizam a ação dos antibióticos (16, 17).

Esta metodologia consiste na comparação do genoma sequenciado com bancos de dados que contenham um arsenal gênico para a espécie em questão e outras filogeneticamente relacionadas, geralmente disponíveis em *sites* de uso aberto. A partir desta comparação podem se identificar os genes presentes no microrganismo, sejam eles estruturais ou relacionados aos mecanismos de resistência e virulência, por exemplo.

Graças ao fácil acesso a estes dados por pesquisadores de todo o mundo é possível analisar a evolução, dispersão e epidemiologia de espécies bacterianas ao longo dos anos em diversos lugares ao redor do planeta. Estes bancos de dados devem ser constantemente atualizados e realimentados com novas informações e metodologias (16-18).

Nos últimos anos o Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (LMM-UEM) vem monitorando os microrganismos recuperados no Hospital Universitário de Maringá (HUM) que contenham os genes para carbapenemases dos tipos *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) e *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase* (NDM).

Até o início do ano de 2017 não havia sido detectada nenhuma bactéria carregando ambos os genes de KPC e NDM, no entanto, em março deste mesmo ano (2017), foi detectada pela primeira vez um isolado, em *swab* de vigilância, pertencente à espécie *R. planticola* contendo esses dois genes. Posteriormente, em setembro de 2017, outro isolado da mesma espécie, clonalmente relacionado ao primeiro, foi recuperado em outro paciente, também de *swab* de vigilância.

Sendo assim objetivamos sequenciar o genoma de um destes isolado de *R. planticola* resistente aos carbapenêmicos para que tais informações possam auxiliar no controle deste microrganismo, até então negligenciado, favorecendo uma disseminação silenciosa dos genes de resistência e tornando-se um verdadeiro desafio no ambiente hospitalar.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1. Manutenção do isolado e obtenção do DNA

Os isolados recuperados pelo Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (LMM-UEM) foram mantidos em freezer a -4 °C em microtubos contendo caldo tripton de soja com

30% de glicerol. O isolado foi reativado em ágar triptona de soja, incubado por 24 h a 37 °C e então repicado novamente sob as mesmas condições. As bactérias foram recuperadas e utilizadas para obtenção do DNA genômico total. O DNA total foi isolado com o kit *DNeasy blood and tissue kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

## 2.2. Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

O DNA total purificado foi avaliado quanto à sua concentração e integridade e submetido ao sequenciamento. O genoma foi sequenciado em plataforma *MiSeq* (Illumina Inc, EUA) usando *MiSeq reagent Kit v3* [300x2 (Illumina Inc, EUA)] em estratégia *paired-end*. O sequenciamento foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, Londrina, Paraná. Após o sequenciamento, as *reads* foram avaliadas e o genoma montado utilizando o *software CLC Genomics Workbench v12.0* (Qiagen Bioinformatics, Alemanha). Foram consideradas as *reads* com *Phred Quality Score* (Q) maior que 20.

## 2.3. Identificação dos plasmídeos e genes que codificam para mecanismos de resistências

Os *contigs* obtidos na etapa anterior foram submetidos para análise de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos e identificação daqueles *contigs* correspondentes à plasmídeos. Para isso, as sequências foram submetidas e avaliadas no banco de dados *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (disponível no site <http://www.genomicepidemiology.org/>), utilizando as ferramentas *ResFinder* v3.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (19) e *PlasmidFinder* v2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (20).

## 2.4. Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado em 31/05/2017 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COPEP)/PARECER nº: 2.093.342/ CAAE 63610816.0.0000.0104.

## 3. RESULTADOS

De acordo com o *software CLC Genomics Workbench* o produto do sequenciamento continha 6.277.903 pares de base (pb) organizados em 427 *contigs*, com no mínimo 200 pb cada e tamanho médio de 14.702,3 pb. Apresentando também 55% de CG e valores para N<sub>50</sub> e L<sub>50</sub> de 158.449 e 10, respectivamente.

A plataforma *ResFinder* localizou um total de 24 genes de resistência (Tabela 1) pertencentes a 9 categorias distintas de antimicrobianos: aminoglicosídeos, β-lactâmicos, fluoroquinolonas, fosfomicina, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina sulfonamida e trimetoprim. Destes genes apenas 13 puderam ser associados ao perfil de sensibilidade fenotípico demonstrado pelo isolado no método automatizado do *BD Phoenix* (BD, EUA) utilizado na rotina da instituição, e consta na Tabela 2.

**Tabela 1. Genes de resistência de acordo com as classes de antimicrobianos identificados pela plataforma ResFinder.**

Classes de Antimicrobianos	Genes de resistência [ <i>contig</i> ]
Aminoglicosídeos	<i>aac(6)-Ib-cr</i> [117] , <i>aac(3)-IIa</i> [88] , <i>aadA2</i> [90] , <i>aadA1</i> [14] , <i>aph(6)-Id</i> [69] , <i>aph(3)-Ib</i> [69]
β-lactâmicos	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> [63] , <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> [35] , <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> [36] , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> [117] , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i> [29] , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> [90]
Fluoroquinolonas	<i>aac(6)-Ib-cr</i> [117] , <i>qnrB1</i> [83]
Fosfomicina	<i>fosA</i> [8]
Macrolídeos	<i>mph(A)</i> [101]
Fenicol	<i>cmIA1</i> [90] , <i>catB3</i> [117] , <i>catA1</i> [98]
Sulfonamida	<i>sul2</i> [69] , <i>sul1</i> [90]
Tetraciclina	<i>tet(A)</i> [96] , <i>tet(C)</i> [55]
Trimetoprim	<i>dfrA14</i> [89] , <i>dfrA15</i> [90]

Enquanto que o *PlasmidFinder* (threshold = 95%; comprimento mínimo = 60%) encontrou dois plasmídeos de enterobactérias: Col440I e IncQ1 respectivamente nos *contigs* 21 e 86. E nenhum destes plasmídeos ou *contigs* continha qualquer um dos genes de resistência identificados pelo *ResFinder*.

Os únicos contigs que possuíam mais de um gene de resistência foram 69 (2.372 pb); com os genes *aph(6)-Ib*, *aph(3)-Ib* e *sul2*; 90 (9.214 pb); com os genes *aadA2*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *cmiA1*, *sul1* e *dfrA15*; e 117 (2.223 pb); com os genes *aac(6)-Ib-cr*, *bla<sub>OXA-1</sub>* e *catB3*.

**Tabela 2. Perfil de sensibilidade do isolado de *R. planticola* e supostos genes associados à resistência.**

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)	Interpretação*	Supostos genes associados à resistência
Amicacina	≤8	S	<i>aac(6)-Ib-cr</i>
Amoxicilina-Clavulanato	>16/8	R	<i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>
Ampicilina	>16	R	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Cefepime	>16	R	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Cefoxitina	>16	R	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i> , <i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Ceftriaxona	>32	R	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Cefuroxima	>16	R	<i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Ciprofloxacino	>2	R	<i>qnrB1</i>
Colistina	≤1	S	-
Ertapenem	>4	R	<i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Gentamicina	>8	R	<i>aac(3)-IIa</i>
Imipenem	>8	R	<i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Levofloxacino	2	R	<i>qnrB1</i>
Meropenem	8	R	<i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Piperaciclina-Tazobactam	>64/4	R	<i>bla<sub>KPC-1</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> , <i>bla<sub>PLA-2a</sub></i>
Trimetoprim-Sulfametoxazol	>4/76	R	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA15</i>

CIM: Concentração Inibitória Mínima; S: sensível; R: resistente; \* A interpretação é feita com base no *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* (21); (-) ausência de genes associados à resistência.

#### 4. DISCUSSÃO

Dos 24 genes encontrados pela plataforma do *ResFinder* (Tabela 1) conseguimos associar 13 ao perfil de resistência apresentado pelo isolado (Tabela 2) e os demais ainda não foram fenotipicamente testados. De acordo com as informações disponíveis no *GenBank* (22), sobre os plasmídeos apontados pelo *PlasmidFinder*, Col440I apresenta genes associados a atividade promotora e *IncQ1*, que é um plasmídeo usualmente associado a atividade de incompatibilidade plasmidial que também continha alguns genes de mobilização bem como para resistência, sendo os do último não compatíveis com nenhum dos genes encontrados pelo *ResFinder* (22), nos indicando que ainda podem haver mais genes de resistência no genoma deste isolado de *R. planticola* que inclusive podem ser mobilizados.

Embora tenha sido encontrado o gene *aac(6)-Ib-cr*, que deveria conferir resistência a amicacina, este fenótipo de resistência não foi expresso. Este fato pode ocorrer caso a expressão de algum gene, como por exemplo este que confere resistência a amicacina, dependa da presença de promotores adequados à sua expressão. Estes promotores são sequências do DNA que atuam como ativadores da expressão de um determinado gene sob uma circunstância específica (como a presença de um determinado composto ou condições ambientais). Sendo que eles podem se apresentar dentro de uma sequência de inserção ou apenas próximo ao gene em um sistema de óperon (23-25). Outro fator, geralmente menos retratado, envolve o silenciamento gênico via epistasia, no qual o gene pode estar inativo em uma geração, mas hábil a ser reativado e expresso futuramente na mesma ou em outras gerações (24, 26).

Considerando os achados deste estudo em relação à *R. planticola* destacamos que ainda não tem sido dada a devida atenção a este microrganismo, uma vez que o mesmo não tem sido associado a muitos casos de óbitos, ou mesmo casos graves de infecções (14, 15). Lembramos, no entanto, que *R. planticola* é uma enterobactéria com resistência aos carbapenêmicos e portanto encontra-se entre os microrganismos da lista crítica de prioridade no desenvolvimento de novos antimicrobianos da Organização Mundial da



Saúde (27). Sendo assim, a simples presença deste microrganismo no ambiente hospitalar pode contribuir para disseminação de um grande número de genes de resistência não só nestes ambientes como fora deles. Outros isolados de *R. planticola* com genes semelhantes têm sido reportados ao redor do mundo, principalmente no que diz respeito aos genes de carbapenemases dos tipos KPC (4, 5, 10, 11) ou NDM (7, 9), mas em nosso caso, de maneira inédita, encontramos um isolado que demonstra possuir concomitantemente os genes de carbapenemases dos tipos serino (KPC) e metalo (NDM) carbapenemase. Além destes importantes genes, já foram descritos isolados contendo outros tipos de genes que conferem resistência a classes de antimicrobianos como os aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas (5, 8, 15, 7).

Tudo isto nos leva a reforçar o alerta de que este microrganismo pode estar atuando como um dispersor de genes de resistência, uma vez que bactérias, em especial as Gram-negativas, possuem alta capacidade de realizar processos de recombinação genética, disseminando genes, principalmente de resistência, entre si, seja de forma plasmidial, como acontece com a maioria dos genes da classe das beta-lactamases, bem como por transformação, que podem ser um grande contribuinte desta dispersão por levar genes inclusive a bactérias Gram-positivas que estejam no mesmo ambiente. Neste contexto a presença de elementos móveis, tais como transposons e integrons, os quais também já foram relacionados ao compartilhamento de  $\beta$ -lactamases, são de grande importância (7, 11, 24, 28-30).

Nosso estudo ainda não se encontra finalizado, sendo assim algumas lacunas ainda devem ser preenchidas, como é o caso dos genes encontrados nos plasmídeos apontados anteriormente. Outro ponto a se observar é de que a metodologia de sequenciamento por síntese, utilizada neste trabalho, infelizmente não nos dá, por si só, um genoma organizado, isto é, não nos indica quais *contigs* constituem o cromossomo e/ou os plasmídeos da espécie bacteriana sequenciada, o que acaba por restringir nossas observações a respeito da organização genômica do microrganismo.

A continuidade destas análises, incluindo outras plataformas e programas, assim como maiores estudos que investiguem o contexto genético, particularmente dos genes de resistência, são de extrema importância para o melhor conhecimento deste importante microrganismo e assim possibilitar o seu controle.

## 5. CONCLUSÃO

Os dados até então analisados nos indicam que *R. planticola* se apresenta ao menos com um reservatório de genes de resistência que poderiam ser compartilhados com outros microrganismos. Isto pode ter consequências desastrosas principalmente no ambiente hospitalar e demais unidades de tratamento.

## FINANCIADORES

PROAP, CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos professores, alunos e técnicas do Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá e do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, bem como os membros do Laboratório de Biotecnologia de Soja da EMBRAPA Soja de Londrina.

## REFERÊNCIAS

1. Alves M, Riley L, Moreira B. A case of severe pancreatitis complicated by *Raoultella planticola* infection. J Med Microbiol. 2007;56(5):696-8. doi: 10.1099/jmm.0.46889-0.
2. Wolcott R, Dowd S. Molecular diagnosis of *Raoultella planticola* infection of a surgical site. J Wound Care. 2010;19(8):329-32. doi: 10.12968/jowc.2010.19.8.77710.
3. Chun S, Yun J, Huh H, Lee N. Low virulence? Clinical characteristics of *Raoultella planticola* bacteremia. Infection. 2014;42(5):899-904. doi: 10.1007/s15010-014-0664-7.
4. Xu M, Xie W, Fu Y, Zhou H, Zhou J. Nosocomial pneumonia caused by carbapenem-resistant *Raoultella planticola*: A case report and literature review. Infection. 2015;43(2):245-8. doi: 10.1007/s15010-015-0722-9.
5. Castanheira M, Deshpande L, DiPersio J, Kang J, Weinstein M, Jones R. First Descriptions of *bla*<sub>KPC</sub> in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol. 2009;47(12):4129-30. doi: 10.1128/jcm.01502-09.
6. Zurfluh K, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. Appl Environ Microbiol. 2013;79(9):3021-6. doi: 10.1128/aem.00054-13.

7. Chen D, Tang H, Wu A, Song J, Yang L, Lin Y. Extensively drug-resistant *Raoultella planticola* carrying multiple resistance genes including *bla*<sub>NDM-1</sub>. JMM Case Rep. 2014;1(3). doi: 10.1099/jmmcr0.000265.
8. Demiray T, Koroglu M, Ozbek A, Altindis M. A rare cause of infection, *Raoultella planticola*: Emerging threat and new reservoir for carbapenem resistance. Infection. 2016;44(6):713-7. doi: 10.1007/s15010-016-0900-4.
9. Pan Z, Liu R, Zhang P, Zhou H, Fu Y, Zhou J. Combination of tigecycline and levofloxacin for successful treatment of nosocomial pneumonia caused by New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Raoultella planticola*. Microbial Drug Resistance. 2017;23(1):127-31. doi: 10.1089/mdr.2015.0346.
10. Gonzales Zamora J, Corzo-Pedroza M, Romero Alvarez M, Martinez O. Carbapenemase-producing *Raoultella Planticola*: A rare cause of pneumonia and bacteremia. Diseases. 2018;6(4):94. doi: 10.3390/diseases6040094.
11. Park S, Wailan A, Barry K, Vegesana K, Carroll J, Mathers A, et al. Managing all the genotypic knowledge: Approach to a septic patient colonized by different *Enterobacteriales* with unique carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(8). doi: 10.1128/aac.00029-19.
12. Bagley S, Seidler R, Brenner D. *Klebsiella planticola* sp. nov.: A new species of enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments. Curr Microbiol. 1981;6(2):105-9. doi: 10.1007/bf01569013.
13. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(3):925-32. doi: 10.1099/00207713-51-3-925.
14. Sękowska A. *Raoultella* spp.—clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. Folia Microbiol. 2017;62(3):221-7. doi: 10.1007/s12223-016-0490-7.
15. Huang Y, Chuang W, Ho B, Wu Z, Kuo R, Ko M, et al. Comparative genomics reveals diverse capsular polysaccharide synthesis gene clusters in emerging *Raoultella planticola*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(10). doi: 10.1590/0074-02760180192.
16. Bennedsen M, Stuer-Lauridsen B, Danielsen M, Johansen E. Screening for antimicrobial resistance genes and virulence factors via genome sequencing. Appl Environ Microbiol. 2011;77(8):2785-7. doi: 10.1128/AEM.02493-10.
17. Köser C, Ellington M, Cartwright E, Gillespie S, Brown N, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. PLoS Pathog. 2012;8(8):e1002824. doi: 10.1371/journal.ppat.1002824.
18. Bentley DR. Whole-genome re-sequencing. Curr Opin Genet Dev. 2006;16(6):545-52. doi: 10.1016/j.gde.2006.10.009.
19. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2640-4. doi: 10.1093/jac/dks261.
20. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):3895-3903. doi: 10.1128/aac.02412-14.
21. CLSI. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
22. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. GenBank Overview; 2019 [Acesso em 8 Ago 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
23. Díaz E, Prieto M. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. Curr Opin Biotechnol. 2000;11(5):467-75. doi: 10.1016/s0958-1669(00)00126-9.
24. Padilla G, da Costa S. Genética Bacteriana. Dans: Trabulsi L, Alterthum F, editores. Microbiologia. 6th éd. São Paulo: Atheneu; 2015. p. 37-50.
25. Cooke K, Browning D, Lee D, Blair J, McNeill H, Huber D, et al. Position effects on promoter activity in *Escherichia coli* and their consequences for antibiotic-resistance determinants. Biochem Soc Trans 2019;47(3):839-45. doi: 10.1042/bst20180503.
26. Levin-Reisman I, Brauner A, Ronin I, Balaban N. Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(29):14734-9. doi: 10.1073/pnas.1906169116.
27. World Health Organization [Internet]. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics; 2019 [Acesso em 6 Ago 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
28. Patel J, Richter S. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. Dans: Jorgensen J, Pfaller M,

- editores. Manual of clinical microbiology. 11th éd. Washington, USA: ASM Press; 2019. p. 1212-35.
29. Arora G, Sajid A, Kalia V. Drug resistance in bacteria, fungi, malaria, and cancer. Cham, Suíça: Springer Nature; 2017.
  30. Barry K, Wailan A, Sheppard A, Crook D, Vegesana K, Stoesser N, et al. Don't overlook the little guy: An evaluation of the frequency of small plasmids co-conjugating with larger carbapenemase gene containing plasmids. *Plasmid*. 2019;103:1-8. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.03.005.

**Palavras-chave:** *Raoultella planticola*; sequenciamento genômico; resistência a antimicrobianos.

## DETECÇÃO DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE ACADÊMICOS E PACIENTES ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Pedro Marquetti Pereira<sup>1</sup>; Pâmela Cristina Durante<sup>2</sup>; Luiza Camila da Silva<sup>3</sup>; Hugo Tokunaga Zerbinati<sup>4</sup>; Mônica de Souza Ferreira de Mattos<sup>4</sup>; Sheila Alexandra Belini Nishiyama<sup>5</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Odontologia, Uningá Centro Universitário, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

<sup>4</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: marquettipedro@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* resistente a metilina (oxacilina) do inglês *methicillin resistant S. aureus* (MRSA) é um dos principais causadores de infecções hospitalares (HA-MRSA) e comunitárias (CA-MRSA), associado a altas taxas de morbidade, mortalidade e elevado custo de tratamento (1,2). No Brasil, *S. aureus* é o principal agente etiológico de septicemias em unidades de terapia intensiva adultas, sendo responsável por 14,1% dos casos notificados, e destes 63,1% identificados como MRSA (3).

Sabe-se que 20-30% da população tem suas narinas colonizadas por *S. aureus*, podendo também estar presente em outros sítios como cavidade bucal, orofaringe e pele (4). A colonização por MRSA também já tem sido demonstrada e, embora com baixos índices, a mesma já está presente na comunidade (5).

A resistência à metilina se dá pela presença do gene *mecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina (*penicillin-binding protein 2a* – PBP2' ou PBP2a) que possui baixa afinidade de ligação aos betalactâmicos, conferindo resistência a fármacos como a metilina/oxacilina, assim como aos demais betalactâmicos (6). Este gene é carregado no cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*Staphylococcal cassette chromosome mec* – SCC*mec*), com mais de 10 tipos de SCC*mec* já caracterizados, embora ainda existam SCC*mec* não tipáveis, demonstrando grande variabilidade genética (7).

Entre os HA-MRSA e CA-MRSA, observam-se características distintas em padrões fenotípicos e moleculares (8); HA-MRSA geralmente apresentam resistência a mais classes de antimicrobianos e são portadores de SCC*mec* dos tipos I-III; CA-MRSA possuem menor espectro de resistência aos antimicrobianos, apresentando SCC*mec* dos tipos IV e V e podem ainda ser produtores da leucocidina de Panton-Valentine (PVL), capacidade adquirida por bactérias infectadas pelo bacteriófago *phiSLT*, que codifica uma citotoxina capaz de lisar leucócitos e causar necrose tecidual, acarretando em infecções mais agressivas, com pior prognóstico (9).

Existem ainda, *S. aureus mecA* positivos oxacilina sensíveis, menos conhecidos, esses isolados são portadores do gene *mecA*, contudo, por motivos ainda não elucidados, apresentam-se como sensíveis à metilina em testes fenotípicos. Originalmente relatados em 2002 por Petinaki et al. (10), apenas em 2007 foram designados como *oxacillin susceptible*–MRSA (OS-MRSA) para denominar *S. aureus* com esse perfil de suscetibilidade discordante da sua genética (11). OS-MRSA nos últimos anos vem sendo descritos em infecções em vários continentes (10-13). No Brasil, já foram relatados isolados OS-MRSA causando infecções hospitalares (13) e mastites em gado leiteiro (14). Porém, do nosso conhecimento, são inexistentes estudos sobre a possível presença de indivíduos portadores assintomáticos de OS-MRSA na população.

Considerando a falta de estudos sobre colonização de indivíduos da comunidade por MRSA no Brasil, as dificuldades inerentes no tratamento de infecções causadas por esse microrganismo e o potencial reservatório comunitário de OS-MRSA, capaz de acarretar dificuldades no tratamento dessas infecções, visto a falsa sensibilidade aos betalactâmicos demonstrada nos testes de suscetibilidade, este estudo tem como objetivos pesquisar a prevalência de CA-MRSA e OS-MRSA na comunidade, assim como caracterizar fenotipicamente o perfil de suscetibilidade e determinar molecularmente o perfil genotípico dos isolados MRSA.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS



## 2.1. Indivíduos

Foram selecionados 150 indivíduos, 75 pacientes atendidos na Clínica Odontológica da UNINGÁ - Centro Universitário - PR, Brasil e 75 acadêmicos do curso de Odontologia da mesma instituição, sem distinção de sexo ou raça entre os participantes. Todos os indivíduos envolvidos no projeto foram informados do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido - TCLE, aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa – UNINGÁ (CAAE 66067317.0.0000.5220) pelo parecer 2.387.426/2017. Foi aplicado também um questionário sobre fatores predisponentes para colonização por MRSA. Foram excluídos deste estudo tabagistas, grávidas, menores de 18 anos, indivíduos que tenham feito uso de drogas antimicrobianas três meses antes das respectivas coletas e com histórico de internação em hospitais nos últimos 30 dias por mais de 48 horas ou em unidades de terapia intensiva nos últimos 6 meses.

## 2.2. Coleta das amostras, isolamento e identificação

Foram coletados *swabs* pareados, nasais e bucais, tanto dos acadêmicos quanto dos pacientes. Os *swabs* nasais foram umedecidos com salina estéril, introduzidos no vestíbulo nasal e friccionados em ambas as narinas com 3 movimentos circulares. Os *swabs* bucais foram friccionados contra a mucosa jugal, em ambos os lados do fundo de vestíbulo bucal (15). Todos os *swabs* foram transportados em meio Copan Amies sem carvão (Copan Diagnostics®, Brescia, Itália) e enviadas ao Laboratório de Microbiologia Médica – Universidade Estadual de Maringá (LMM-UEM).

Os *swabs* das coletas, num intervalo máximo de 24 h, foram semeados em caldo Tripcaseína de Soja - TSB (Difco, Sparks, Maryland, EUA) acrescido de 7,5% de NaCl e incubados a 35°C por 24-48 h. Uma alíquota dos mesmos foi semeada em meio ágar Manitol Salgado (Difco, Sparks, Maryland, EUA) e incubada a 35°C por 24-48 h (15). Após incubação, as colônias fermentadoras de manitol foram selecionadas para a identificação fenotípica, coloração de Gram, provas de catalase e coagulase (16).

## 2.3. Testes de sensibilidade

### 2.3.1. Determinação da susceptibilidade por disco difusão

Foi determinado o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos: cefoxitina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), por disco difusão conforme recomendação do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (17,18). Para determinação de baixa resistência a mupirocina (5 µg) foram seguidos os critérios interpretativos propostos por Fuchs et al. (1990) (19).

### 2.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por Etest®/MICE®

Foi determinada a CIM para penicilina-MICE®, tigeclina-MICE®, linezolida-Etest® e vancomicina-Etest®, de acordo com o CLSI (17,18).

### 2.3.3. Determinação da CIM para oxacilina por ágar diluição

Foi determinada a CIM para oxacilina de acordo com o CLSI (17,18).

## 2.4. Testes moleculares

### 2.4.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico bacteriano foi feita com *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (CTAB), conforme proposto por Doyle e Doyle (1987) (20).

### 2.4.2. Detecção do gene *nuc* de *S. aureus* para confirmação de espécie

A detecção do gene *nuc* para confirmação da espécie dos isolados foi realizada conforme proposto por Sasaki (2010) (21).

### 2.4.3. Detecção do gene *mecA*

A detecção do gene *mecA* foi realizada conforme proposto por Vannuffel (1995) (22).

### 2.4.4. Detecção e tipagem do SCC*mec*

Foi realizada detecção e tipagem do tipo SCC*mec* para todos os isolados portadores do gene *mecA*, como proposto por Zhang (2005) (23).

### 2.4.5. Detecção do gene codificador de Leucocidina de Panton Valentine (PVL)

A detecção do gene codificador de PVL foi realizada como proposto por Lina et al. (1999) (24).

## 3. RESULTADOS

Foram coletados 300 *swabs* pareados (nasais e bucais) de 75 pacientes, com idades entre 18-67 anos, sendo 61,3% (46/75) mulheres; e de 75 acadêmicos, com idades entre 18-47 anos, sendo 69,3% (52/75) mulheres. Dos *swabs* nasais coletados (n=150) de pacientes e acadêmicos, todos apresentaram crescimento visível após 24-48h. Dos *swabs* bucais, 134/150 apresentaram crescimento após 48 h de incubação. Do total de 284 amostras positivas semeadas em ágar manitol salgado, 115 apresentaram colônias fermentadoras de manitol. Dessas, 53,9% (62/115) foram identificadas como cocos Gram-positivos, catalase e coagulase positivas, das quais 61/62 foram confirmados molecularmente como *S. aureus* (27/61 isolados de pacientes

e 34/61 de acadêmicos). No total, o isolamento de *S. aureus* foi obtido em 32,6% (49/150) dos indivíduos, sendo 27/49 pacientes e 21/49 acadêmicos, encontrados somente em amostras nasais na maioria dos casos 47,5%, seguido da detecção em 41,0% em ambos os sítios e em 11,5% apenas no sítio bucal (Tabela 1).

**Tabela 1. Distribuição dos isolados *Staphylococcus aureus*, segundo o sítio de isolamento em indivíduos da comunidade**

Sítio de isolamento	GRUPOS n (%)		Total
	Pacientes	Acadêmicos	
Somente nasal	12 (19,7)	17 (27,9)	29 (47,5)
Somente bucal	2 (3,3)	5 (8,2)	7 (11,5)
Nasal e bucal	13 (21,3)	12 (19,6)	25 (41,0)
Total	27 (44,3)	34 (55,7)	61 (100)

O perfil de suscetibilidade por disco difusão demonstrou que todos os isolados foram sensíveis a rifampicina, tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol, gentamicina e mupirocina, apenas um isolado foi resistente a ciprofloxacino. Foram observados dois isolados resistentes à oxacilina/cefotina com discos de cefoxitina. Não foi detectado nenhum isolado OS-MRSA pelos testes fenotípicos e moleculares.

As CIMs para oxacilina determinadas por ágar diluição variaram entre 0,25 µg/mL e 32 µg/mL (CIM50 e CIM90: ambas 0,5 µg/mL). As CIMs dos isolados determinadas por Etest®/MICE®, foram: penicilina variou entre 0,12 µg/mL e ≥ 32 µg/mL (CIM50: 2 µg/mL; CIM90: 8 µg/mL); vancomicina variou entre 0,5 µg/mL e 1 µg/mL (CIM50 e CIM90: ambas 1 µg/mL); linezolid variou entre 0,5 µg/mL e 2 µg/mL (CIM50: 1 µg/mL; CIM90: 2 µg/mL); tigeciclina variou entre 0,016 µg/mL e 0,5 µg/mL (CIM50: 0,12 µg/mL; CIM90: 0,25 µg/mL) (Tabela 2). Os dois isolados MRSA (CIM: 4 e 32 µg/mL) que foram fenotipicamente resistentes à oxacilina foram confirmados molecularmente por PCR carreando o gene *mecA* e *SCCmec* do tipo IVa. Apenas um destes isolados apresentou a presença do gene codificador para PVL.

**Tabela 2. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de diferentes antibacterianos e porcentagem cumulativa dos isolados de *S. aureus* de indivíduos da comunidade**

<b>CIM</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>≥32</b>
<b>n (%)</b>	6 (9,68)	0 (0)	0 (0)	20 (43,5)	18 (72,6)	10 (88,7)	2 (91,9)	1 (93,5)	4 (100)
<b>CIM</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>
<b>n (%)</b>	0 (0)	21 (33,87)	35 (91,8)	3 (96,8)	0 (0)	1 (98,4)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<b>CIM</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>
<b>n (%)</b>	0 (0)	0 (0)	21 (33,9)	40 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>CIM</b>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>n (%)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3,2)	35 (59,7)	24 (100)	0 (0)	0 (0)
<b>CIM</b>	<b>0,016</b>	<b>0,032</b>	<b>0,064</b>	<b>0,12</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>n (%)</b>	1 (1,6)	0 (0)	5 (9,7)	28 (54,8)	26 (96,8)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

CIM: concentração inibitória mínima (µg/mL)

O primeiro isolado MRSA era do *swab* nasal de um acadêmico do sexo masculino de 33 anos de idade que, no momento da coleta, relatou não ter feito uso de antimicrobianos nos últimos quatro meses, assim como não ter sido submetido a procedimentos cirúrgicos ou internações nos últimos 12 meses. O segundo era do *swab* nasal de outro acadêmico de 25 anos de idade, que relatou não ter utilizado antimicrobianos nos últimos 12 meses e também não ter passado por procedimentos cirúrgicos ou internações nos últimos 12 meses.

#### 4. DISCUSSÃO

É reconhecida a participação do *S. aureus* na microbiota normal humana, comportando-se como colonizante superfície, como pele e mucosas. Todavia, esse microrganismo pode apresentar potencial patogênico e causar infecções e intoxicações. Trata-se de um importante patógeno hospitalar, particularmente os isolados resistentes à metilina, pois limitam o uso de betalactâmicos, drogas rotineiramente utilizadas para o controle de infecções causadas por esse microrganismo, acarretando em maior risco de complicações e insucesso do tratamento (25).

Entretanto, o isolamento de MRSA tem apresentado tendência de crescimento na comunidade. No Brasil, ainda são poucos os estudos que identificam a prevalência de CA-MRSA. Evangelista et al. (2015) (26) encontraram apenas 10 artigos relacionados ao tema, sem conseguir traçar assim o perfil desse microrganismo no país. Não temos conhecimento ainda de estudos sobre a frequência OS-MRSA na comunidade em nosso país.

Em nossos resultados a detecção mais alta de *S. aureus* em acadêmicos (37,3%) pode ser justificada pelo maior tempo de exposição no ambiente de trabalho, devido a contaminação aérea ocasionada pela produção de aerossóis, comum em procedimentos odontológicos realizados com a seringa tríplice, caneta de alta rotação, equipamentos de ultrassom para profilaxia dentária, entre outros. Assim, esses indivíduos podem abrigar microrganismos dos pacientes que atendem assim como o inverso também pode ser verdadeiro, aumentando o risco de sua disseminação na comunidade (27).

Nesse estudo obtivemos uma maior frequência de colonização nasal (28%) por *S. aureus* dos indivíduos envolvidos na pesquisa, detecção semelhante relatada por Zanelli et al. (2002) de 30,5% (28). Entretanto, nossos resultados também demonstraram a importância da cavidade bucal como um potencial reservatório de *S. aureus*, uma vez que 13,3% dos indivíduos eram carreadores desse microrganismo na cavidade bucal, frequência semelhante ao relatado por Koukos et al. (2015) (29), os quais detectaram *S. aureus* por PCR em 10% da sua população estudada.

Não é incomum que esse microrganismo seja isolado de ambos os sítios do mesmo indivíduo (30-31), devido à proximidade e a comunicação entre os sítios e da capacidade de aderência do *S. aureus* à mucosa. É importante salientar que em nosso estudo as coletas pareadas aumentaram a sensibilidade de detecção de *S. aureus*, pois sete isolados foram provenientes apenas do sítio bucal, o que representa um aumento no isolamento de *S. aureus* ao incluir esse sítio na pesquisa. Ainda são raros os casos reportados de isolados MRSA da cavidade bucal na comunidade (27). Embora não tenha sido detectado nenhum MRSA em nosso estudo na cavidade bucal, esse sítio pode ser um importante reservatório para CA-MRSA

Os dois MRSA detectados em acadêmicos foram caracterizados como portadores de *mecA* e *SCCmec IVa*, com apenas um destes sendo portador do gene codificador para PVL. Esses resultados são condizentes à literatura que comumente associa CA-MRSA com *SCCmec* do tipo IV ou V, que podem adicionalmente apresentar o gene PVL. Segundo a literatura por apresentarem um cassete cromossômico menor em comparação aos outros tipos circulantes de *SCCmec*, esses isolados podem demonstrar menor perfil de resistência aos antimicrobianos, porém quando associados a produção de PVL podem causar infecções mais graves, devido ao perfil mais virulento (32). O fato de não termos encontrado isolados OS-MRSA neste estudo não elimina a possibilidade deste microrganismo já estar presente na comunidade, mas em baixa incidência, assim o grupo amostral pode não ter sido suficientemente robusto para sua detecção. Desta forma, mais estudos epidemiológicos são necessários para investigar a possível disseminação silenciosa desse microrganismo na comunidade.

Neste estudo observamos 57,4% dos isolados com resistência para clindamicina e eritromicina, mantendo-se sensíveis aos demais antimicrobianos testados, fato importante considerando que estes são antimicrobianos de primeira escolha nesses casos. Apesar da baixa frequência de CA-MRSA (1,3%) observada no nosso estudo, inferior ao trabalho de Meneggoto e Picolé (2007) (33) que detectaram 7,5% de CA-MRSA no país, é crescente a presença de MRSA na comunidade. E visto que a resistência aos antimicrobianos tem sido amplamente discutida no ambiente hospitalar devido a detecção cada vez mais frequente de isolados resistentes, a presença desses microrganismos na comunidade torna o quadro ainda mais complexo, pois dificulta seu controle e facilita sua disseminação.

## 5. CONCLUSÃO

O sítio nasal se manteve como local de maior sensibilidade para detecção de *S. aureus*, em especial os MRSA. Todavia a cavidade bucal se apresentou como um potencial reservatório desse microrganismo na comunidade e a coleta pareada dos dois sítios aumenta a sua sensibilidade de detecção.

A presença de MRSA na comunidade deve ser monitorada, devido ao aumento de detecção de isolados resistentes fora do ambiente hospitalar. Embora nenhum OS-MRSA tenha sido detectado nesse estudo nossos resultados não nos permite excluir sua presença na comunidade, onde o controle da disseminação de resistência é ainda mais complexo e preocupante.

## FINANCIADORES

PROAP-CAPES.

## REFERÊNCIAS

1. Allegranzi B, Bagheri Nejad S, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, . Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;377(9761):228-41.
2. Raineri E, Crema L, De Silvestri A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in an intensive care unit: a 10-year analysis. *J Hosp Infect*. 2007;67(4):308-15.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde

- (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2016 [internet]; 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/boletins-estatisticos>.
4. Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J Bacteriol*. 2001;183(24):7260-72.
  5. Pires FV, da Cunha MLRS, Abraão LM, Martins PY, Camargo CH, Fortaleza CM. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A population-based survey. *PLoS One*. 2014;9(3):e92537.
  6. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(4):273–82.
  7. Castellano-Gonzalez MJ, Perozo-Mena AJ, Vivas-Vega RL, Ginestre-Perez MM, Rincon-Villalobos GC. Molecular and phenotypical typification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in a university hospital. *Rev Chilena Infectol*. 2009;26(1):39-48.
  8. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):616-87.
  9. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantón–Valentine leukocidin. *Lab. Invest*. 2007;87:3-9.
  10. Petinaki E, Kontos F, Maniatis AN. Emergence of two oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clones in a Greek hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(6):1090-1.
  11. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, et al. Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus*: A new type of MRSA. *J Infect Chemother*. 2007;13(2):79-86.
  12. Kong LY, Jean A, Wong H, Semret M, Frenette C, Simor AE, et al. Bacteremia caused by a mecA-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain with inducible resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(4):377-8.
  13. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: High prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):115.
  14. Guimarães FF, Manzi MP, Joaquim SF, Richini-Pereira VB, Langoni H. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. *J Dairy Sci*. 2017;100(1):726-30.
  15. Cookson B, Peters B, Webster M, Phillips I, Rahman M, Noble W. Staff carriage of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1989 Jul;27(7):1471-6.
  16. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Junior WC. Diagnóstico microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2001.
  17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07-A10; Approved Standard. 10th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
  18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S28; 28th informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
  19. Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(3):608–9.
  20. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987;19(1):11-5.
  21. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2010;48(3):765–9.
  22. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33(11):2864-67.
  23. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5026-33.
  24. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of panton-valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1128-32.
  25. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-61.
  26. Evangelista SS, Oliveira AD. *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. *Rev Bras Enferm*. 2015;68(1):136-43.



27. Vellappally S, Divakar DD, Kheraif AA, Ramakrishnaiah R, Alqahtani A, Dalati MHN, et al. Occurrence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of patients with dental caries. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2017;64(3):343–51.
28. Zanelli G, Sansoni A, Zanchi A, Cresti S, Pollini S, Rossolini GM, et al. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community: A survey from central Italy. *Epidemiol Infect*. 2002;129(2):417-20.
29. Koukos G, Sakellari D, Arsenakis M, Tsalikis L, Slini T, Konstantinidis A. prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the oral cavity. *Arch Oral Biol*. 2015;60(9):1410-15.
30. Bischoff WE, Wallis ML, Tucker KB, Reboussin BA, Sherertz RJ. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: Prevalence, clonal relationships, and risk factors. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(6):485-91.
31. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection? *Americ J Infec Control*. 2015;43:35-7.
32. Moroney SM, Heller LC, Arbuckle J, Talavera M, Widen RH. Staphylococcal cassette chromosome mec and panton-valentine leukocidin characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):1019–21.
33. Menegotto FR, Picolé Su. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): Incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *Rev Bras Anal Clin*. 2007;39:147-50.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina; incidência; comunidade.



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Infecções sexualmente transmissíveis no trato genital masculino e feminino: patogênese e carcinogênese.

## PERSISTENCE AND CLINICAL RELEVANCE OF ZIKA VIRUS IN THE MALE GENITAL TRACT

**Fábio Augusto Kurscheidt<sup>1</sup>; Cristiane Suemi Shinobu Mesquita<sup>2</sup>; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke<sup>1</sup>; Edilson Damke<sup>2</sup>; Analine Rosa Barquez de Assis Carvalho<sup>3</sup>; Tamy Tainne Suehiro<sup>1</sup>; Jorge Juarez Vieirra Teixeira<sup>2</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>2</sup>; Raquel Pantarotto Souza Padovan<sup>2</sup>; Márcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate (PhD degree), Biosciences and Pathophysiology Program, Maringá State University, Maringá, PR

<sup>2</sup>Docent, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringá State University, Maringá, PR

<sup>3</sup>Postgraduate (Master degree), Bioscience and Pathophysiology Program, Maringá State University, Maringá, PR

e-mail: fabioaugustok@hotmail.com

### 1. INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus belonging to the family *Flaviviridae*, which was responsible for a major outbreak in the Americas in 2016 (1). ZIKV was first isolated in 1947 from rhesus macaque in the Zika Forest of Uganda, followed by isolation in 1948 in the *Aedes africanus* mosquito of the same forest, suggesting mosquito-borne transmission of the virus (2). Actually, autochthonous transmission of ZIKV infection has been reported in Asia, Africa, Micronesia, French Polynesia and other Pacific Islands, and Latin America, with increasing numbers of descriptions of travel-related cases worldwide (3-7), totalling 48 countries or territories affected by this virus (8). According to epidemiological data from the Pan American Health Organization (PAHO) and the WHO, 570,254 suspected cases of ZIKV were reported and 214,783 were confirmed in the Americas between January 2015 and July 2017 (9).

Most ZIKV infections are asymptomatic and go unreported, but if systemic symptoms do appear, they are usually mild in nature (mild fever, rash, arthralgia, arthritis, myalgia, headache, conjunctival hyperaemia, and oedema) and self-resolve within 1 week (10-12).

Mothers who are infected can transmit the virus through the placenta to developing fetuses, leading to congenital malformations including microcephaly, cerebral malformations, ophthalmological and hearing defects, and arthrogryposis (12-15) in newborns and to neurological syndromes, in particular, Guillain-Barré syndrome, in adults (11).

The main mode of ZIKV disease transmission in urban and suburban environments is via the mosquito vector *Aedes aegypti*, but the virus has been isolated from several other species of the genus *Aedes*, such as *Aedes albopictus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes hensilli*, and *Aedes polynesiensis* (1).

ZIKV can be detected in blood, urine, semen and other bodily fluids (16); however, the frequency with which the virus can be quantified in these fluids and the length of time that it remains detectable are not well understood. Moreover, some evidence highlights another important route of transmission: through sexual contact with a partner who is infected (16-28). Most cases of sexual transmission of ZIKV have occurred in people who had not resided in or travelled to areas with arthropod-borne ZIKV transmission and have developed the disease after oral, vaginal or anal sexual intercourse with partners infected with ZIKV (16-28).

Several reports have presented cases of ZIKV persistence in semen (17,20). The most persistent case of ZIKV detectable in semen was reported by Barzon and colleagues (20), who reported detection of ZIKV RNA up to 370 days after the onset of symptoms.

The presence of ZIKV in the male genital tract raises a number of questions, including whether the virus has tropism to any specific cell and whether the spermatozoon itself might be able to harbour the virus. Furthermore, how long the virus remains viable in the male genital tract remains to be determined, as does the issue of whether the long-term presence of ZIKV in the male genital tract can cause infertility. As ZIKV continues to spread, many issues remain, and considerable research is needed to advance our understanding of this important pathogen.

In this review, we summarize the current knowledge regarding ZIKV infections in the male genital tract and the influence of ZIKV on sperm parameters and male fertility, as well as effects of ZIKV infection on assisted reproduction. We discuss current data on positivity and infectivity of ZIKV infection in humans, animals, and cell culture and highlight evidence for ZIKV-specific infection of cells in the male genital tract.

### 2. MATERIAL AND METHODS

## 2.1. Methodology employed

The methodology employed was the systematic review, using previously defined and explicit methods to identify, select and critically evaluate relevant research.

Inclusion criteria for the selection of articles were: original research articles on Zika virus, without publication date and language limitation, involving the following subjects: studies in men, studies in animals and studies in cell cultures.

The identification of the articles was made through the bibliographic search in the computerized databases: Pubmed / Embase, Scopus, Web of Knowledge (WOK), cases described by the World Health Organization (WHO) in National International Health and Google Scholar.

Exclusion criteria were: review articles, opinion articles and books.

## 2.2. MeSH terms

The keywords used to identify the articles were: Zika, Zika Virus, Flavivirus, Male Reproductive System, Male Genital Tract, Fertility, Infertility, Sexual Transmission, Ejaculate, Semen, Sperm, Spermatozoa, Testes, Testis, Epididymis, Seminal Vesicles, Seminal Fluid, Prostate, Seminiferous Tubules, Orchitis, Prostatitis, Vesiculitis, Urethritis, Vasectomy, Cell Culture, Testicular Cells, Sertoli Cells, Spermatogonia, Leydig Cells, Spermatogenesis, Hematospermia, Oligozoospermia, Azoospermia, Leukospermia, Necrospermia, Sperm Motility, Sperm Function, Sperm Viability, Viral Replication, Semen Analysis, Spermogram, Animals.

## 2.3. Ethics committee

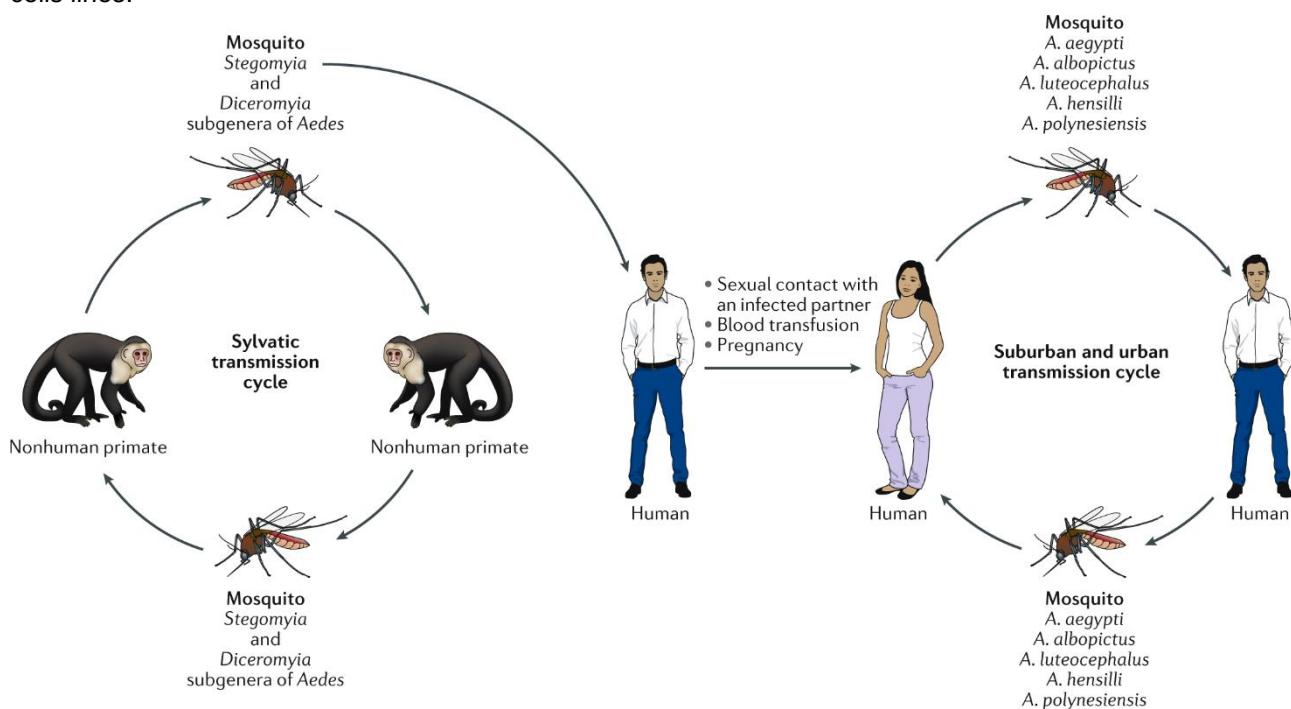
This project was approved by the Maringá State University Standing Committee on Ethics and Research (COPEP) (CAAE 56724716.4.0000.0104 / 2016).

## 2.4. Publication of the article

Article published in Nature Reviews Urology Magazine January 29, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0149-7>.

## 3. RESULTS

A total of 120 scientific articles were reviewed and divided into several Zika virus related topics: schematic transmission cycles of ZIKV, the kinetics of ZIKV in seminal shedding, effects on the male genital tract, semen and sperm parameters and its relationship with fertility, infection in animals models, infection and cells lines.



**Figure 1. Schematic transmission cycles of ZIKV.**

ZIKV RNA detection does not always indicate the presence of infectious virus. Isolation of infectious virus by cell culture is the gold standard for detecting replicative (infectious) virus.



**Table 1. Studies evaluating the kinetics of ZIKV in seminal shedding**

Study	Latest detection of ZIKV in semen (days after symptom onset)	ZIKV seminal load <sup>a</sup>	ZIKV blood load <sup>a</sup>	ZIKV urine load <sup>a</sup>	ZIKV semen isolation
Musso et al.	≈14–21	1.1 × 10 <sup>7</sup> copies/ml	Negative	3.8 × 10 <sup>3</sup> copies/ml	Positive
Mansuy et al.	≈14	8.6 log <sub>10</sub> copies/ml	2.8 log <sub>10</sub> copies/ml	3.1 log <sub>10</sub> copies/ml	Positive
D'Ortenzio et al.	24	3.5 × 10 <sup>7</sup> copies/ml	Negative	2.1 × 10 <sup>4</sup> copies/ml	Positive
Frank et al.	45	6 × 10 <sup>4</sup> copies/ml	Negative	Negative	Negative
Atkinson et al.	62	33 CT	Negative	Negative	NA
Reusken et al.	47	~35 CT	Negative	Negative	Negative
Atkinson et al.	13	NI	NI	NA	Positive
Barzon et al.	181	~50 copies/ml	Negative	Negative	Negative
Mansuy et al.	93	4,800 copies/ml	Negative	Negative	NA
Nicastri et al.	188	30.2 CT	Negative	Negative	Negative
Torres et al.	≈35	NI	NA	Negative	NA
Arsuaga et al.	96	30.1 CT	Negative	Negative	Positive
Souto et al.	93	29.99 CT	NA	Negative	Negative
Harrower et al.	76	35 CT	NA	NA	Negative
Mansuy et al.	141	~3.5 × 10 <sup>3</sup> log copies/ml	Negative	Negative	NA
Froeschl et al.	77	34.34 CT	34.42 CT at day 101	Negative	Positive
Gaskel et al.	92	37.2 CT	NA	NA	Negative
Joguet et al.	160	3.4 log copies/ml	Negative	Negative	Positive
Huits et al.	137	~35 CT	NI	NA	Positive
Garcia-Bujalance et al.	96	27.39 CT	NA	Negative	Positive
Barzon et al.	370	~23 CT	NI	NI	Positive
Biava et al.	147	38.5 CT	Negative	Negative	Positive
Sánchez-Montalvá et al.	23	NI	Negative	Negative	NA
Paz-Bailey et al.	125	NI	Negative	Negative	Positive
Mead et al.	281	NI	NI	Negative	Positive

CT, cycle thresholds; NA, not analysed; NI, not informed; ZIKV, Zika virus. <sup>a</sup>On the day of last detection in semen.

**Table 2. Effects on the male genital tract**

Study	Positive ZIKV Tests	Biological Material	Clinical/Symptoms
Arsuaga et al., Froeschl et al.	ARN ZIKV, culture cells	Semen	Vasectomized man
Brooks et al., Frêour et al., Garcia-Bujalance et al., Mead et al.	ARN ZIKV, culture cells	Semen	Asymptomatic man
Foy et al., Musso et al., Huits et al., Froeschi et al., Atkinson et al., Sánchez-Montalvá et al., Torres et al., Joguet et al., Biava et al., Gaskell et al., Mead et al.	NI	Semen	Macroscopic and/or microscopic haemospermia, prostatitis, painful ejaculation, penile discharge
Russell et al., Barzon et al., Reusken et al., Barzon et al., Biava et al., Gaskell et al., Atkinson et al.	ARN ZIKV	Semen	No symptoms in the genital tract

ZIKV, Zika virus; NI, not informed.

**Table 3. ZIKAV, semen and sperm parameters**

Study	Positive ZIKV Tests	Biological Material	Semen and sperm parameters
Huits et al., Joguet et al.	NI	Semen	Microscopic alterations to semen and spermatozoa
Huits et al.	ARN ZIKV	Semen	Haemospermia, oligospermia, decreased sperm count, leukocytes present,
Joguet et al.	ARN ZIKV	Semen, blood and urine	Decreases sperm count and total motile sperm
	ARN ZIKV	Semen	

ZIKV, Zika virus; NI, not informed.

**Table 4. Animal models of ZIKV infection in the male genital tract**

Study	Animal model	Male urogenital tropism	Positive biological fluids
Osuna et al.	Rhesus and cynomolgus macaques	• Testes • Prostate • Seminal vesicles	• Blood • Urine • Saliva • Semen • Cerebrospinal fluid
Koide et al.	Cynomolgus macaques	Testes	• Blood • Urine • Saliva
Hirsch et al.	Rhesus macaques	• Prostate • Seminal vesicles	• Blood • Urine
Govero et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	• Spermatogonia • Primary spermatocytes • Sertoli cells • Epididymis	• Blood • Epididymis • Sperm
Ma et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	• Peritubular cells • Spermatogonia • Epididymis	NI
Winkler et al.	<i>Rag1<sup>-/-</sup></i> mice	• Spermatogonia • Primary spermatocytes	Blood
Uraki et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	• Leydig cells • Epididymis	Blood
Sheng et al.	AG6 mice	Sertoli cells	NI
Uraki et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	• Testes • Epididymis	Sperm
Kawiecki et al.	IRF3/7 mice	• Epididymis • Seminiferous tubules • Germ cells	Blood
Duggal et al.	AG129 mice	• Testes • Epididymis • Germ cells	Sperm
Chan et al.	Immunosuppressed BALB/c mice with dexamethasone	• Testes • Seminiferous tubules	Blood
Siddharthan et al.	STAT2-knockout hamsters	• Kidney • Spermatogonia • Sertoli cells	NI
Griffin et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	• Seminiferous tubules • Spermatogenic cells • Sertoli cells	Sperm
Xu et al.	• BALB/c mice • <i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	NI	NI

ZIKV, Zika virus.

**Table 5. Studies evaluating ZIKV in semen by cell culture techniques**

Study	Period of culture	Culture type	ZIKV isolation
Barzon et al.	NI	Vero E6 cells	Positive
Arsuaaga et al.	5–7 days	Vero cells	Positive
D’Ortenzio et al.	NI	NI	Positive
Frank et al.	NI	NI	Negative
Musso et al.	6 days	Vero cells	Positive
Nicastri et al.	7 days	Vero E6 cells	Negative
Froeschl et al.	7 days	* Vero B4 cells * C6/36	Positive
Atkinson et al.	3–7 days	* Vero cells * C6/36 cells	Positive
Mansuy et al.	3–8 days	Vero cells	Positive
Paz-Bailey et al.	NI	NI	Positive
Barzon et al.	NI	NI	Negative
Harrower et al.	NI	NI	Negative
Garcia-Bujalance et al.	5–7 days	Vero cells	Positive
Huïts et al.	NI	NI	Negative
Huïts et al.	7 days	* Vero cells * C6/36 cells	Positive
Bagasra et al.	NI	* CRL-2226 * Vero cells	Positive
Biava et al.	0, 6, 24, 48, 72 and 96 hours	Vero E6 cells	Positive
Jang et al.	NI	Vero cells	Positive
Percivalle et al.	NI	Vero E6 cells	Positive
Chen et al.	24–48 hours	* C6/36 cells * HK2 cells	Positive
Matheron et al.	NI	NI	Positive
Spencer et al.	Up to 14 days	* 19I cells * LNCaP cells	Positive
Kumar et al.	At least 6 weeks	Sertoli cell and Leydig cell primary cultures	Positive

ZIKV, Zika virus.

#### 4. DISCUSSION

On the basis of many studies that confirm the sexual transmission of ZIKV, particular care is required to manage men who want to conceive after an episode of ZIKV infection, owing to the possibility of virus transmission between partners and, in particular, the possibility of damage to the fetus, contributing to microcephaly and other sequelae (13-16). The need to prevent ZIKV transmission in fertility clinics is an additional concern. ZIKV can be present even in semen from asymptomatic donors, and thus methods to detect the virus and prevent the potential detrimental effects of ZIKV on individuals and offspring must be considered (20). A ZIKV vaccine could be an important way to protect the population from ZIKV infection and could be a step to control the disease. Moreover, vaccination could protect against damage to the male genital tract and consequently might avoid subsequent fertility concerns. Current evidence indicates that some men who are infected can present with genitourinary symptoms, such as haematospermia, prostatitis, painful ejaculation, penile discharge, and oligospermia, but little is known about the real effect of ZIKV on fertility. Most of the currently available information about ZIKV in the male genital tract was obtained from studies using animal models and cell cultures of human prostate cells, Sertoli cells, and Leydig cells. In animal models, studies in immune-compromised mice described major effects of ZIKV on genitourinary health, including orchitis, and epididymitis. In NHPs, foci of ZIKV-infected cells were localized in the testes, prostate, and seminal vesicles, and the effects were less deleterious.

#### 5. CONCLUSION

These discoveries indicate that ZIKV infection can impair sperm parameters and function, at least in some men who have been infected. However, the actual proportion of men who are infected who might develop these changes and whether these changes are temporary or permanent are not yet known. As the 2016 outbreak of ZIKV was only a few years ago and scientists continue to monitor men affected by the virus, new

studies are necessary to expand our limited knowledge of ZIKV infection in the male genital tract and determine the long-term effects of this pathogen on male fertility.

## FUNDING

Source of Resource: Case 440521 / 2016-5. Call MCTIC / FNDCT-CNPq / MEC-CAPES / MS-Decit / Nº14 / 2016 - Prevention and fight against Zika virus; CAPES.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank the collaborators of the Clinical Cytology Laboratory and Research Support Center Complex (COMCAP).

## REFERENCES

1. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM & Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med* 2016; 374:1552-63.
2. Dick G, Kitchen S & Haddock A. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg* 1952; 46:509–20.
3. Armstrong P, Hennessey M, Adams M, Cherry C, Chiu S, Harrist A, et al. Zika virus response epidemiology and laboratory team. Travel-associated Zika virus disease cases among US residents-United States January 2015-February 2016. *Morb Mortal Wkly. Rep.* 65, 286-9.
4. Bachiller-Luque P, González MD, Álvarez-Manzanares J, Vázquez A, De Ory F, Fariñas MPS. First case of imported Zika virus infection in Spain. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2016; 34:243-6.
5. Li J, Xiong Y, Wu W, Liu X, Qu J, Zhao X, et al. Zika virus in a traveler returning to China from Caracas, Venezuela, February 2016. *Emerg Infect Dis.* 22:1133-6.
6. Perkasa A, Yudhaputri F, Haryanto S, Hayati RF, Ma'roef CN, Antonjaya U, et al. Isolation of Zika virus from febrile patient. Indonesia. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22:924-5.
7. Thomas DL, Sharp TM, Torres J, Armstrong PA, Munoz-Jordan J, Ryff KR, et al. Local transmission of Zika virus-Puerto Rico, November 23, 2015-January 28, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65(6):154-8.
8. World Health Organization. Emergencies-Zika virus situation reports. 2018; WHO Available in <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/en/>.
9. World Health Organization. Zika virus (ZIKV) classification table data as of 20 June 2017. WHO Available in <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255767/1/zika-classification-20June17-eng.pdf?ua=1>.
10. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S, et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol.* 2015; 63:32-5.
11. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 387. 2016; 1531-9.
12. Kuno G, Chang GJJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N. & Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol.* 1998; 72:73-83.
13. Chan, JF, Choi GK, Yip CC, Cheng VC & Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease. *J Infect.* 2016; 72:507-24.
14. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 534, 2016:267-71.
15. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med.* 2016; 74:951-8.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for U.S. laboratories testing for Zika virus infection. Updated July 24 2017 CDC. Available in <https://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>.
17. Arsuaga M, Bujalance SG, Díaz-Menéndez M, Vázquez A. & Arribas JR. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:1107.
18. Davidson, A. Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus-New York City, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 65:716-7.
19. Deckard, D. T. Male-to-male sexual transmission of Zika virus-Texas, January 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 65, 372-4.
20. D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorowski G, et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N Engl J Med.* 2016; 374:2195-8.

**Keywords:** zika virus; fertility; semen.



## **Kin17 EM CÂNCER CERVICAL: EXPRESSÃO BASAL PROTEICA *IN VITRO* E EM TECIDOS CERVICAIS**

**Lais de Sena Marques<sup>1</sup>; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles<sup>2</sup>; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke<sup>2</sup>; Cristiane Suemi Shinobu Mesquita<sup>3</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>3</sup>; Márcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>3</sup>**

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

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

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: laissmarques@outlook.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O câncer do colo do útero, também conhecido como câncer cervical, é um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum na população feminina brasileira, com cerca de 16.370 novos casos a cada ano. É também a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres no país, representando 5.847 óbitos anuais (1). Esses dados se tornam ainda mais preocupantes por se tratar de um tipo de câncer que já possui prevenção primária pela vacinação e também prevenção secundária, representada pelas técnicas de rastreamento como a colpocitologia oncótica (exame de Papanicolaou) e pela biologia molecular na detecção do *Papillomavirus* humano (HPV), que proporcionam o tratamento precoce à paciente, com elevadas chances de cura (2). O câncer cervical está relacionado com a infecção persistente por pelo menos um tipo de alto risco carcinogênico de HPV (HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), sendo encontrado em mais de 99% dos casos de lesões pré-cancerosas e de câncer cervical (3).

A evolução desse câncer é lenta, apresentando estágios precursores que, por muitas vezes, acabam regredindo espontaneamente mesmo sem tratamento. Porém, as chances de desenvolvimento de uma lesão pré-cancerosa são aumentadas de acordo com a persistência viral. Esses estágios precursores são chamados de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) graus I, II e III (4,5). A quimioterapia e a radioterapia no tratamento do câncer cervical invasivo são pouco efetivas na sobrevida à longo prazo e acarretam em muitos efeitos colaterais debilitantes para as pacientes (2). Terapias alvo-moleculares têm sido desenvolvidas para vários tipos de cânceres representando grandes conquistas (6,7). No entanto, poucos fármacos direcionados têm sido efetivamente aplicados no tratamento do câncer cervical. Mesmo com a existência da prevenção primária e secundária, muitas mulheres acabam sendo diagnosticadas apenas em fases já avançadas (carcinoma invasor), comprometendo a cura e o prognóstico dessas pacientes. Em razão disso, métodos que auxiliem o diagnóstico precoce são extremamente necessários na rotina clínica (2).

Kin17 é uma proteína cujo gene é conservado entre os mamíferos e seu RNA mensageiro é expresso em baixos níveis em tecidos normais, com exceção do coração, músculos esqueléticos e testículos. Foi relatada primeiramente em camundongos, sendo detectada por reação cruzada com anticorpos anti-RecA, que é uma proteína envolvida em um sistema de reparo de DNA em *Escherichia coli*, apresentando 47% de homologia entre as duas (8,9). Em humanos, o gene Kin17 também foi descrito, localizado na região p15-p14 do cromossomo 10. Codifica uma proteína nuclear de 45 kD, com domínio dedo de zinco, distribuída em focos nucleoplásmicos (10). A proteína Kin17 é superexpressa em células expostas à radiação ultravioleta (UV) quando comparada às células não expostas, e também sua expressão é aumentada em células em proliferação. Dessa forma, essa proteína participa do controle à danos ao DNA e também no controle do ciclo celular (9, 11, 12).

Recentemente foi demonstrado que a proteína Kin17 está envolvida na patogênese e na progressão de alguns tipos de tumores sólidos. Estudos evidenciaram a expressão aumentada de Kin17 em câncer de mama, câncer hepatocelular, colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas e melanoma (13-17). Em relação ao câncer cervical, até onde conhecemos, apenas um estudo avaliou a expressão da proteína Kin17 em tecidos cervicais humanos e em cultura de células HeLa (18), o que nos mostra que ainda pouco foi elucidado com relação à participação da Kin17 na carcinogênese cervical bem como seus mecanismos de ação neste câncer. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão basal proteica de Kin17 em

tecidos cervicais com diferentes graus de lesões e câncer bem como em um painel abrangente de linhagens celulares de câncer cervical.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras de tecidos cervicais

Foram utilizadas um total de 182 amostras cervicais em cortes parafinizados dispostas em lâminas de vidro, provenientes de mulheres residentes do Estado do Paraná com e sem anormalidades cervicais, usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS), pertencentes ao banco de amostras do Laboratório Souza Anatomia de Maringá/PR. Do total de amostras cervicais, 5 foram negativas para lesão intraepitelial e malignidade (NILM), 65 com NIC I, 57 com NIC II, 50 com NIC III e 5 com câncer cervical (CC). A utilização das amostras foi aprovada pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (412.416/2013).

### 2.2. Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de células tumorais cervicais, sendo essas: HeLa, linhagem celular originada de adenocarcinoma de cérvix uterina humana, HPV 18 positiva; SiHa, linhagem celular originada de carcinoma de cérvix uterina escamosa humana grau II, com 1 a 2 cópias do HPV 16 por célula; CaSki, linhagem celular originada de carcinoma epidermóide de cérvix uterina humana metastática, HPV 16 e 18 positiva e C33A, linhagem celular de carcinoma de cérvix uterina humana, HPV negativa. A linhagem celular epitelial humana não tumorigênica HaCaT (queratinócitos imortalizados), foi utilizada como controle negativo.

### 2.3. Cultivo celular em monocamada

As células foram cultivadas em estufa de cultura celular à 37°C com tensão de CO<sub>2</sub> de 5%, em frascos plásticos com 75 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µ/mL de anfotericina B. As células foram subcultivadas sempre que atingiram aproximadamente 80% de confluência, utilizando solução de tripsina/EDTA 0,05%, tendo sido as células previamente lavadas com solução de tampão fosfato-salino (PBS).

### 2.4. Imunohistoquímica

Primeiramente os cortes histológicos sofreram desparafinização em forno elétrico à 100°C por 1 hora, retirando-se o excesso de parafina derretida com papel macio em 30 minutos e ao final de 1 hora, sendo finalizada com banho em xilol por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram reidratados em soluções decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%, 50%) e água. A recuperação antigênica foi realizada com a adição de tampão Citrato pH 6,0 sobre os cortes, em forno elétrico à 95°C, por 10 minutos, contados a partir da fervura do Citrato. Os reagentes utilizados na técnica pertencem ao kit de revelação polivalente livre de biotina da Spring Bioscience, USA. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com Bloqueador de Peróxido de Hidrogênio por 10 minutos. Em seguida, as proteínas inespecíficas foram bloqueadas com Bloqueador de Proteína por 10 minutos. Logo após, foi adicionado o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-Kin17 k36 (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluído em diluente de anticorpo (Abcam, UK) à 1:300 e incubado por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Foi adicionado em seguida, por 10 minutos, o reagente *Complement* que contém os anticorpos secundários, sendo esses, anticorpos de coelho anti-camundongo. Depois, a amplificação do sinal foi realizada com a adição do reagente *HRP Conjugate* por 15 minutos, sendo composto por anticorpos de cabra anti-coelho, conjugados com a enzima *Horseradish peroxidase* (HRP). Foi aplicado o revelador 3, 3'-diaminobenzidina tetracloridrato (DAB) durante 10 minutos protegido da luz. Entre a aplicação de cada reagente foram realizadas lavagens com PBS. Por fim, foi realizada a contracoloração por 3 minutos com Hematoxilina de Harris (Laborclin, BR) filtrada, sendo feitas lavagens com água destilada para retirar o excesso do corante. Os cortes foram desidratados em soluções crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90%, 100%), mergulhadas em xilol para clarificação e montadas adicionando-se 2 a 3 gotas de Entelam e aplicando-se uma lamínula de vidro limpa sobre os cortes. A leitura da intensidade de marcação foi feita em microscópio de luz, avaliando-se a intensidade de marcação em tom castanho, que mostra a expressão proteica. Classificou-se a expressão da proteína em: negativa ou baixa expressão, moderada expressão e alta expressão de Kin17, conforme os seguintes escores: intensidade da coloração castanha X porcentagem de células coradas, sendo que resultados superiores a 100 foram definidos como alta expressão, de 100 a 50 como expressão moderada e menor que 50 como negativa ou baixa expressão.

### 2.5. Imunocitoquímica

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo uma lamínula redonda ao fundo, adicionando-se um volume de 1x10<sup>5</sup> células/mL e mantidas em DMEM 10% em estufa. A técnica foi realizada dentro de 24h à 48h, quando as células apresentaram uma confluência de no mínimo 80% sobre a lamínula. Todo o meio de cultura dos poços foi retirado e adicionou-se 1 mL de Formalina 4% por 30 minutos sobre as células para fixação das mesmas. Depois, as células foram lavadas com PBS por 2 minutos. A técnica de imunocitoquímica segue o mesmo protocolo da imunohistoquímica, porém não são aplicadas às células as

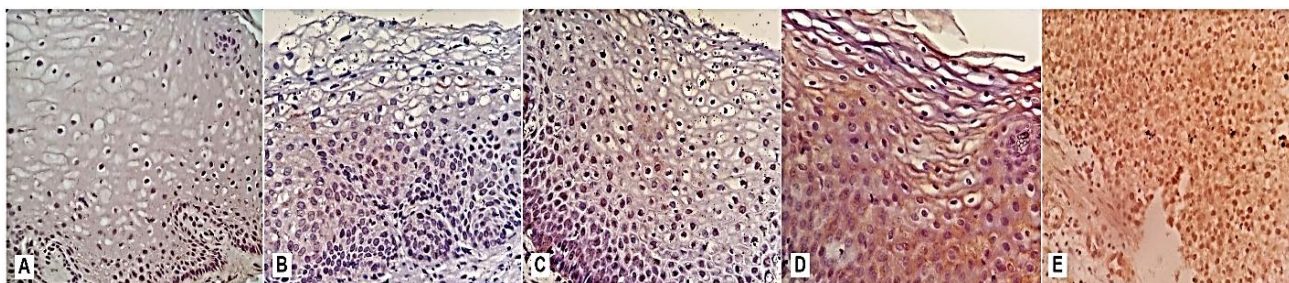
fases de desparafinização, hidratação e desidratação, recuperação antigênica e clarificação em xilol. O anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-Kin17 k36 (Santa Cruz Biotechnology, USA) também ganhou algumas diferenciações quando aplicado às células, sendo aqui diluído à 1:500 em diluente de anticorpo (Abcam, UK) e incubado *overnight* em câmara úmida à 4°C. Foram feitos controles realizando-se a técnica igualmente em todas as células, porém sem a adição do anticorpo primário, sendo feita a incubação *overnight* apenas com o diluente de anticorpo. Ao final da técnica, as lamínulas foram aplicadas em lâminas de vidro com Entelam. A leitura seguiu como feito na imunohistoquímica.

## 2.6. Western blot

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL e mantidas em DMEM 10% em estufa. Após 48h, com as células já preenchendo todo o fundo do poço, foi retirado todo o meio de cultura e realizada a lavagem com PBS gelado. Em seguida, adicionou-se 150  $\mu$ L de solução tampão para lise e extração de proteínas (RIPA) acrescida de inibidores de fosfatase e protease, sendo então realizada a raspagem das células. Os lisados foram centrifugados à 10.000 rpm por 20 minutos e congelados até o momento do uso. A quantificação de proteínas foi realizada pelo kit *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a eletroforese em gel, foram adicionados juntamente com os lisados celulares as soluções *Bolt™ LDS Sample Buffer (4X)* e *Bolt™ Sample Reducing Agent (10X)* (Thermo Fisher Scientific, USA), para um volume total de 60 $\mu$ L, sendo então levados ao banho-maria por 10 minutos à 70°C. Em seguida, essas amostras foram aplicadas no gel *Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus* (Thermo Fisher Scientific, USA), sendo utilizado também o padrão proteico de peso molecular corado *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad, USA). A eletroforese foi realizada em 165 V por 35 minutos. Após o término da migração no gel, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento *iBlot 2 Gel Transfer Device* (Thermo Fisher Scientific, USA). A marcação com anticorpo foi realizada por 2 horas e 30 minutos pelo equipamento *iBind™ Western System* (Thermo Fisher Scientific, USA) no qual, foram preparadas a solução de 1X *iBind* (iBind Solution kit, Thermo Fisher Scientific, USA) e as diluições dos anticorpos, sendo o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-Kin17 k36 (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluído à 1:200 e o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com HRP diluído à 1:1000. A revelação foi feita utilizando o kit *Novex HRP Substrate Chromogenic TMB* (Invitrogen, USA). A detecção da proteína  $\beta$ -actina, com diluição de 1:665 também foi realizada nos lisados celulares como controle de extração proteica.

## 3. RESULTADOS

As intensidades de expressão proteica de Kin17 obtidas nas amostras de tecidos cervicais pela técnica de imunohistoquímica estão representadas na Figura 1. Foi possível visualizar a expressão da proteína nos tecidos à nível nuclear e citoplasmático.

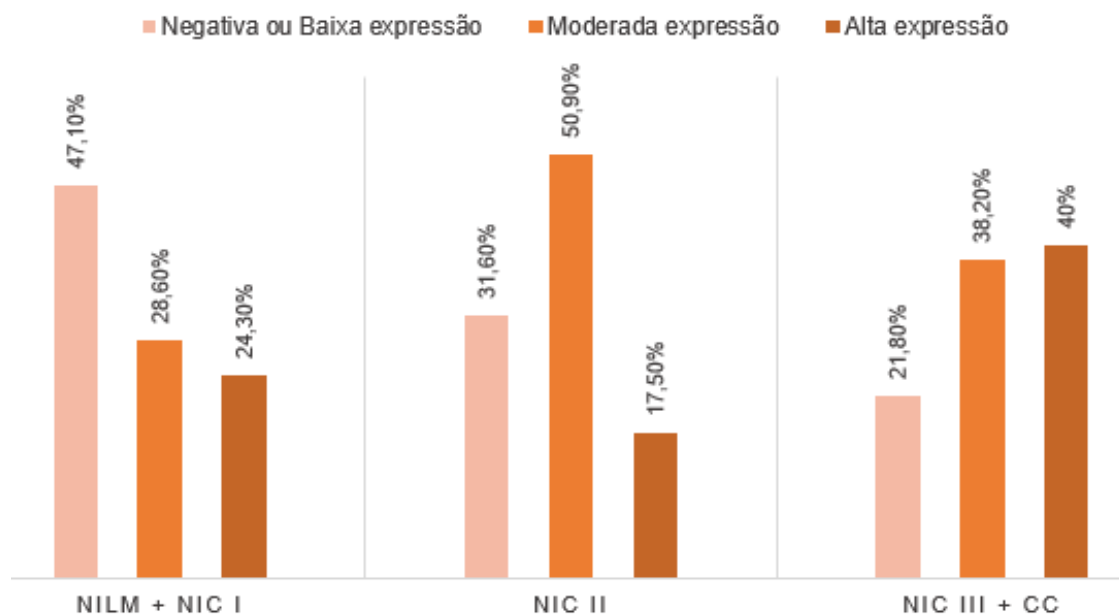


**Figura 1. Intensidades de expressão da proteína Kin17 nas amostras de tecidos cervicais.**

A: NILM negativa; B: NIC I com baixa expressão; C: NIC II com moderada expressão; D: NIC III com alta expressão e E: carcinoma invasivo com alta expressão. Microscopia óptica de luz, objetiva de 40X.

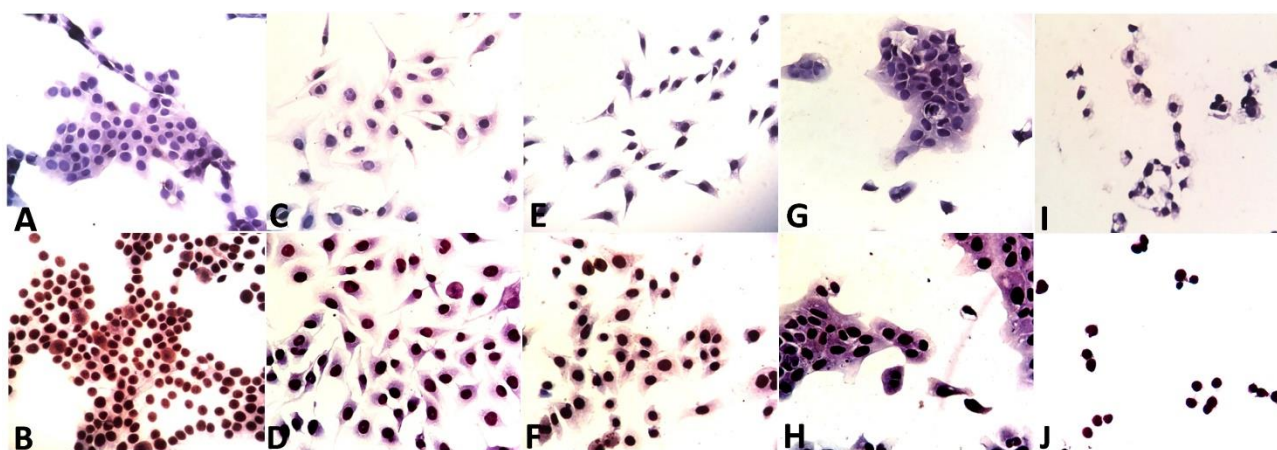
Das amostras de tecidos cervicais NILM + NIC I, 47.1% apresentaram baixa expressão de Kin17, seguido de 28.6% de moderada expressão. Já nas amostras com NIC II, 50.9% tiveram moderada expressão e 31.6% baixa expressão da proteína. As amostras com NIC III e carcinoma cervical mostraram um total de 40% apresentando alta expressão proteica de Kin17, enquanto 38.2% apresentaram moderada expressão (Figura 2).





**Figura 2. Distribuição da expressão da proteína Kin17 obtida nas amostras de tecidos cervicais utilizadas.**

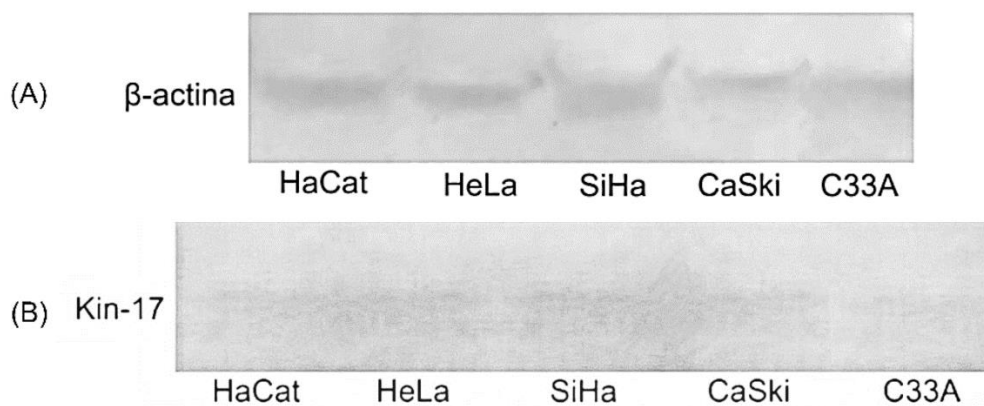
As linhagens de células tumorais cervicais HeLa, SiHa, CaSki e C33A apresentaram alta expressão da proteína Kin17 pela técnica de imunocitoquímica. A linhagem celular epitelial humana não tumorigênica HaCaT que foi usada como controle também apresentou alta expressão de Kin17 (Figura 3).



**Figura 3. Expressão da proteína Kin17 na linhagem celular epitelial humana não tumorigênica HaCat e nas linhagens celulares tumorais cervicais HeLa, SiHa, CaSki e C33A.**

A, C, E, G e I mostram as linhagens HaCat, HeLa, SiHa, CaSki e C33A, respectivamente, sem a utilização de anticorpo. B, D, F, H e J mostram as linhagens HaCat, HeLa, SiHa, CaSki e C33A, respectivamente, marcadas com anticorpo anti-Kin17, evidenciando uma alta expressão proteica de Kin17 em todas as linhagens celulares utilizadas. Microscopia óptica de luz, objetiva de 40X.

Pela técnica de Western blot também foi possível visualizar as bandas representativas do peso molecular de Kin17 em todas as linhagens celulares analisadas. O controle  $\beta$ -actina também foi detectado em todas as linhagens (Figura 4).



**Figura 4. Detecção da proteína Kin17 pela técnica de Western blot na linhagem celular epitelial humana não tumorigênica HaCat e nas linhagens celulares tumorais cervicais HeLa, SiHa, CaSki e C33A.**

A: bandas representativas da proteína  $\beta$ -actina, utilizada como controle de extração proteica. B: bandas representativas da proteína Kin17.

#### 4. DISCUSSÃO

Foi observado que a expressão da proteína Kin17 parece aumentar conforme a gravidade das lesões cervicais até câncer invasivo, sugerindo que Kin17 possa estar mais elevada nas amostras de tecidos cervicais que apresentavam lesões mais avançadas e câncer cervical, assim como observado nas linhagens de cultura celular. Ainda, todas as linhagens apresentaram bandas representativas da Kin17 por Western blot. Zhang et al. observaram que em tecidos cervicais, a expressão de Kin17 era significativamente mais elevada em amostras de câncer cervical em relação às amostras cervicais normais. Silenciando o gene Kin17 em células HeLa, os autores também avaliaram que na ausência ou diminuição de expressão dessa proteína, as células apresentaram redução na proliferação, crescimento, migração e invasão celular, sendo que o silenciamento de Kin17 também interrompeu o ciclo celular das células HeLa durante a fase S e aumentou a morte celular por apoptose (18). Nossos resultados corroboram a literatura e apontam para uma possível utilização da proteína Kin17 em terapias alvo-moleculares, auxiliando no estacionamento e regressão do câncer cervical. Outro estudo nesse sentido foi realizado recentemente por Gao et al. silenciando Kin17 na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, negativa para os receptores de estrogênio, progesterona e HER-2 (triplo-negativa), o que reduziu a proliferação dessas células e promoveu a apoptose das mesmas (19). A marcação de Kin17 observada na linhagem celular não tumorigênica HaCat, usada como controle, é explicada pelo fato dessa proteína ser altamente expressa em queratinócitos que estão em hiperproliferação (20), sendo uma característica dessa linhagem de queratinócitos imortalizados.

#### 5. CONCLUSÃO

A expressão de Kin17 evidenciada nas amostras de tecidos cervicais e em cultura de células mostrou que essa proteína pode estar envolvida na carcinogênese cervical, sugerindo que a mesma deve ser mais estudada como um possível biomarcador para diagnóstico e prognóstico desse câncer, bem como um possível alvo terapêutico para o câncer cervical.

#### FINANCIADORES

PROAP/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço aos alunos e professoras do Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

#### REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas de câncer. 2019. [Acesso em 22 Jul 2019]. Disponível em <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.
2. Wentzensen N, Klug SJ. Cervical cancer control in the era of HPV vaccination and novel biomarkers. *Pathobiology* 2009 Feb;76(2):82-9.
3. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 1999 May;189(1):12-9.



4. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama* 2001 Dec;286(24):3106-14.
5. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* 2007 Sep;370(9590):890-907.
6. Aggarwal C. Targeted therapy for lung cancer: present and future. *Annals of palliative medicine* 2014;3(3):229-35.
7. Polakis P. Antibody drug conjugates for cancer therapy. *Pharmacological reviews* 2016 Jan;68(1):3-19.
8. Kurumizaka H, Aihara H, Ikawa S, Kashima T, Bazemore LR, Kawasaki K et al. A possible role of the C-terminal domain of the RecA protein A gateway model for double-stranded DNA binding. *Journal of Biological Chemistry* 1996 Dec;271(52):33515-24.
9. Kannouche P, Pinon-Lataillade G, Tissier A, Chevalier-Lagente O, Sarasin A, Mezzina M et al. The nuclear concentration of kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis* 1998;19(5):781-9.
10. Carlier L, Couprie J, Le Maire A, Guilhaudis L, Milazzo-Segalas I, Courçon M et al. Solution structure of the region 51–160 of human KIN17 reveals an atypical winged helix domain. *Protein Science* 2007 Sep;16(12):2750-5.
11. Masson C, Menaa F, Pinon-Lataillade G, Frobert Y, Chevillard S, Radicella JP et al. Global genome repair is required to activate KIN17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003 Jan;100(2):616-21.
12. Miccoli L, Frouin I, Novac O, Di Paola D, Harper F, Zannis-Hadjopoulos M et al. The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. *Molecular and cellular biology* 2005 May;25(9):3814-30.
13. Zeng T, Gao H, Yu P, He H, Ouyang X, Deng L et al. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. *PLoS One* 2011 Sep;6(9):e25343.
14. Kou WZ, Xu SL, Wang Y, Wang LW, Wang L, Chai XY et al. Expression of Kin17 promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Oncology letters* 2014;8(3):1190-4.
15. Despras E, Miccoli L, Créminon C, Rouillard D, Angulo JF, Biard DSF. Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. *Radiation research* 2003;159(6):748-58.
16. Zhang Y, Huang S, Gao H, Wu K, Ouyang X, Zhu Z et al. Upregulation of KIN17 is associated with non-small cell lung cancer invasiveness. *Oncology letters* 2017;13(4):2274-80.
17. Ramos A, Gaspar V, Kelmer S, Sellani T, Batista A, De Lima Neto Q et al. The kin17 protein in murine melanoma cells. *International journal of molecular sciences* 2015 Nov;16(11):27912-20.
18. Zhang Y, Gao H, Gao X, Huang S, Wu K, Yu X et al. Elevated expression of Kin17 in cervical cancer and its association with cancer cell proliferation and invasion. *International Journal of Gynecologic Cancer* 2017 May;27(4):628-33.
19. Gao X, Liu Z, Zhong M, Wu K, Zhang Y, Wang H et al. Knockdown of DNA/RNA-binding protein KIN17 promotes apoptosis of triple-negative breast cancer cells. *Oncology letters* 2019;17(1):288-93.
20. KIN17 (K36): sc-32768 [Bula]. Estados Unidos. Santa Cruz Biotechnology, INC.

**Palavras-chave:** câncer do colo do útero; Kin17; expressão proteica.

## PREVALENCE AND TYPE CONCORDANCE OF CERVICAL AND OROPHARYNGEAL HUMAN *Papillomavirus* IN HIV-POSITIVE WOMEN AND HIV-NEGATIVE PAIRED CONTROLS IN BRAZIL

Tamy Tainne Suehiro<sup>1</sup>; Edilson Damke<sup>2</sup>; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke<sup>1</sup>; Sandra Marisa Pelloso<sup>3</sup>; Michael Saag<sup>4</sup>, Edward Partridge<sup>4</sup>; Warner Hu<sup>4</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>2</sup>; Isabel Cristina Scarinci<sup>4</sup>; Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR.

<sup>2</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Nursing, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Researcher, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, US

e-mail: tamysuehiro89@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

The association between persistent high-risk human *Papillomavirus* (HPV), cervical cancer (CC) and some vaginal and anal cancers has been well-established (1-3). In addition, recent data demonstrates that HPV is also associated a subset of head and neck cancers including 50–75% of oropharyngeal cancers (4, 5). People living with human immunodeficiency virus (HIV+) have elevated risk of HPV related cancers at different anatomical sites, compared to their HIV-negative peers (6, 7). HPV infection is particularly burdensome for HIV+ women, as they are more susceptible to infection and are less likely to clear the virus, which in turn, increases their risk of developing all types of HPV-associated cancers compared to the general population. Although the incidence of overall cancer has diminished in HIV+ people with the advent of highly active antiretroviral therapy (HAART), it is not diminished for certain HPV-related cancers (8-10) as CC. Moreover, in HIV+ women, CC tends to respond poorly to recommended therapies, has a proclivity to be more aggressive, and overall, may have a worse prognosis (11). With the increase in survival of HIV+ women due HAART, there is an increased opportunity for progression of oncogenic viral infections into malignancies, particularly an increased incidence of HPV-associated oropharyngeal, genital, and anal cancers (8-10).

Currently, the HIV/AIDS pandemic is most strikingly impacting the poorest and the youngest in resource-limited settings, with women being overrepresented in these groups particularly in low- and middle-income (LMICs) countries, such as Brazil. With the recent approval of the 9-valent HPV vaccine there is real promise to dramatically decrease the risk of persistent HPV infection and HPV-related pre cancers and malignancies. Given the high burden of HPV-related cancers among HIV+ women and the promise of a 9-valent HPV vaccine, it is critical to understand the prevalence and types of HPV infections in oropharyngeal and cervical mucosa among HIV+ women (and matched controls). However, while several studies on HIV+ women report cervical, oropharyngeal, or anal HPV type distribution (12-13), only few studies have addressed concurrent cervical and oropharyngeal HPV prevalence (14-16).

The present study assessed the prevalence, distribution and concordance of cervical and oropharyngeal HPV in HIV+ women and matched HIV negative controls in the Southern region of Brazil, a geographic area with high incidence of HIV and CC. Furthermore, we identified predictors of cervical and oropharyngeal HPV infection.

### 2. MATERIAL AND METHODS

A total of 254 women were randomly selected for the study: 115 HIV+ and 139 HIV- women registered in the Specialized Assistance Service for Sexually Transmitted Diseases (STD/AIDS) for detection and control in Maringá/Paraná, Brazil, during October 2017 – April 2018. Inclusion criteria for the HIV+ were: women diagnosed with HIV/AIDS in two distinct moments and two different diagnostic methods; to the HIV- women were necessary two HIV/AIDS negatives results by different diagnostic methods. Exclusion criteria were previous hysterectomy, current and recent pregnancy, age <19 years, and no history of sexual activity. Data regarding HIV infection and treatment were obtained from Specialized Assistance Service medical records. This study was approved by National Ethics and Research Committee Involving Humans at Brazil (CAAE: 50688815.0.0000.0104 - 04/11/2015), and all women participated of this study sign the consent form and answered a demographic questionnaire.

Cervical, endocervical and vaginal samples were collected using a cytobrush and Ayre's spatula to

the Papanicolaou smear preparation and the results reported according to Bethesda system (17). For the molecular analysis the endocervical and vaginal samples were immediately suspended in THINPREP® Pap Test solution and stored at -80°C until analysis. The oropharyngeal collection was performed to scraped total oropharyngeal cavity using a sterile spatula and immediately suspended in THINPREP® Pap Test solution and stored at -80°C until analysis. Also, a gargle sample was obtained gargle with 10ml of 0.9% sterile saline for a total of 30s (10s rinse, 5s gargle, 10s rinse, 5s gargle), collected in a sterile cup and stored at -4°C.

Detection and typing of HPV were performed by Kit Multiplex XGEN MULTI HPV CHIP HS12, following the manufacturer's instructions. The multiplex detected 36 HPV types: 18 HR (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82) and 18 LR (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84 e 89), an additional HPV universal probe, which detected another types of HPV.

A two-sided Fisher's exact test for 2x2 contingency table was used to evaluate the statistical significance between different groups. Crude odds ratios with 95% confidence intervals (CI) were calculated and statistical significance was defined as  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (San Diego, California, USA).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Characteristics of the study population

Overall 254 women, the mean age for HIV+ women was  $42.17 \pm 10.18$  years and  $41.4 \pm 12.31$  years for HIV- women. Comparing both groups, the HIV+ group were associated with education  $< 8$  years ( $P=0.0074$ ) and number of parities  $\geq 3$  ( $P=0.02$ ). On the other hand, HIV- women were associated with white skin color ( $p=0.0064$ ), 1 sexual partner ( $P=0.01$ ), 0 parity ( $P=0.0002$ ) and widowed ( $P=0.0028$ ) (Table 1). Most HIV+ women showed excellent control of the HIV infection, based on HAART correct use (80.9%), high current CD4+ T lymphocyte count (82.6% with  $> 350$  cells/mm<sup>3</sup>) and low current viral load (86.1%  $<$  minimum limit). Additionally, most HIV+ women had duration of HIV  $< 5$  years (63.5%) (Table 1).

**Table 1. Overall baseline characteristics of HIV+ and HIV- women**

Variables	HIV+ women (n=115)	HIV- women (n=139)	Odds Ratio (OR)	P value <sup>a</sup>
	n (%)	n (%)		
<b>Age range (years)</b>				
Mean	42.17±10.18	41.4±12.31	0.8	0.4
18-30	16 (13.9)	31 (22.3)	1.6	0.1
31-40	36 (31.3)	37 (26.6)	0.8	0.6
> 40	63 (54.8)	71 (51.1)	0.9	0.7
<b>Education(years)</b>				
< 8	45 (39.1)	26 (18.7)	0.4	<b>0.0074</b>
≥ 8	70 (60.8)	113 (81.3)	1.3	0.17
<b>Marital status</b>				
Married	53 (46.1)	68 (48.9)	1	0.8
Unmarried	45 (39.1)	66 (47.5)	1.2	0.4
Widowed	17 (14.8)	5 (3.6)	0.2 (0.8-0.6)	<b>0.0028</b>
<b>Skin color</b>				
White	48 (41.7)	81 (58.2)	0.24	<b>0.0064</b>
Not white	67 (58.2)	58 (41.7)	0.7	0.1
<b>Menarche (years)</b>				
< 13	56 (48.7)	78 (56.1)	1.1	0.5
≥ 13	59 (51.3)	61 (43.9)	0.8	0.3
<b>Age of sexual debut (years)</b>				
< 18	79 (68.7)	78 (56.1)	0.8	0.3
≥ 18	36 (31.3)	61 (43.9)	1.4	0.1
<b>Sexual partners (number)</b>				
1	6 (5.2)	24 (17.3)	3.3 (1.3-8.3)	<b>0.01</b>
2-7	76 (66.1)	82 (59)	0.9	0.6
> 7	33 (28.7)	33 (23.7)	0.8	0.6
<b>Parity (number)</b>				
0	3 (2.6)	26 (18.7)	7.17 (2.1-19.3)	<b>0.0002</b>
1-2	59 (51.3)	77 (55.4)	1.1	0.7
≥ 3	53 (46.1)	36 (25.9)	0.5	<b>0.02</b>
<b>History of Pap smear in the past three years</b>				
Yes	59 (51.3)	94 (67.6)	1.3	0.2
No	56 (58.7)	45 (32.4)	0.6	0.09
<b>Hormonal contraceptive use</b>				
Yes	20 (17.4)	37 (26.6)	1.5	0.1
No	95 (82.6)	102 (73.4)	0.9	0.5
<b>Gynecologicinfections</b>				
Yes	30 (26.1)	29 (20.8)	0.8	0.4
No	85 (73.9)	110 (79.1)	1.1	0.7
<b>Cigarette smoking</b>				

Yes	30 (26.1)	32 (23)	0.9	0.6
No	56 (48.7)	85 (61.1)	1.2	0.3
Ex-smoker	29 (25.2)	22 (15.8)	0.6	0.1
<b>Period of HIV infection (years)</b>				
< 5	73 (63.5)	-	-	-
5-10	42 (36.5)	-	-	-
> 10	0 (0)	-	-	-
<b>HAART correct use</b>				
Yes	93 (80.9)	-	-	-
No	22 (19.1)	-	-	-
<b>Current CD4 (cells/mm<sup>3</sup>)</b>				
< 200	3 (2.6)	-	-	-
200-350	17 (14.8)	-	-	-
> 350	95 (82.6)	-	-	-
<b>Recent viral load (copies/ml)</b>				
Undetectable	99 (86.1)	-	-	-
1-100.000	16 (13.9)	-	-	-
> 100.000	(0)	-	-	-

<sup>a</sup>P value <0.05 was considered significant.

### 3.2. Pap smears

Overall, 13% of HIV+ women and 5% of HIV- women had abnormal cytological findings ( $P=0.04$ ). Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) results were found in 2.6% of HIV+ and 1.4% in HIV- women ( $P=0.66$ ); results of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) were observed in 7.8% of HIV+ and 2.8% of HIV- women ( $P=0.15$ ) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) were found in 2.6% of HIV+ and 0.8% of HIV- women ( $P=0.33$ ).

### 3.3. HPV in cervical mucosa

The frequency of HPV DNA detected in cervical samples in HIV+ women was 44.3% and 37.4% to HIV- women. Among HIV+ and HIV- women, 24.3% and 20.9% had multiple HPV infections, respectively. Both HIV+ and HIV- women presented a statistically significantly higher prevalence of cervical HPV infection than oropharyngeal ( $P<0.0001$  for both groups), as well as HR-HPV ( $P=0.0028$  for HIV+;  $P<0.0001$  for HIV-), LR-HPV ( $P<0.0001$  for both groups) and multiple infections ( $P<0.0001$  for both groups), showed in table 2.

### 3.4. HPV in oropharyngeal mucosa

HPV DNA was detected in oropharyngeal samples in 14.8% of HIV+ women and in 9.4% of HIV- women. Multiple HPV infections were observed in 5 samples (4.3%) of HIV+ women and for HIV- women were 4 samples (2.9%) ( $P>0.05$ ), showed in table 2. There was no association between HIV+ serology and the presence of HPV DNA in oropharyngeal mucosa ( $P=0.83$ ).

**Table 2. Prevalence of cervical and oropharyngeal HPV infection in HIV+ and HIV- women**

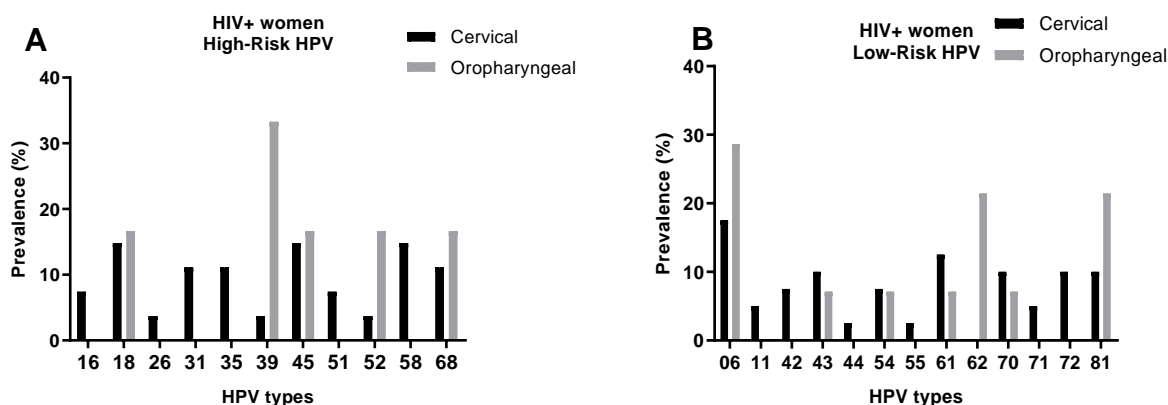
	HPV Cervical n	HPV Oropharyngeal n	P value comparing cervical and oropharyngeal HPV prevalence
<b>HIV+ (n=115)</b>			
<b>Overall</b>			
Positive	51	17	<0.0001
Negative	64	98	
<b>High-Risk HPV</b>			
Positive	23	7	0.0028
Negative	92	108	
<b>Low-Risk HPV</b>			
Positive	37	9	<0.0001
Negative	78	106	
<b>Universal HPV</b>			
Positive	17	7	0.028
Negative	89	108	
<b>Multiple Infections</b>			
Positive	28	5	<0.0001
Negative	87	110	
<b>HIV- (n=139)</b>			
<b>Overall</b>			
Positive	52	13	<0.0001
Negative	87	126	
<b>High-Risk HPV</b>			
Positive	33	5	<0.0001
Negative	106	134	
<b>Low-Risk HPV</b>			
Positive	29	5	<0.0001
Negative	110	134	
<b>Universal HPV</b>			
Positive	22	4	0.0003
Negative	117	135	



Multiple Infections			
Positive	29	4	
Negative	110	135	<0.0001

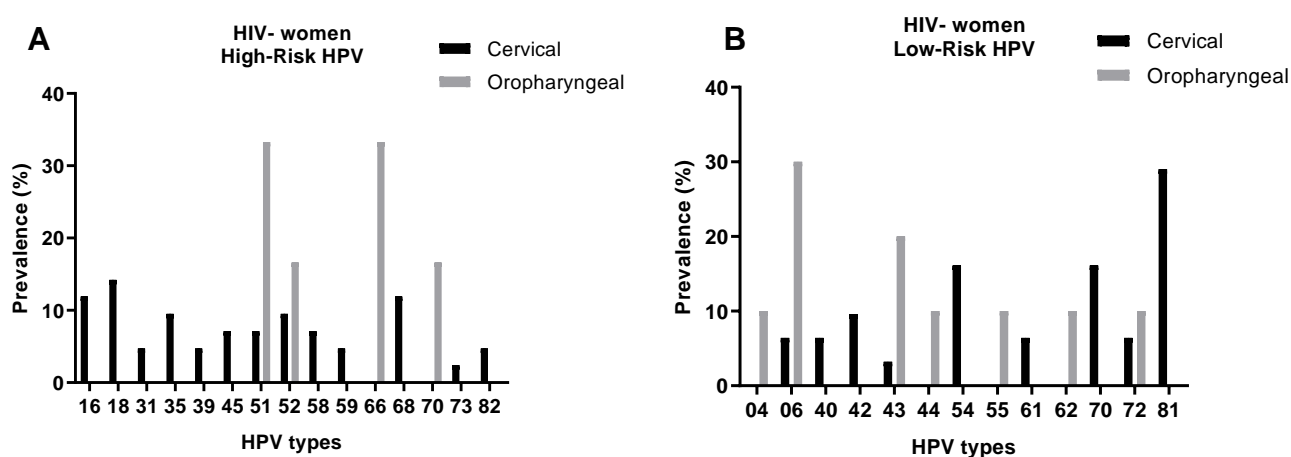
### 3.5. Cervical and oropharyngeal HPV type distribution

Among HIV+ women, the more frequent cervical HR-HPV types observed were HPV18, HPV58 and HPV45 (14.8% for each one). In the oropharyngeal mucosa, the HR-HPV most frequently found was HPV39 (33.3%) followed by HPV18, 45, 52 and 68 (16.6% for each one). The most frequent cervical LR-HPV type in this group was HPV6 (17.5%) followed by HPV 61 (12.5%), and the oropharyngeal LR-HPV types more prevalent were HPV6 (28.6%), 62 and 81 (21.4% for each one) (Figure 1).



**Figure 1. (A) High-risk HPV type distribution of all oropharyngeal and cervical infections detected among HIV+ women. (B) Low-risk HPV type distribution of all oropharyngeal and cervical infections detected among HIV- women.**

In the HIV- women the most frequent cervical HR-HPV type observed was HPV18 (14.2%), followed by HPV16 and 68 (11.9% for each one). The oropharyngeal HR-HPV most frequent were HPV51 and 66 (33.3% for each one). The cervical LR-HPV type more frequent were HPV81 (29.0%), 54 and 70 (16.1% for each one). HPV6 (30.0%) was the type most frequent in oropharyngeal mucosa, followed by HPV43 (20%) in this group (Figure 2).



**Figure 2. (A) High-risk HPV type distribution of all oropharyngeal and cervical infections detected among negative control group. (B) Low-risk HPV type distribution of all oropharyngeal and cervical infections detected among negative control group.**

### 3.6. Cervical and oropharyngeal HPV concordance

To understand the relationship of cervical to oropharyngeal HPV infection was investigate the prevalence concomitant in this population. Among HIV+ women 8 samples (6.9%) presented positive to simultaneous oropharyngeal and cervical HPV infection and to the HIV- women 7 samples (5%) were simultaneous infection. Both of groups we found no concordance in the types between cervical and

oropharyngeal sites.

#### **4. DISCUSSION**

We explore the HPV prevalence, distribution and the type concordance in cervical and oropharyngeal mucosa. Also, we identify predictors of cervical and oropharyngeal HPV infection. Pap smears showed no signs of malignancy in the majority of women from both groups; however, the HIV+ women presented higher frequency of cytological abnormalities than the HIV- women. HIV+ women had higher acquisition, prevalence and incidence of HPV cervical infection and lower HPV clearance compared to general population. Furthermore, the HPV acquisition was higher with CD4+ count cells decline and in additional, the HIV+ women have increased risk of HPV infection persisting and subsequent intraepithelial lesions and cervical cancer than HIV- women (18).

The results showed no significant difference of HPV detection in the uterine cervix or oropharyngeal mucosa between HIV+ and HIV- women, however the HPV infection was significant greater in cervical anatomic site than oropharyngeal mucosa in both groups. Study performed by Lima et al. (19) the HIV+ women exhibiting 6 times higher risk to have oropharyngeal HPV infection compared to HIV- women. On the other hands, many studies showed the HPV infection in cervical site appears to be substantially higher than oropharyngeal site in HIV+ women and the population in general (12, 13, 20).

The prevalence found to cervical HPV infection was 44.3% in HIV+ women and 37.4% in HIV-negative group. Studies with different population showed results varying 45–97.1% to HIV+ women and 44.9-86.5% in HIV- women in cervical site (12, 13, 19, 20). Compared to oropharyngeal HPV infection, the prevalence in HIV+ women were 14.8% and 9.4% to HIV- control. The results showed in other studies can be varying to 12-68.5% in HIV+ women and 2-31.4% in HIV- women (13, 19, 20). These results suggest that the prevalence of cervical and oropharyngeal HPV infection may vary widely according to the anatomical sites, study population, geographical region and detection methods applied, but the oropharyngeal HPV infection it seems to be less common independent of the population group studied.

The most frequent cervical HR-HPV type found in our study was HPV18, followed by 58 and 45 to HIV+ women. The negative control group the cervical HR-HPV18 also the most prevalent, followed by 16 and 58. The prevalence studies around the world shown the HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 52 and 58 are the most common found in cervical cancer, which HPV16 is responsible to cause over 50% of cases and HPV 18 is responsible to approximately 15% of these cases in general women (1). Although, studies have shown consistently that HIV+ women are frequently more infected with HR-HPV other than 16 and 18, but with types HR-HPV 52 and 58 (13, 21).

The oropharyngeal HPV type distribution in HIV+ women, HR-HPV39 was the most frequent, followed by 18, 45, 52 and 68 which these types were found frequently also in cervical samples in the same group. However, in the HIV-control group the oropharyngeal HR types observed was totally different, being HR-HPV51 and 66 the most frequents. The current evidence shown the HR-HPV16 was the most associated to oropharyngeal cavity cancer (22), but we not found this type in this present study. In other study with HIV+ women the HR types frequently detected in the oropharyngeal were HPV52, 55 and 83 (13, 23).

The simultaneous HPV cervical and oropharyngeal infection was low in both groups, moreover, no type concordance was found, which consist with previous studies (17, 19). This no concordance suggests a different predilection in different anatomical sites to the various HPV types, the ability of the two anatomical sites to clear the types or distinct exposures causing oropharyngeal and cervical HPV infections. Moreover, some types as HPV 51, 66 and 68, found frequently in oropharyngeal mucosa are not covered by the 9-valent HPV vaccine, raising concern about vaccine coverage and effectiveness to the HPV infection in different anatomical sites and decrease the prevalence of HPV-related cancers, mainly in HIV+ women.

#### **5. CONCLUSION**

The relevant clinical HPV infection in oropharyngeal mucosa is not completely understood, even more, the distribution concomitant of HPV types in different anatomical sites is poorly studied, mainly in HIV-positive women population. The HPV cervical infection was more prevalent in HIV positive and HIV negative control than oropharyngeal infection and there were no HPV types concordance between the two different anatomical sites. This could be because the HPV infection seems to be independent the anatomical sites, different risk factors and the natural history of the virus in cervical and oropharyngeal mucosa.

#### **FUNDING**

This study was supported by National Cancer Institute/National Institute of Health/US; NCI Parent Grant: P30 CA013148.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

We thank the collaborators of the Clinical Cytology Laboratory and STDs of State University of Maringá/Paraná/Brazil.

## REFERENCES

1. International Agency of Research on Cancer. Biological Agents. Vol 100B. Lyon, France; 2012.
2. Stier E. Human papillomavirus related diseases in HIV-infected individuals. *Curr Opin Ocon.* 2008; 20(5), 541-6.
3. Spangle JM and Münger K. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *J Virol.* 2010; 84(18): 9398-407.
4. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncol.* 2010; 11(8): 781-9.
5. Beachler DC, Abraham AG, Silverberg MJ, Jing Y, Fakhry C, Gill MJ, et al. Incidence and risk factors of HPV-related and HPV-unrelated head and neck squamous cell carcinoma in HIV-infected individuals. *Oropharyngeal Oncol.* 2014; 50(12): 1169-76.
6. Palefsky J. Human papillomavirus-related disease in people with HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009; 4(1): 52-6.
7. Brickman C, Palefsky J. Human papillomavirus in the HIV-infected host: epidemiology and pathogenesis in the antiretroviral era. *Curr HIV/AIDS Reports.* 2015; 12(1): 6-15.
8. Adler DH. The impact of HAART on HPV-related cervical disease. *Current HIV Research.* 2010; 8(7): 493-7.
9. Piketty C, Selinger-Leneman H, Bouvier AM, Belot A, Mary-Krause M, Duvivier C, et al. Incidence of HIV-related anal cancer remains increased despite long-term combined antiretroviral treatment: results from the french hospital database on HIV. *J Clin Oncol.* 2012; 30(35): 4360-6.
10. Ortiz AP, Pérez-Irrizary J, Soto-Salgado M, Suárez E, Pérez N, Cruz M, Palefsky J, et al. Peer Reviewed: Human Papillomavirus-Related Cancers Among People Living With AIDS in Puerto Rico. *Prev Chronic Dis.* 2014; 11: E80.
11. Luque AE, Hitti J, Mwachari C, Lane C, Messing S, Cohn SE, et al. Prevalence of human papillomavirus types in HIV-1-infected women in Seattle, USA and Nairobi, Kenya: results from the Women's HIV Interdisciplinary Network (WHIN). *Int J Infec Dis.* 2010; 14(9): e810-14.
12. Marais DJ, Passmore JS, Denny L, Sampson C, Allan BR and Williamson AL. Cervical and oropharyngeal human papillomavirus types in HIV-1 positive and negative women with cervical disease in South Africa. *J Medical Virol.* 2008; 80, 953-59.
13. Thorsteinsson K, Storgaard M, Katzenstein TL, Ladelund S, Rönsholt FF, Johansen IS, et al. Prevalence of cervical, oropharyngeal, anal human papillomavirus infection in women living with HIV in Denmark – The SHADE cohort study. *J Clin Virol.* 2016; 105, 64-71.
14. Chuang E, Lim E, Milne C, Zhu X, Agsalda M, J. Killeen J, et al. Human papillomavirus at multiple sites associated with anal squamous intraepithelial lesions in HIV-Seropositive individuals. *Ann Clin Cytol Pathol.* 2016; 2(4).
15. Menezes LJ, Poongulali S, Tommasino M, Lin HY, Kumarasamy N, Fisher KJ et al. Prevalence and concordance of human Papillomavirus infection at multiple anatomic sites among HIV-infected women from Chennai, India. *Int J STD AIDS.* 2016; 27(7): 543–53.
16. Ciccarese G, Herzum A, Rebora A, Drago F. Prevalence of genital, oropharyngeal, and anal HPV infection among STI patients in Italy. *J Med Virol.* 2017; 89(6): 1121–4.
17. Solomon, D; Nayar R. Bethesda system for cervical–vaginal cytology. *Revinter, Rio de Janeiro,* 2005:67-87.
18. Du P. Human papillomavirus infection and cervical cancer in HIV+ women. *Can Treat Res.* 2019; vol 177.
19. Lima MDM, Braz-Silva PH, Pereira SM, Riera C, Coelho AC, Gallottini M. Oropharyngeal and cervical HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women attending a sexual health clinic in São Paulo, Brazil. *Int J Gynecol Obstet.* 2014; 126, 33-6.
20. Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, Weber K, Goshu E, Minkoff H, et al. Relationship between prevalent oropharyngeal and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and –negative women. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(2), 4479-85.
21. McKenzie ND, Kobetz EN, Hnatyszyn J, Twiggs LB, Lucci JA. Women with HIV are more commonly infected with non-16 and -18 high-risk HPV types. *GynecolOncol* 2010; 116: 572-577.
22. Syrjänen, Stina, and Kari Syrjänen. HPV in head and neck carcinomas: Different HPV profiles in oropharyngeal carcinomas—why? *Acta cytologica.* 2019; 63(2): 124-42.
23. Wang CC, Palefsky JM. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in HIV-infected population. *Oropharyngeal Dis.* 2016; 22(1), 98-106.

**Keywords:** *Papillomavirus* infections; HIV; oropharynx.

## Fatores genéticos e estratégias para o controle da tuberculose e hanseníase



# AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MBL2* EM PACIENTES COM HANSENÍASE

**Evelyn Castillo Lima Vendramini<sup>1</sup>; Bruna Tiaki Tiyo<sup>2</sup>; Ana Jéssica Basso da Silva<sup>1</sup>; Hugo Vicentin Alves<sup>3</sup>, Quirino Alves De Lima Neto<sup>4</sup>, Ana Maria Sell<sup>5</sup>, Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>5</sup>**

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

2 Mestre pelo Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

3 Doutor pelo Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

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

e-mail: [vendramini.evelyn@gmail.com](mailto:vendramini.evelyn@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma antiga doença, cuja magnitude e alto poder incapacitante a mantêm como um problema de saúde público atual no Brasil. Apenas no ano de 2017 foram diagnosticados 26.875 novos casos de hanseníase perfazendo uma taxa de detecção de 12,8 casos/100 mil habitantes, parâmetros que classificam o país como de alta carga para a doença e o segundo com maior número de casos novos no mundo (1,2).

O agente etiológico *Mycobacterium leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória, com tropismo para células de Schwann e macrófagos. Os pacientes apresentam um quadro de infecção crônica granulomatosa da pele e nervos periféricos, com consequente dano a estes e prejuízo das funções motoras e sensoriais, além de deformidades incapacitantes. A transmissão se dá principalmente por aerossóis de secreções nasais e está relacionado ao contato próximo (3). De acordo com a classificação determinada pela OMS (1982), com finalidade terapêutica, pacientes hansenianos com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido são considerados paucibacilares (PB), e aqueles com seis ou mais lesões e/ou mais de um tronco nervoso acometido, multibacilares (MB) (4).

Estudos mostram que apenas 10% dos indivíduos infectados desenvolvem a doença o que pode ser explicado em parte pela presença de fatores intrínsecos do hospedeiro, especialmente no que diz respeito aos genes de resposta imune (5,6). Diversos genes já foram relacionados com a susceptibilidade ou proteção para o desenvolvimento da hanseníase, entre eles *TLRs*, *NOD2*, *VDR*, *MICA*, *KIR*, *TNF*, *MBL2*, entre outros (7).

A Lectina Ligante de Manose (MBL), codificada pelo gene *MBL2*, realiza o reconhecimento de padrão da via das lectinas no sistema complemento. Já foi demonstrado que esta molécula é capaz de reconhecer micobactérias e participa na sua captação pelos fagócitos, com consequente disseminação do patógeno e estabelecimento da infecção (8,9). Dornelles e colaboradores verificaram que a deficiência de MBL confere proteção contra a forma mais severa de hanseníase (10).

O gene *MBL2* possui natureza polimórfica e estas variações podem afetar tanto os níveis séricos da proteína, quanto sua conformação e função (11). Os dados de um estudo realizado com gêmeos adultos indicam uma forte influência genética para os níveis séricos de MBL (12). Uma das variações possíveis são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), uma mutação observada em um único nucleotídeo em uma posição determinada. Estudos realizados em populações brasileiras, colombianas e chinesas relataram associação de alguns SNPs com a hanseníase e suas formas clínicas (13–15). Contudo, nenhum estudo foi realizado com estes SNPs na nossa região. Portanto, este estudo teve como objetivo verificar a influência dos polimorfismos rs11003125 (-550 H/L) e rs7096206 (-221 X/Y) localizados na região promotora do gene *MBL2* e seus haplótipos formados com o éxon 1 na imunopatogênese da hanseníase.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Sujeitos de pesquisa

Estes estudo caso-controle foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEM sob o número 2.424.046/2017. Os indivíduos participantes eram residentes da região norte e noroeste do Paraná. A etnia não foi incluída como covariável na análise, pois a população foi considerada miscigenada (16). Todos os sujeitos da pesquisa foram informados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O grupo caso foi composto por pacientes hansenianos que foram diagnosticados por dermatologistas experientes no CISAMUSEP (Consórcio Público Intermunicipal de Saúde), na cidade de Maringá. O grupo controle foi composto tanto por doadores de sangue ou medula óssea do Hemocentro Regional de Maringá, quanto por indivíduos não consanguíneos, que estiveram em contato prolongado com os pacientes hansenianos. Estes indivíduos do grupo controle não foram diagnosticados para hanseníase ou outras doenças infecciosas e autoimunes. Foi possível a junção destes grupos controles visto que não houve diferença significativa nas frequências genotípicas para os SNPs estudados entre os grupos.

## 2.2 Genotipagem dos polimorfismos de *MBL2*

O DNA genômico foi extraído a partir de amostras de sangue periférico em EDTA, utilizando o kit comercial BIOPUR® (Mobius Life Science, Curitiba, Paraná, Brasil), conforme as recomendações do fabricante. Para a genotipagem dos polimorfismos no gene *MBL2* foi empregado o método descrito por Steffensen e colaboradores (17) com modificações, por meio da reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos iniciadores de sequência específicos, do inglês: Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers (PCR-SSP).

A reação de PCR-SSP para os SNPs rs11003125 e rs7096206 foi realizada em volume final de 10  $\mu$ L com 50-100 ng de DNA, 1,2 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTP, 0,25  $\mu$ M de primers específicos, 0,1  $\mu$ M de primers de controle interno (C3/C5) e 0,5 U de Taq DNA Polimerase. As seguintes condições foram utilizadas para a ciclagem: 1 ciclo: 10 min – 95°C 30 ciclos: 30 s – 94°C, 30 s – 62°C e 45 s – 72°C; 1 ciclo: 5 min – 72°C. A detecção dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese de DNA em gel de agarose 2% com SYBR Safe e visualizada em luz ultravioleta.

## 2.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas SNPStats (disponível em: <https://www.snpstats.net/>) (18), GraphPad (disponível em: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/>), OpenEpi Versão 3.01 (disponível em: [www.openepi.com](http://www.openepi.com)). Os grupos de pacientes e controles foram pareados por idade utilizando o teste *t* de Student e por sexo utilizando o teste exato de Fisher. Foram calculadas as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas e equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada SNP. A comparação entre as frequências dos SNPs em pacientes com hanseníase (*per se*, MB e PB) e controles foi realizada por análise multivariada, ajustando para as variáveis gênero e idade. O melhor modelo de herança foi escolhido baseado no critério de informação Akaike (AIC). Os modelos de herança genética considerados foram codominante, dominante, recessivo, overdominante e log-aditivo. Além disso, foram calculados por regressão logística a interação entre os SNPs, a hanseníase e suas formas e a covariável sexo. Para ambas análises foram calculados o Odds Ratio (OR) e o Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

Para a análise dos haplótipos, foram utilizadas as frequências de três SNPs presentes no éxon 1 do gene *MBL2*, variante D (rs5030737), B (rs1800450) e C (rs1800451), previamente genotipados no laboratório de imunogenética da UEM. Estes SNPs foram representados pela letra “O” para as variantes D, B e C, e pela letra “A” para o alelo selvagem (19,20). Os haplótipos foram formados pelos dois SNPs da região promotora (rs11003125 e rs7096206) e os três da região do éxon 1 do gene *MBL2*. As frequências haplotípicas foram estimadas utilizando os algoritmos de maximização de expectativa.

O poder estatístico da amostragem deste trabalho foi calculado pelo software QUANTO (21), no qual leva-se em consideração as frequências dos SNPs na população e a prevalência da doença. Foi considerado como adequado poder estatístico igual a 80%. Foi considerado estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs11003125 e rs7096206 foram analisadas para 225 pacientes com hanseníase (100 mulheres e 125 homens, idade média de 54,08 anos  $\pm$  13,31) e 245 controles (118 mulheres e 127 homens, idade média de 56,12 anos  $\pm$  13,58), sendo que 161 pacientes foram classificados como forma MB e 53 pacientes como forma PB. Para 11 pacientes não foi informada a forma clínica, sendo incluídos apenas na análise multivariada entre pacientes com hanseníase *per se* e controles. Os sujeitos foram pareados por idade e gênero em todas as análises.

A distribuição das frequências dos genótipos para todos os polimorfismos analisados estava consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ). As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estão descritas na **Tabela 1** e as frequências haplotípicas (frequências maiores que 1%) estão descritas na **Tabela 2**. Não houve diferença significativa na distribuição das frequências de alelos, genótipos e haplótipos comparando pacientes com hanseníase *per se* e controles ou comparando os subgrupos MB e PB com controles para os SNPs analisados da região promotora. Para o polimorfismo rs11003125, o alelo e genótipo selvagem (L e L/L) foi o mais frequente em pacientes com hanseníase *per se* e forma PB e também em

controles. No grupo de pacientes com a forma MB, o genótipo L/H foi mais frequente. Para o SNP rs7096206 o alelo e genótipo mais frequente foi o mutado (Y e Y/Y) em todos os grupos. O haplótipo LYA foi o mais frequente em pacientes com hanseníase *per se*, pacientes com a forma PB da hanseníase e controles. O haplótipo HYA foi o mais frequente em pacientes multibacilares.

**Tabela 1. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da região promotora MBL2 em pacientes com hanseníase e suas formas clínicas e controles**

SNP	Alelo/ Genótipo	Pacientes com hanseníase (N=225)			Controles (N=245) n (%)
		<i>per se</i> (N=225) n (%)	MB (N=161) n (%)	PB (N=53) n (%)	
rs11003125 (-550 H/L)	L	295 (65,6)	208 (64,6)	73 (68,9)	345 (70,4)
	H	155 (34,4)	114 (35,4)	33 (31,1)	145 (29,6)
	L/L	100 (44,4)	68 (42,2)	27 (50,9)	124 (50,6)
	L/H	95 (42,2)	72 (44,7)	19 (35,8)	97 (39,6)
	H/H	30 (13,3)	21 (13)	7 (13,2)	24 (9,8)
rs7096206 (-221 X/Y)	X	83 (18,4)	55 (17,1)	25 (23,6)	92 (18,8)
	Y	367 (81,6)	267 (82,9)	81 (76,4)	398 (81,2)
	X/X	11 (4,9)	6 (3,7)	5 (9,4)	10 (4,1)
	Y/X	61 (27,1)	43 (26,7)	15 (28,3)	72 (29,4)
	Y/Y	153 (68)	112 (69,6)	33 (62,3)	163 (66,5)

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; N: número de indivíduos; %: frequência em porcentagem; n: número de alelos ou genótipos; MB: multibacilar; PB: paucibacilar.

**Tabela 2. Frequência estimada dos haplótipos da região promotora e éxon 1 do gene MBL2 em pacientes com hanseníase e suas formas clínicas e controles**

Haplótipo	Pacientes com hanseníase (N=225)			Controles (N=245) %
	<i>per se</i> (N=225) %	MB (N=161) %	PB (N=53) %	
LYA	29,61	28,22	34,84	33,08
HYA	28,22	29,02	27,42	24,88
LXA	18,18	16,67	23,58	18,78
LYO	17,77	19,7	10,44	18,56
HYO	5,96	5,98	3,71	4,71

N: número de indivíduos; %: frequência em porcentagem; MB: multibacilar; PB: paucibacilar. Frequências maiores que 0,001 estão representadas.

Na análise de regressão, considerando o polimorfismo e o sexo, o genótipo L/H do SNP rs11003125 foi relacionado com maior risco para forma MB da hanseníase em homens, quando comparado ao genótipo L/L em mulheres (OR: 1,87; IC: 1,03-3,39). Além disso, o genótipo Y/Y do SNP rs7096206 foi relacionado com maior risco para forma MB da hanseníase em homens, quando comparado ao mesmo genótipo em mulheres (OR: 1,82; IC: 1,11-2,99) (**Tabela 3**). Na análise de regressão considerando os haplótipos, foi observado risco para desenvolvimento da forma MB em homens com o haplótipo HYA em comparação com o haplótipo LYA em mulheres (OR: 3,75; IC: 1,47 – 9,58) e também em relação ao haplótipo HYA em mulheres (OR: 2,75; IC: 1,40-5,52).

**Tabela 3. Distribuição da frequência de genótipos entre pacientes com forma multibacilar da hanseníase e controles, após estratificação por gênero**

SNP	Genótipos	Feminino		OR (IC 95%)	Masculino		OR (IC 95%)
		MB (N=62) n (%)	Controles (N=117) n (%)		MB (N=98) n (%)	Controles (N=126) n (%)	
rs11003125 (-550 H/L)	L/L	29 (46,8)	60 (51,3)	Ref.	38 (38,8)	64 (50,8)	<b>1,87 (1,03-3,39)<sup>a</sup></b>
	L/H	25 (40,3)	45 (38,5)		47 (48)	51 (40,5)	
	H/H	8 (12,9)	12 (10,3)		13 (13,3)	11 (8,7)	

<b>rs7096206</b> (-221 X/Y)	<b>Y/Y</b>	39 (62,9)	80 (68,4)	Ref.	73 (74,5)	81 (64,3)	<b>1,82 (1,11-2,99)<sup>b</sup></b>
	<b>Y/X</b>	21 (33,9)	33 (28,2)		21 (21,4)	39 (31)	
	<b>X/X</b>	2 (3,2)	4 (3,4)		4 (4,1)	6 (4,8)	

Análise multivariada ajustada por idade. Apenas resultados significativos estão apresentados. SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; N: número de indivíduos; n: frequência dos genótipos; %: frequência em porcentagem; MB: hanseníase multibacilar; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; Ref.: genótipo utilizado como referência. Análise univariada <sup>a</sup>: P valor = 0,046; <sup>b</sup>: P valor = 0,02.

#### 4. DISCUSSÃO

Ainda que a exposição ao bacilo seja uma etapa necessária para a patogênese da hanseníase, nem todos os indivíduos que entram em contato com o bacilo desenvolvem a doença, e dentre aqueles que a desenvolvem, pode-se observar um amplo espectro de manifestações clínicas. Estudos epidemiológicos têm indicado a influência dos fatores genéticos do hospedeiro nesta variabilidade de resposta. Neste estudo, comparando controles e pacientes com a forma MB da hanseníase, os genótipos L/H e Y/Y e o haplótipo HYA formado com o éxon 1 foram associados com risco para esta forma em homens.

Mutações no gene *MBL2* interferem na estrutura da proteína e na sua expressão. Os SNPs da região promotora, rs11003125 (-550 H/L) e rs7096206 (-221 X/Y), estão associados com alteração dos níveis transcritoriais de MBL, e consequentemente, dos níveis séricos da lectina. Os SNPs do éxon 1 foram relacionados com a redução dos níveis séricos de MBL. O SNP rs1800450 (variante B) leva a formação de subunidades não funcionais e interfere com a formação de oligômeros maiores de MBL (20,22).

Resultados de outros estudos são discordantes de nossos achados. Numa população chinesa, na comparação entre controles e pacientes MB o genótipo L/H conferiu proteção para esta forma, enquanto na comparação entre controles e pacientes PB o genótipo X/Y foi associado a risco para esta forma (14). Em outro estudo realizado na região nordeste do Brasil nenhuma associação foi observada entre estes polimorfismos do gene *MBL2* com a susceptibilidade à hanseníase ou suas formas clínicas (19). Diferenças entre as etnias chinesa e brasileira ou mesmo dentro da população brasileira, podem estar associadas com estas divergências.

O haplótipo HYA foi relacionado anteriormente com altos níveis séricos de MBL (19). Outro haplótipo relacionado a altos níveis de expressão da proteína, LYPA, foi associado a um aumento de 2 vezes a susceptibilidade para hanseníase *per se*, em um estudo realizado também no Paraná, na região leste (23). Garred e colaboradores observaram que concentrações séricas de MBL foram significativamente maiores em pacientes com formas clínicas lepromatosa ou borderline lepromatosa (24), que podem ser correlacionadas com a forma MB (25). Alguns trabalhos sugerem que o reconhecimento da lipoarabinomanana (LAM), presente na micobactéria, pela MBL promove um aumento na ingestão do patógeno pelos fagócitos. Porém, ao invés desta interação favorecer a eliminação do patógeno, pode facilitar a captação e disseminação do mesmo (10,13). Somado a isto, pode-se considerar o fato de que a forma MB é impulsionada pela resposta Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias, inibindo a função microbicida dos macrófagos e favorecendo a um polo da doença com alta carga bacteriana (7).

Todas as associações observadas neste estudo foram em indivíduos do sexo masculino. Um estudo observacional realizado no Brasil com mais de 500.000 casos observou que homens tinham duas vezes mais chance de desenvolver a forma MB da hanseníase que mulheres (26). O maior risco em homens parece estar relacionado com maior exposição ao bacilo e também à ação hormonal. Em modelos experimentais de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, um perfil de citocinas relacionada à resposta Th1 foi observado em fêmeas e machos castrados. Os machos não castrados apresentavam maior carga do bacilo (27). Outro estudo com modelo *in vitro* de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, também intracelular e mais frequente em homens, observou produção de citocinas relacionadas à resposta Th2 em células do baço de camundongos machos infectados pelo patógeno (28).

Não foi observada neste estudo diferença significativa na distribuição das frequências de alelos, genótipos e haplótipos comparando pacientes com hanseníase *per se* e controles ou comparando os subgrupos MB e PB com controles para os SNPs analisados da região promotora. Especialmente nas comparações com a forma PB, o poder estatístico foi uma limitação importante.

Estes resultados apresentados são parciais. O aumento da amostragem e a genotipagem do polimorfismo rs7095891 (+4 P/Q) na região promotora, bem como a dosagem sérica de MBL nos pacientes serão realizados. Com isso, nossos resultados serão complementados a fim de possibilitar um maior entendimento da influência destes polimorfismos e principalmente, dos haplótipos, na patogênese da hanseníase.

#### 5. CONCLUSÃO

Em nossa população, os polimorfismos da região promotora e o haplótipo HYA formado com o éxon 1 do gene *MBL2* estão relacionados com a susceptibilidade para a forma multibacilar da hanseníase em homens.



## FINANCIADORES

CAPES, CNPq e LIG-UEM.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara J. de T. Messias-Reason, do Laboratório de Imunopatologia Molecular, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, por disponibilizar amostras controles para a padronização das reações de PCR-SSP e ao “Consórcio Público Intermunicipal de Saúde do Setentrião Paranaense” (CISAMUSEP), Maringá-PR, Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leprosy: situation and trends [Internet]. 2017 [Acesso em 6 Ago 2019]. Disponível em: [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leprosy/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leprosy/en/)
2. Brasil (Ministério da Saúde). Hanseníase. Boletim epidemiológico. 2018;49(4):0–11.
3. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 2004;363:1209–19.
4. Parkash O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009 Jan 1;55(1):1–5.
5. Casanova J, Abel L. Genetic Dissection of Immunity of Mycobacteria: The Human Model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):581–620.
6. Alcais A, Mira M, Casanova J, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:44–8.
7. Mazini PS, Alves HV, Reis PG, Lopes AP, Sell AM, Santos-Rosa M, et al. Gene Association with Leprosy: A Review of Published Data. *Front Immunol*. 2016 Jan 12;6:658.
8. Bonar A, Chmiela M, Rudnicka W, Rózalska B. Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro. *Arch Immunol Ther Exp*. 2005;53(5):1–2.
9. Bartłomiejczyk MA, Swierzek AS, Brzostek A, Dziadek J, Cedzynski M. Interaction of lectin pathway of complement-activating pattern recognition molecules with Mycobacteria. 2014 Nov 1;178(2):310–9.
10. Dornelles LN, Pereira-Ferrari L, Messias-Reason I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. *Clin Exp Immunol*. 2006;145:463–8.
11. Heitzeneder S, Seidel M, Förster-waldl E, Heitger A. Mannan-binding lectin deficiency — Good news, bad news, doesn't matter? *Clin Immunol*. 2012;143(1):22–38.
12. Sorensen GL, Petersen I, Thiel S, Fenger M, Christensen K, Kyvik KO, et al. Genetic influences on mannan-binding lectin (MBL) and mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) activity. *Genet Epidemiol*. 2007 Jan;31(1):31–41.
13. Messias-reason IJ De, Boldt BW, Carolina A, Braga M, Rosen E Von, Stahlke S, et al. The Association between Mannan-Binding Lectin Gene Polymorphism and Clinical Leprosy: New Insight into an Old Paradigm. *J Infect Dis*. 2007;196:1379–85.
14. Zhang D-F, Huang X-Q, Wang D, Li Y-Y, Yao Y-G. Genetic variants of complement genes Ficolin-2, Mannose-binding lectin and Complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet*. 2013;132:629–40.
15. Cardona-Pemberthy V, Rendón M, Camilo J, Soto-ospina A, Muñoz-gomez A, Araque-marín P, et al. Genetic variants, structural, and functional changes of Myelin Protein Zero and Mannose-Binding Lectin 2 protein involved in immune response and its allelic transmission in families of patients with leprosy in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2018;61(March):215–23.
16. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, Dalalio MM de O, Visentainer JEL, Tsuneto LT, et al. HLA Polymorphism and Evaluation of European, African and Amerindian Contribution to the White and Mulatto Populations From Paraná, Brazil. *Hum Biol*. 2000;72(4):597–617.
17. Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Christian J. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J Immunol Methods*. 2000;241:33–42.
18. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928–9.
19. Vasconcelos LRS, Fonseca JPL, Carmo RF do, Mendonça TF de, Pereira VRA, Lucena-Silva N, et al. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. *Int J Infect Dis*. 2011;15(8):551–7.
20. Garred P, Genster N, Pilely K, Rosbjerg A, Jie Y, Skjoedt MM. A journey through the lectin pathway of complement — MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016;274:74–97.
21. Gauderman WJ. Sample Size Requirements for Association Studies of Gene-Gene Interaction. *Am J*

- Epidemiol. 2002 Mar 1;155(5):478–84.
22. Kalia N, Sharma A, Kaur M, Kamboj SS, Singh J. A comprehensive in silico analysis of non-synonymous and regulatory SNPs of human MBL2 gene. Springerplus. 2016;5(811).
  23. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. Mol Immunol. 2003 Sep 1;40(2–4):73–84.
  24. Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A, Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A, et al. Dual Role of Mannan-Binding Protein in Infections: Another case of heterosis? Eur J Immunogenet. 1994 Apr 1;21(2):125–31.
  25. Souza CS. Leprosy: Clinical forms and differential diagnosis. Med (Ribeirão Preto). 1997;30:325–34.
  26. Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker M de A, Nery JA da C, Jerônimo SMB, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Feb 13;11(2):e0005364.
  27. Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AF, et al. The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. PLoS One. 2014 Apr 10;9(4):e93831.
  28. Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira M-C. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. PLoS One. 2010 May 21;5(5):e10757.

**Palavras-chave:** hanseníase; lectina de ligação à manose; predisposição genética para doença.

## EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE ESTREPTOMICINA COM O INIBIDOR PIPERINA EM *Mycobacterium tuberculosis*

Leonora Lacerda Calsavara<sup>1</sup>; Eloísa Gibin Sampiron<sup>2</sup>; Letícia Sayuri Murase<sup>2</sup>; João Vitor Perez de Souza<sup>3</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>4</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>4</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>4</sup>, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: lacerdaleonora@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (1). Segundo o Global Tuberculosis Report da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018 foram gastos mundialmente 6,9 milhões de dólares com ações de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença (1). Apesar dos esforços, a TB ainda se encontra entre as 10 principais causas de morte no mundo, sendo 1,3 milhões de mortes no ano de 2017. Esse índice não inclui os casos de TB associados à co-infecção com o vírus HIV que quando contabilizados acrescentam em quase 300.000 o número de mortes (1). Atualmente, estima-se que 23% da população mundial possui a TB na sua forma latente. Em relação a sua incidência, somente no ano de 2017 foram 10 milhões de casos novos em todo o mundo, só no Brasil foram 70.000, sendo Manaus, Rio de Janeiro e Recife as capitais com maior incidência da doença (2). Na nossa região, ocorreram 1.947 casos novos no estado do Paraná e 18,5 casos a cada 100.000 habitantes na cidade de Maringá (3).

O tratamento da TB visa a rápida eliminação do bacilo a fim de evitar o surgimento de mutantes resistentes e interromper a transmissão da doença (4). Num primeiro momento (1944), a estreptomicina (SM), um aminoglicosídeo, foi utilizado na forma de monoterapia no tratamento da TB. Com o surgimento de cepas resistentes, a SM foi retirada do esquema básico de tratamento, permanecendo como fármaco de segunda linha, e foram incluídos outros fármacos anti-TB como isoniazida (1952) e rifampicina (1965) (5).

Atualmente, o esquema básico de tratamento recomendado pela OMS é poliquimioterápico e composto por duas fases: fase intensiva, com duração de dois meses e composta pela administração de isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, e fase de manutenção, com duração de 4 meses, composta pela continuação dos antituberculosos isoniazida e rifampicina (5).

Algumas características constitutivas determinam a resistência intrínseca dos bacilos aos fármacos de amplo espectro utilizados no tratamento da TB. A principal característica é a constituição da parede celular das micobactérias, de alto conteúdo lipídico, que dificulta a entrada dos antibióticos no interior do bacilo. Também, alguns receptores e enzimas micobacterianas impedem a ação de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos (6). Atualmente, a resistência aos medicamentos anti-TB tem sido atribuída principalmente à presença de mutações espontâneas no genoma do bacilo. Entretanto, em certa parcela dos isolados clínicos, a resistência não pode ser explicada pela presença de mutações gênicas (7).

Recentemente, a resistência mediada por bombas de efluxo (BEs), mecanismo que pode conferir resistência a um ou vários fármacos, foi descrita em micobactérias (8). A estratégia da combinação de substâncias capazes de inibir as BEs com fármacos empregados no tratamento padrão da TB tem sido apontada como promissora (9). *In vitro*, esses inibidores fazem com que as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de alguns anti-micobacterianos diminuam consideravelmente (10).

Neste contexto, temos o inibidor piperina (PIP), um composto bioativo da *Piper nigrum* e *Piper longum* (11). Diversos estudos têm relatado atividade desta substância como: imunomoduladora, hepatoprotetora, anti-inflamatória (12), antimicrobiana (13), anti-oxidante (11) e efeitos biotransformativos em reações enzimáticas, além de aumentar a absorção de drogas, tais como rifampicina, sulfadiazina, tetraciclina e fenitoína (14). *In vitro*, a PIP combinada com fármacos anti-TB tem se mostrado capaz de potencializar a

atividade deste antimicrobiano contra a cepa padrão *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv e isolados clínicos resistentes, o que confirma a PIP como um potencial inibidor de BEs (IBEs) (9,15).

A associação de IBEs com SM ainda é inicial e poucos dados são encontrados na literatura. Neste sentido, tendo em vista a possibilidade da reutilização/reintrodução da SM no esquema básico de tratamento da TB, principalmente em sua forma resistente, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito modulatório da PIP sobre a atividade da SM em *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv e isolados clínicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostra bacteriana**

Foram estudados a cepa de referência *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) e sete isolados clínicos com perfil de sensibilidade aos fármacos previamente determinados pelo método das proporções (3 sensível, 3 monoresistente a estreptomicina e 1 multifármaco resistente (MDR). Todos os isolados foram provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Os bacilos foram cultivados por aprox. 15 dias em Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI, USA) suplementado com OADC (Ac. Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase) para a realização dos ensaios.

### **2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Soluções de SM e PIP foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante. A CIM de SM foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* – REMA, como descrito por Palomino *et al*, 2012 (16). Para realização do ensaio foram utilizadas microplacas de 96 cavidades nas quais os fármacos do estudo foram diluídos seriadamente, sendo de 2 a 0,003µg/mL e de 400 a 3,1µg/mL para SM e PIP, respectivamente. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi padronizada com a escala de McFarland n<sup>o</sup>1 seguida de diluição 1:20 e adição às cavidades da microplaca. As microplacas foram seladas e incubadas a 35°C em atmosfera normal por 7 dias. Após esse período, 30µL de solução de resazurina 0,02% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) foi adicionada e as placas re-incubadas a 35° C por 24h. A mudança de cor do azul para rosa pela redução da resazurina foi considerada como indicativo de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir a mudança de cor da resazurina (inibição do crescimento bacteriano).

### **2.3. Determinação do efeito combinatório de estreptomicina com piperina em pH neutro**

O efeito combinatório entre SM e PIP foi avaliado pela técnica de *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA) descrita por Caleffi-Ferracioli *et al*, 2013 (17). O ensaio foi realizado em microplacas e os fármacos do estudo foram diluídos seriadamente (SM em sentido horizontal e piperina na vertical). Posteriormente, a suspensão bacteriana foi padronizada com a escala de McFarland n<sup>o</sup>1 seguida de diluição 1:20 e adição às cavidades da microplaca. As microplacas foram seladas e incubadas a 35°C por 7 dias. Após esse período, 30µL de solução de resazurina 0,02% foi adicionada e as placas re-incubadas a 35° C por 24h. A leitura foi visual e o resultado interpretado com base no Fator Modulador (FM), onde FM= (CIM SM/ CIM SM+PIP) (18). O FM reflete as mudanças ocorridas na CIM de SM quando combinado a PIP. O efeito modulatório foi considerado significativo quando FM ≥ 4 (redução de quatro vezes no valor da CIM do fármaco de referência). Os ensaios foram realizados em duplicata e os respectivos FMs foram apresentados na forma de média simples.

### **2.4 Determinação do efeito combinatório de estreptomicina com piperina em diferentes condições de meio de cultura**

O efeito combinatório entre os fármacos foi avaliado em *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv seguindo a mesma metodologia de REDCA, anteriormente citada, com as seguintes variações no meio Middlebrook 7H9+OADC: pH 6,0 (ácido) e suplementação de 4% com Soro Fetal Bovino. Os diferentes ensaios foram realizados em duplicata (dias diferentes) e o FM foi calculado a partir da média dos ensaios.

### **2.5. Avaliação da atividade inibitória da piperina sobre bombas de efluxo (BE) por acúmulo de brometo de etídio**

O ensaio para avaliação da inibição de BEs pela PIP foi realizado como descrito por Caleffi-Ferracioli *et al*, 2016 (19), com modificações. A suspensão bacteriana dos bacilos foi ajustada para DO<sub>600</sub> (0,4) seguida de duas lavagens em tampão fosfato de sódio (PBS) por meio de centrifugação (2889 x g por 10 minutos). O ensaio foi realizado em microplaca onde foram adicionados 100µL de PBS, 50µL (25µg/mL) do inibidor PIP e o inibidor padrão carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP) na concentração ½ CIM (0,75µg/mL). Posteriormente, foram adicionados 50µL de brometo de etídio e 100µL das suspensões bacterianas de estudo. A microplaca foi incubada por 15 minutos a 25°C ao abrigo da luz. A leitura da fluorescência relativa (excitação 530/25nm e emissão 590/20nm) foi realizada a cada 3 minutos em Fluorímetro (FlexStation 3 - Molecular Devices, San Jose, CA, USA) totalizando 60 minutos de leitura.

### **2.6. Avaliação da combinação de estreptomicina com piperina em ambiente extra e intramacrofágico**

Para o ensaio intramacrofágico, a suspensão bacteriana de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv foi ajustada para DO<sub>600</sub>= 0,066 e suspendida em RPMI (MOI 1:5). O ensaio foi realizado em placa com 26 cavidades com



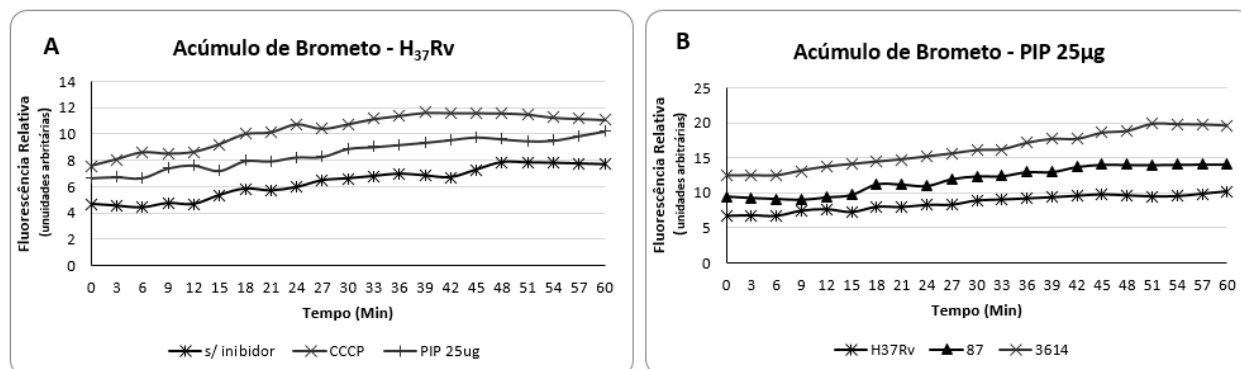


**Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos estreptomicina e piperina para a cepa padrão *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> em diferentes condições de meio de cultura.**

Middlebrook 7H9 modificado	CIM (µg/mL)		
	SM	PIP	FM
pH 7,4	0,25	100	08
pH 6,0	0,50	25	10
SFB (4%)	0,25	50	02

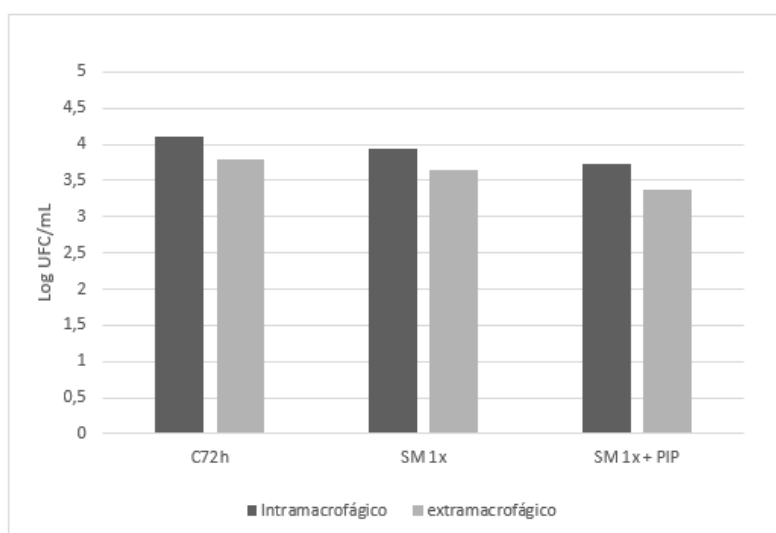
\*FM: Fator Modulador; SM: estreptomicina; PIP: piperina; SFB: Soro Fetal Bovino a 4%

Para o ensaio de acúmulo de brometo de etídio foi utilizado a cepa *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> e dois isolados clínicos: 87 e 3614 (Figura 1). A figura 1A apresenta o poder de acúmulo do brometo de etídio quando a cepa padrão foi exposta à PIP comparado ao CCCP, e na figura 1B apresenta uma comparação do poder inibitório da PIP na atividade das BEs frente aos bacilos 87 (monorresistente à SM) e 3614 (MDR).



**Figura 1. Gráfico de fluorescência relativa do ensaio de acúmulo de brometo de etídio. A) *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> exposto à piperina (25 µg/mL) e ao CCCP (0,75 µg/mL). B) Comparação do poder de acúmulo dos isolados clínicos (87 – monorresistente a estreptomicina e 3614 multifármaco resistente) de *M. tuberculosis* frente à exposição ao inibidor de bomba de efluxo piperina na concentração fixa de 25µg/mL.**

O resultado do efeito combinatório de SM (1x CIM) e PIP (25µg/mL) comparado ao efeito da SM isolada sobre cepa H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> em ambiente extra e intramacrofágico foi apresentado na figura 2. Como controle do ensaio foi utilizado o bacilo não exposto aos fármacos.



**Figura 2. Análise comparativa do efeito combinado de estreptomicina (SM 1xCIM) com piperina (PIP - 25µg/mL), estreptomicina isoladamente e controle (sem fármacos) sobre a cepa *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> em ambiente extramacrofágico e intramacrofágico (J774.A1) após 72h de exposição.**

#### 4. DISCUSSÃO

As BEs são proteínas de parede capazes de realizar a extrusão de substâncias nocivas em direção ao meio extracelular. Em razão disso, as BEs são capazes de conferir resistência a diversas classes de fármacos, compondo um importante mecanismo de resistência bacteriana. Frequentemente, o aumento da atividade das BEs aparece como primeiro mecanismo de evasão das bactérias. A diminuição da concentração dos fármacos no meio intracelular aumenta a chance de sobrevivência das bactérias e consequentemente à seleção de mutantes resistentes. Dessa forma, a combinação de inibidores de BEs aos fármacos empregados no tratamento padrão da TB é uma estratégia muito promissora no combate as cepas resistentes, pois permite o melhor aproveitamento dos recursos antibióticos já existentes.

Tendo em vista a possibilidade do resgate do uso da SM no esquema básico de tratamento da TB, principalmente no combate as cepas resistentes. Neste estudo, a capacidade inibitória da PIP em combinação com a SM e o efeito sobre as BEs foi avaliada.

A fim de garantir a originalidade dos resultados, os bacilos estudados foram previamente genotipados por MIRU e *Spoligotyping* e confirmaram origem genética distinta. O ensaio de REDCA mostrou que a combinação de PIP (25µg/mL) ao anti-TB SM foi capaz de reduzir a CIM de SM em até 64 vezes. A possibilidade de utilizar uma menor concentração de SM é especialmente importante pela possível redução dos efeitos tóxicos relacionados ao seu uso, fator de peso no longo tratamento da TB.

O efeito modulatório da PIP na atividade da SM (FM≥4) foi mantido no ensaio realizado em Middlebrook 7H9 ajustado para pH 6,0 quando comparado ao ensaio em pH 7,4. Este resultado sugere que esta combinação de fármacos possivelmente mantém seu efeito no interior dos macrófagos, o que foi também observado no ensaio intramacrofágico. É interessante ressaltar que embora a molécula de SM apresenta grande dificuldade em atravessar membranas celulares, após 72h de exposição do bacilo em ambiente intramacrofágico à combinação de SM+PIP, uma redução na UFC foi observada em relação a SM sozinha e ao controle (bacilo não exposto). No ensaio intramacrofágico, apesar de mantida a eficiência da combinação SM+PIP, foi no ensaio extramacrofágico que a redução da UFC quando comparada a exposição à SM sozinha foi mais acentuada. Este resultado sugere uma melhor atividade dos fármacos estudados quando o bacilo se encontra no ambiente extracelular. Por outro lado, este resultado talvez poderia ser diferente com aumento do tempo de exposição dos macrófagos a SM.

O efeito modulatório de PIP em SM não se manteve quando o ensaio foi realizado em middlebrook 7H9 suplementado com 4% SFB. A interferência de proteínas plasmáticas na atividade dos fármacos está sendo confirmada em ensaio de suplementação do meio de cultura com 4% albumina.

Neste estudo, a capacidade inibitória da PIP sobre as BEs foi avaliada através do ensaio de acúmulo de brometo de etídio. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv foi o bacilo que mostrou menor poder de acúmulo de brometo de etídio quando comparado aos demais bacilos estudados. No entanto, este resultado já era esperado considerando o perfil de sensibilidade da cepa padrão. Ainda em relação a esta cepa, o poder inibitório da PIP se mostrou inferior ao inibidor de referência CCCP. A PIP (25µg/mL) se mostrou um eficiente inibidor de BEs principalmente no isolado clínico MDR (3614), como já esperado, uma vez que este bacilo possui resistência à múltiplos fármacos.

A atividade das BEs aparece como primeiro mecanismo de evasão das bactérias frente a exposição aos fármacos. Possivelmente várias BEs estão envolvidas neste mecanismo de resistência bacteriana. Didaticamente, as BEs são divididas em cinco famílias: superfamília *ATP Binding Cassete (ABC)*, *Major Facilitator Superfamily (MFS)*, *Resistecce Nodulation Cell Division (RDN)* e *Multidrug and Toxic Compounds Extrusion (MATE)*. As famílias MFS, SMR, RND e MATE são categorizadas como transportadores secundários, pois se utilizam do gradiente eletroquímico de prótons existente para expulsar substâncias do interior da célula bacteriana. Já a superfamília ABC são classificadas como transportadores primários, visto que são capazes de hidrolisar ATP e utilizar a energia liberada para transportar substâncias contra o gradiente de concentração.

#### 5. CONCLUSÃO

Neste estudo, a atividade inibitória da PIP sobre as BEs foi confirmada e apresentou importante efeito modulatório na atividade da SM, tanto na cepa padrão *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv quanto em isolados clínicos (sensíveis e resistentes). A atividade extramacrofágica e intramacrofágica da combinação de SM+PIP sobre o crescimento bacteriano foi superior quando comparada a SM isolada, o que corrobora com a possibilidade do resgate da SM no esquema básico de tratamento da TB. Novos estudos estão em andamento para ampliar o entendimento do efeito modulatório de inibidores de BEs na atividade de fármacos anti-TB.

#### FINANCIADORES

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

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos todos os membros do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. 2018.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico 11 - implantação do plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas. V.49, Mar. 2018;
3. Conselho Municipal de Saúde. Plano municipal de saúde de Maringá-PR 2018-2021. Agos. 2017.
4. Campos HS. Tratamento da Tuberculose. Pulmão RJ - Soc Pneumol e Tisiol do Estado do Rio Janeiro. 2007;16:21–31.
5. Santos, Darliana Pereira dos, Diana Vasconcellos de Souza, Silvana Rodrigues KESA. Resistência aos fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Saúde, 2012;3:13–25.
6. Barreira L. Acerca de la resistencia de las micobacterias a los antibióticos, um enfoque microbiológico. Infect & Microbiol Clin. 1994 6: 192-98.
7. Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, et al. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. Microb Drug Resist. 2008 Mar;14(1):7-11.
8. Escribano I, Rodríguez JC, Llorca B, García-Pachon E, Ruiz M, Royo G. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. Chemotherapy. 2007;53:397–401.
9. Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, et al. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. Microb Drug Resist. 2010 Mar;16(1):21-8. doi: 10.1089/mdr.2009.0054. Pubmed PMID: 20001742.
10. Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, et al. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2012; 7(4): e34538.
11. Pulla Reddy Ac, Lokesh B. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. Mol Cell Biochem Cell Biochem. 1992;111:117–24.
12. Darshan S, Doreswamy R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. Phyther. Res. 2004. p. 343–57.
13. Yang YC, Lee SG, Lee HK, Kim MK, Lee SH, Lee HS. A piperidine amide extracted from Piper longum L. Fruit shows activity against Aedes aegypti mosquito larvae. J Agric Food Chem. 2002;50:3765–7.
14. Wu. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NATURAL Dissertation Director: 2007.
15. Hegeto LA, Caleffi-Ferracioli KR, Nakamura-Vasconcelos SS, Almeida AL de, Baldin VP, Nakamura CV, et al. In vitro combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2018;111:35–40
16. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtitre assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Aug;46(8):2720-2.
17. Caleffi-Ferracioli KR, Maltempe FG, Siqueira VL, Cardoso RF. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a Checkerboard resazurin method. Tuberculosis (Edinb). 2013 Nov;93(6):660-3. doi: 10.1016/j.tube.2013.09.001. Epub 2013 Sep 13.
18. Coelho T, Machado D, Couto I, Maschmann R, Ramos D, Groll A von, et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. Front Microbiol. 2015.
19. Caleffi-Ferracioli KR, Amaral RCR, Demitto FO et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. Tuberculosis 2016; 97:65–72.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*; bombas de efluxo; piperina.



## NEW COMPOUNDS WITH POTENTIAL ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY

**Patrícia de Mattos Andriato<sup>1</sup>; Vanessa Pietrowski Baldin<sup>1</sup>; Aryadne Larissa de Almeida<sup>1</sup>; Eloisa Gibin Sampiron<sup>2</sup>; Sandra Sayuri Nakamura de Vasconcelos<sup>3</sup>; Katiary Rizzieri Caleffi-Ferracioli<sup>4</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>4</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Postgraduate student (Master's degree), Program in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Centro Universitário Ingá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR  
e-mail: andriatopatrícia@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) has been around for centuries and studies show that for a thousand years it has affected humans and still remains a major global health problem (1). In 1993, TB was declared as a global emergency disease (2). It is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), and mainly affecting the lung (pulmonary TB), but also affecting other organs (extrapulmonary TB). The form of contagion occurs when sick people with TB expel bacteria in the air, for example by coughing (3). In 2017, 10 million new cases of TB were reported according to the World Health Organization (WHO) and 1.3 million deaths were due to this disease. Most of these deaths could be prevented with early diagnosis and appropriate treatment (3).

The treatment of TB depends on the appropriate combination of drugs and also the fulfillment of basic requirements in the treatment, for example correct doses and appropriate treatment time. Besides these factors, it is known that for the treatment of new cases of TB, the drug combination with isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB) are used in the first 2 months of the disease and inclusion of INH and RIF in the following 4 months (3). Therefore, situations of monotherapy, inadequate doses and lack of adherence to treatment may lead to the emergence of *Mtb* resistance to one or more drugs (4). In 2017, it was estimate 558,000 cases of TB resistant to RIF, of this 82 % were multidrug resistance (MDR-TB) (3). Facing with these situations and knowing the limitation in the variety of the arsenal of anti-tuberculosis drugs for the treatment of patients with MDR-TB and especially the extensively resistant tuberculosis (XDR-TB) (4), there is an urgent need for the search of new molecules active against the bacilli. More recently, non tuberculous mycobacteria (NTM) infections have been identified and can occur throughout the body, and lung infections, lymphadenitis, and skin and soft tissue infections are the most commonly attributed human infections to these pathogens (5).

In addition, the toxicity associated with numerous side effects caused by conventional anti-TB drugs shows the need of new studies to search for new drugs that are less toxic for the treatment, improve patient adherence and reduce the appearance of resistance. In the current phase of the technology, the search for new compounds is facilitated through selection from screening in a virtual library, being the bioinformatics a valuable source for the identification of promising new anti-TB drugs. Recently, it was reported the identification of a family of oxadiazoles from a whole cell screen against *M. tuberculosis* (6). In this context, this study aimed analyze two compounds were selected (unpublished data) in order to analyze the antimycobacterial activity.

### 2. MATERIAL E METHODS

#### 2.1. Study compounds

The two oxadiazoles, named LMM6 and LMM11, were selected by virtual screening as potential inhibitors of thioredoxin reductase from pathogenic fungal (7).

#### 2.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Several *Mycobacterium* strains and clinical isolates were used, including *Mtb* H37Rv reference strain (ATCC 27294), nine *Mtb* clinical isolates (one susceptible, two INH monoresistant, and six MDR-TB). The anti-*Mtb* activity of molecules was determined in triplicate by resazurin microtiter assay plate (REMA), according to Palomino et al. (8). Firstly, stock solutions of molecules test were prepared in Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC)

Enrichment (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA), 0.02 % glycerol (Sigma-Aldrich St Louis Mo, USA) directly in the 96-well microplate to obtain final concentrations ranging from 0.49 to 250 µg/mL. *Mtb H37Rv* reference strain and clinical isolates were grown in OADC-supplemented 7H9 for 15 days at 37 °C. After, 100 µL of each standardized mycobacterial inoculum (7.5×10<sup>6</sup> UFC/mL) was added. After 7 days of incubation, resazurin solution (0.02 %, Acros, Morris Plains, NJ, USA) was added and reincubated for 24 h. Medium, drug sterility, and bacterial growth with and without 2.5 % (v/v) DMSO controls were included in all tests. The first-line anti-TB drugs INH (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was diluted according to the manufacturer's instructions from 0.007 to 1.0 µg/mL and it was used as the reference drug.

### 2.3. Non-tuberculous *Mycobacteria* MNT

The antimicrobial activity of molecules was carried out against *Mycobacterium smegmatis mc2155*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*, and *Mycobacterium avium*, kindly provided by the Laboratory of medical Bacteriology-UEM. The assays were performed by the broth microdilution method using Müller-Hinton Broth (Difco Laboratories, Detroit, USA) with calcium (Ca<sup>2+</sup>) and magnesium (Mg<sup>2+</sup>) cations adjusted (CAMHB) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (6). Resazurin solution (0.02 %, Acros, NJ, USA) was employed to reveal mycobacterial growth (9). Medium, drug sterility, and bacterial growth controls were included in all tests. Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used as the reference drug at concentrations from 0.03 to 8 µg/mL.

### 2.4. Gram-positive and Gram-negative bacteria

The antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* was performed by the broth microdilution method using CAMHB medium, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (10).

### 2.5. Checkerboard assay

The checkerboard assay between the compounds chosen for this study named as LMM11 and LMM6 and anti-TB drugs were determined using OADC-supplemented 7H9 by the resazurin drugs combination microtiter assay (REDCA) (9). Briefly, solutions of M11 and M6 were serially diluted in 96-well plates and bacterial suspension at a final concentration of 7.5×10<sup>6</sup> UFC/mL was added into all the test wells. The plates were incubated at 37 °C for seven days. To the determination of fractional inhibitory concentration index (FICI), it was used the formula (MIC<sub>A</sub> + MIC<sub>B</sub>/MIC<sub>A</sub>) + (MIC<sub>B</sub> + MIC<sub>A</sub>/MIC<sub>B</sub>) in which MIC<sub>A</sub> + MIC<sub>B</sub> represents the MIC of drug A when combined with drug B, MIC<sub>B</sub> + MIC<sub>A</sub> represents the MIC of drug B when combined with drug A, and MIC<sub>A</sub> and MIC<sub>B</sub> represent the MICs of drugs A and B when tested alone. The results were interpreted as synergism (FICI < 0.50), indifference/additive (FICI 0.5 – 4) or antagonism (FICI > 4) (11).

## 3. RESULTS

Two oxadiazoles showed promising anti-TB activity (Table1). The MIC values ranged 3.9 to 15.6 µg/mL for LMM6 and 7.8 to 31.2 µg/mL for LMM11. The synergism activity was evaluated for five resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* and standard strain (H<sub>37</sub>Rv). Both compounds when combined with isoniazid or ethambutol showed synergistic effect. This effect was more frequent among resistant isolates when combined with LMM11. Both compounds when combined with rifampicin showed an additive effect.

**Table 1. Sensibility profile and minimum inhibitory concentration (MIC) for isoniazid, ethambutol, rifampicin and oxadiazolic compounds**

Isolates	Susceptibility profile	MIC (µg/mL)					ΣIFI					
		LMM6	LMM11	INH	EMB	RIF	INH + LMM6	EMB + LMM6	RIF + LMM6	INH + LMM11	EMB + LMM11	RIF + LMM11
H <sub>37</sub> Rv	Susceptible	7.8	7.8	0.03	2	0.03	1	1	1	1	0.75	<b>0.5</b>
73A	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup> /EMB <sup>R</sup>	3.9	15.6	6.25	4	3.12	1	0.56	0.75	<b>0.27</b>	0.75	0.75
109	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup> /EMB <sup>R</sup> /PZA <sup>R</sup>	15.6	15.6	4	1	25	0.56	0.75	0.75	0.56	0.75	0.75
3614	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup> /EMB <sup>R</sup> /PZA <sup>R</sup>	7.8	15.6	6.25	16	12.5	0.75	<b>0.5</b>	0.75	<b>0.14</b>	<b>0.5</b>	1
71A	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup> /EMB <sup>R</sup> /PZA <sup>R</sup>	15.6	15.6	12.5	8	50	<b>0.5</b>	1	0.75	<b>0.37</b>	<b>0.31</b>	0.56
18	INH <sup>R</sup> /RIF <sup>R</sup> /EMB <sup>R</sup>	15.6	31.2	3.12	4	32	1	1	1	0.56	1	1

MIC: minimum inhibitory concentration; INH: isoniazid; EMB: ethambutol; RIF: rifampicin; PZA: pyrazinamide. Results of MIC are expressed as mean of experiments performed in triplicate. Using the Resazurin Microtitre Plate Assay (REMA) method, Inhibitory Fraction Index (IFI) of oxadiazolic compounds combined with isoniazid, ethambutol, rifampicin of sensitive and resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* and reference strain *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv was determined.

Only a small subset of nontuberculous mycobacteria (NTM) are known to cause disease in humans. However, several NTMs have shown resistance to conventional therapeutic regimens. Thus, the activity of oxadiazoles was evaluated against eight species of NTM. LMM6 presented antimicrobial activity against five NTM species. Otherwise, LMM11 showed activity against only three NTM species. The *M. szulgai* was the species most sensitive to both oxadiazoles with MIC values of 0.97 µg/mL and 3.9 µg/mL for LMM6 and

LMM11, respectively. The LMM6 also showed antimicrobial activity against *E. faecalis* (MIC = 1.9 µg/mL) and LMM11 against *S. aureus* (MIC = 3.90 µg/mL).

**Table 2. Antimicrobial activity of compounds LMM6 and LMM11**

Species	MIC (µg/mL)	
	LMM6	LMM11
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	3.90	31.25
<i>Mycobacterium gordonae</i>	62.50	125
<i>Mycobacterium massiliense</i>	>250	>250
<i>Mycobacterium chelonae</i>	>250	>250
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	62.50	>250
<i>Mycobacterium kansasii</i>	31.25	>250
<i>Mycobacterium szulgai</i>	0.97	3.90
<i>Mycobacterium avium</i>	>250	>250
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.90	15.63
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.60	3.90
<i>Escherichia coli</i>	>500	>500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>500	>500

MIC: minimal inhibitory concentration; Results of MIC are expressed as mean of experiments performed in triplicate.

#### 4. DISCUSSION

Despite increased research efforts to find new treatments for TB in recent decades, compounds with novel mechanisms of action are still required. We previously identified two novel oxadiazoles with anti-TB activity (12). Recently, the two new oxadiazoles, named LMM6 and LMM11, were selected by virtual screening as potential inhibitors of thioredoxin reductase from pathogenic fungal. These compounds showed promising antimicrobial activity against different *Mycobacterium* species. As tuberculosis has re-emerged worldwide as the main cause of death from infectious disease, the search for new therapeutic options is an urgent demand. In addition, these compounds presented synergistic or additive effect when combined to conventional drugs, used as first line drugs for TB treatment. The activity against H<sub>37</sub>Rv reference strain and clinical isolates ranged between 3.9 and > 31.2 µg/mL. These results were similar to those obtained by Chaudhari et al. (2017) (13).

The incidence pulmonary diseases caused by NMT, relative is TB, is increasing at an alarming rate surpassing TB in many countries. Current treatment require long times and the clinical outcomes are often disappointing. There is an urgent medical need to discover and develop new, more efficacious anti-MNT drugs. The oxadiazoles presented activity against MNT and the MICs ranged from 0.97 to >250 µg/mL. The LMM6 showed promising activity for treating MNT infections. Considering the long period required for TB treatment, the prototype compound should not act on the human microbiota (14). These new oxadiazoles showed no activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. However, two other bacteria from microbiota were sensible, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*.

#### 5. CONCLUSION

Regarding effective treatment of tuberculosis is reliant on several drugs administered in combination for an adequate duration, to guarantee antimicrobial efficacy while preventing selection of drug-resistant mutants and achieve cure our study presented two new oxadiazole with a potential profile for development of new drugs for tuberculosis treatment.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CNPq for the aid to this project.

#### CONFLICT OF INTERESTS

None declared.

#### ETHICAL APPROVAL

Not required.

#### REFERENCES

1. World Health Organization. Millennium development goals (MDGs). 2017.
2. WHO Global Tuberculosis Programme. TB: A global emergency, WHO report on the TB epidemic. 1994.
3. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. 2018.

4. Bhusal Y, Shiohira CM, Yamane N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Oct;26(4):292–7.
5. Wu ML, Aziz DB, Dartois V, Dick T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discov Today*. 2018;23(8):1502–19.
6. Early JV, Casey A, Martinez-Grau MA, Gonzales IC, Vieth VM, Ollinger J, et al. Oxadiazoles have butyrate-specific conditional activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jun;60(6):3608–16.
7. 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 Jun 1;13(6):e0007441.
8. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: Rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Nov;47(11):3616–9.
9. Caleffi-Ferracioli KR, Maltempe FG, Siqueira VLD, Cardoso RF. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*. 2013 Nov;93(6):660–3.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
11. Andrade-Ochoa S, Nevárez-Moorillón GV, Sánchez-Torres LE, Villanueva-García M, Sánchez-Ramírez BE, Rodríguez-Valdez LM, et al. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complement Altern Med*. 2015 Sep 23;15:332.
12. Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B, Samala R, Chen P, Gearhart J, et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Nov;56(5):968–74.
13. Chen P, Gearhart J, Protopopova M, Einck L, Nacy CA. Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Aug;58(2):332–7.
14. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar 1;18(3):318–27.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; oxadiazoles; synergism.



## **(-)-CAMPHENE-BASED THIOSEMICARBAZONES AS AGENTS AGAINST RESISTANT MYCOBACTERIA**

**Vanessa Pietrowski Baldin<sup>1</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>2,3</sup>; Andressa Lorena Ieque<sup>2</sup>; Mariana Regina Passos de Souza<sup>4</sup>; Fabio Vandresen<sup>5</sup>; Aryadne Larissa de Almeida<sup>1</sup>; Eloísa Gibin Sampiron<sup>3</sup>; Giovana Ferreira Costacurta<sup>3</sup>; Talita Neves<sup>2</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>2</sup>Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>4</sup>Postgraduate Program in Chemistry, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>5</sup>Federal Technological University of Parana, Londrina, PR

e-mail: vanessabaldin@gmail.com

### **1. INTRODUCTION**

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) belongs to the *M. tuberculosis* complex and is the main causative agent of tuberculosis (TB) in humans. In 2017, 10.0 million new cases of TB and 1.3 million TB deaths among HIV-negative people were reported (1). Additionally, the increase in multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant and, currently, totally drug-resistant *Mtb* strains, as well as the incidence associated with viral infections such as HIV, fortify the urgent necessity for new drugs against the bacillus (2). In addition, species that are not a member of the complex *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) known as nontuberculous mycobacteria (NTM), arouse interest for their potential to cause opportunistic infections, especially in immunocompromised patients (3).

Antibacterial activity of different substances, such as natural (3,4) and synthetic ones (5,6), are reported in the literature and drive their action against *Mtb*. In the last years, a large number of thiosemicarbazones have been synthesized and evaluated as antimycobacterial agents (6–8). Additionally, thiosemicarbazones combined with terpenes have demonstrated antitumoral, antitrypanosomal and antimycobacterial effects (9–12).

Camphene is a monoterpene abundant in the essential oil of *Thymus vulgaris* with expectorant, spasmolytic, and antimicrobial properties (13). Recently, we reported the antimycobacterial activity of a series of (-)-camphene-based thiosemicarbazones against *Mtb* H<sub>37</sub>Rv reference strain with low cytotoxic properties (12), which gave us reason to enlarge the studies. In this sense, we analyzed (i) the activity against resistant *Mtb* clinical isolates, (ii) the interaction with first-line anti-TB drugs, and (iii) the activity against NTM, Gram-negative and -positive bacteria of compounds that previously showed to be potential candidates against *Mtb*.

### **2. MATERIAL AND METHODS**

#### **2.1. Chemistry**

The (-)-camphene-based thiosemicarbazones (-)-2-(4-tert-butyl)-N-(2,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl) hydrazinecarbothioamide (4b), (-)-2-[(5-nitrothiophen-2-yl) methylidene]-N-(2,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl) hydrazinecarbothioamide (6a) and (-)-2-[(5-nitrofuran-2-yl)methylidene]-N-(2,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl) hydrazinecarbothioamide (6b) synthesis were performed according to the literature (9,12).

#### **2.2. *Mycobacterium tuberculosis* assays**

##### **2.2.1. Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration at pH 6.8 and 6.1**

*Mtb* H<sub>37</sub>Rv reference strain (ATCC 27294) and clinical isolates (susceptible, isoniazid-monoresistant, streptomycin-monoresistant and MDR) were used in this study to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) by the resazurin microtiter assay plate (REMA) method (14), in pH 6.8 and 6.1. Also, minimum bactericidal concentration (MBC) assays were performed directly from the REMA plates, in triplicate. The colony-forming unit (CFU) were counted and the rejection value (RV) was determined by the formula:  $RV = \text{initial inoculum} \times \text{inoculated volume (0.1)} \times \text{reliability factor}$ . The MBC was recorded as the lowest concentration of compounds that killed 99% of bacillus present in the starting inoculation (determined by viable counts) or in the cases that the CFU was < RV (15).

### 2.2.2. Checkerboard assay at pH 6.1 and pH 6.8

Drug interactions between 4b, 6a, and 6b and isoniazid (INH), rifampicin (RIF), and ethambutol (EMB) (Sigma-Aldrich) in *Mtb* were determined by resazurin drug combination microtiter assay (REDCA) (16). Moreover, for the combinatory effects with pyrazinamide (PZA) were carried out in PZA resistant isolates using OADC-supplemented 7H9 adjusted to pH 6.1. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was defined by the ration of  $(MIC_A + MIC_B/MIC_A) + (MIC_B + MIC_A/MIC_B)$ , in which  $MIC_A + MIC_B$  represents the MIC of drug A combined with drug B,  $MIC_B + MIC_A$  represents the MIC of drug B combined with drug A, and  $MIC_A$  and  $MIC_B$  represent the MICs of drugs A and B tested alone. The results were interpreted as synergism (FICI >0.50), indifference/additive (FICI 0.5 - 4) or antagonism (FICI >4) (16,17).

### 2.3. Nontuberculous mycobacteria assays

The compounds were subsequently tested against slowly and rapidly growing NTM (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium gordonae*, and *Mycobacterium kansasii*). All strains are from the Laboratory of Medical Bacteriology of the State University of Maringa, Parana, Brazil. The MICs were determined by resazurin broth microdilution assay (REBMA) [34]. Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used as the reference drug at concentrations from 0.03 to 8 µg/mL.

### 2.4. Gram-negative and -positive bacteria assays

The study was extended against Gram-positive and -negative strains (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). The antimicrobial activity was performed by broth microdilution method using CAMHB medium, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (18).

## 3. RESULTS

The MIC values obtained under different pH (6.1 and 6.8) against *Mtb* clinical isolates ranged from 3.9 to 15.6 µg/mL, 3.9 to 7.8 µg/mL, and 3.9 to 31.25 µg/mL for 4b, 6a and 6b, respectively (Table 1). The 6a and 6b showed bactericidal potential against *Mtb* with MBC values ranging from 31.2 to 125 µg/mL, in both pH tested (Table 1). On the other hand, 4b had no expressive bactericidal effects at the maximum concentration tested (MBC > 250 µg/mL), in both pH analyzed.

**Table 1. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations (MIC and MBC) of (-)-camphene-based thiosemicarbazones against *Mycobacterium tuberculosis***

<i>Mtb</i>	(-)-camphene-based thiosemicarbazones						Reference drugs	
	4b		6a		6b		H	Z
	pH 6.1	pH 6.8	pH 6.1	pH 6.8	pH 6.1	pH 6.8	pH 6.8	pH 6.1
	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC/MBC	MIC	MIC
H <sub>37</sub> Rv	7.8/>250	7.8/>250	3.9/125	7.8/31.2	31.2/31.2	15.6/62.5	0.03	100
49 <sup>s</sup>	7.8/>250	3.9/>250	7.8/31.2	7.8/31.2	31.2/62.5	7.8/62.5	0.03	6
04brf <sup>H</sup>	7.8/>250	7.8/>250	7.8/62.5	3.9/62.5	15.6/62.5	7.8/125	2	6
71A <sup>H,R,Z</sup>	15.6/>250	15.6/250	7.8/62.5	7.8/62.5	31.2/250	7.8/62.5	4	3,200
73A <sup>H,R,Z</sup>	7.8/>250	7.8/>250	3.9/125	3.9/31.2	3.9/125	3.9/62.5	2	800
3614 <sup>H,R,Z,E</sup>	7.8/>250	15.6/>250	3.9/31.2	7.8/31.2	31.2/125	7.8/125	2	3,200

*Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*; in superscript represents the resistance profile of each clinical isolate; <sup>s</sup>: susceptible; H: isoniazid; S: streptomycin; Z: pyrazinamide; R: rifampicin; E: ethambutol; results of MIC are expressed as mean of experiments performed in triplicate.

The FICI values are shown in Table 2. For 4b was observed drug synergism in 1/5, 1/5, 2/5 and 1/4 of the clinical isolates and *Mtb* H<sub>37</sub>Rv in 4b+INH, 4b+EMB, 4b+RIF, and 4b+PZA, respectively. The combination of 6a with anti-TB drugs showed no synergism effects with INH, EMB, and RIF and a drug synergism with PZA in 2/4 (one clinical isolate and *Mtb* H<sub>37</sub>Rv). Also, 6b showed drug synergism when combined with EMB, RIF, and PZA in 1/5, 1/5 and 1/4 isolates, respectively.

**Table 2. Drug interaction of (-)-camphene-based thiosemicarbazones with first-line antituberculosis drugs at different pHs**

	pH 6.8					pH 6.1				
	Minimum inhibitory concentration									
	H <sub>37</sub> Rv	brf04	71A	73A	3614	H <sub>37</sub> Rv	71A	73A	3614	
<b>4b</b>	7.8	7.8	15.6	7.8	15.6	<b>4b</b>	7.8	15.6	7.8	7.8
<b>6a</b>	7.8	3.9	7.8	3.9	7.8	<b>6a</b>	3.9	7.8	3.9	3.9
<b>6b</b>	15.6	7.8	7.8	3.9	7.8	<b>6b</b>	31.2	31.2	3.9	31.2
<b>H</b>	0.03	2	4	2	2	<b>Z</b>	100	3,200	800	3,200
<b>E</b>	1	0.5	0.25	2	4					
<b>R</b>	0.03	0.01	25	0.5	6.25					
FICI										
	H <sub>37</sub> Rv	brf04	71A	73A	3614	H <sub>37</sub> Rv	71A	73A	3614	
<b>4b+H</b>	2	1	1	1	<b>0.5</b>	<b>4b+Z</b>	<b>0.5</b>	2	2	1
<b>4b+E</b>	1	1	0.75	<b>0.31</b>	2	<b>6a+Z</b>	<b>0.5</b>	1	<b>0.5</b>	2
<b>4b+R</b>	<b>0.28</b>	0.75	0.78	<b>0.37</b>	2	<b>6b+Z</b>	0.75	1	<b>0.5</b>	0.75
<b>6a+H</b>	2	1	2	2	2					
<b>6a+E</b>	2	0.62	0.56	2	1					
<b>6a+R</b>	2	0.77	2	2	1					
<b>6b+H</b>	2	1	1	0.75	1					
<b>6b+E</b>	1	0.73	1	0.62	<b>0.37</b>					
<b>6b+R</b>	0.75	<b>0.36</b>	1	2	-					

MIC: minimum inhibitory concentration; FICI: fractional inhibitory concentration index; H: isoniazid; E: ethambutol; R: rifampicin; Z: pyrazinamide; in **bold** is synergism; results are expressed as mean of experiments performed in triplicate; for resistance profile of clinical isolates see Table 1.

Additionally, 4b, 6a, and 6b had lower activity against Gram-positive and -negative bacteria (Table 3), and the MICs values against NTMs were > 250 µg/mL for 4b, and ranged from 15.6 to > 250 µg/mL and 7.8 to > 250 µg/mL for 6a and 6b, respectively.

**Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of (-)-camphene-based thiosemicarbazones in nontuberculous mycobacteria and Gram-positive and -negative bacteria**

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	4b	6a	6b	CIP
<b>Nontuberculous mycobacteria</b>				
<i>Mycobacterium abscessus</i>	>250	31.2	7.8	0.25
<i>Mycobacterium chelonae</i>	>250	125	62.5	0.5
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	>250	>250	125	1
<i>Mycobacterium massiliense</i>	>250	31.2	15.6	0.25
<i>Mycobacterium avium</i>	>250	>250	>250	0.12
<i>Mycobacterium gordonae</i>	>250	>250	62.5	0.12
<i>Mycobacterium kansasii</i>	>250	15.6	62.5	0.5
<b>Gram-positive and Gram-negative</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	>500	125	31.2	0.12
<i>Enterococcus faecalis</i>	250	125	125	0.12
<i>Escherichia coli</i>	>500	>500	500	0.12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>500	>500	>500	0.12

CIP: ciprofloxacin; results of MIC are expressed as mean of experiments performed in triplicate.

#### 4. DISCUSSION

In the present study, the antimycobacterial activity of 4b, 6a, and 6b were expanded to *Mtb* clinical isolates with different drug susceptibilities. No significant differences in the (4b), (6a) and (6b) N(4)-substituted thiosemicarbazones MICs values (MIC 3.9 to 7.8  $\mu\text{g/mL}$ ), determined at two different pH (6.1 and 6.8), was observed.

Further to MIC in clinical isolates, we also determined the microbicidal activity of these molecules exposed to the same pH conditions. Compounds that reduce the CFU of the inoculum are considered as bactericidal, while the compounds that do not kill the inoculum but prevents its multiplication are considered as bacteriostatic. Our results showed 4b had no bactericidal effects at the maximum concentration tested for *Mtb* H<sub>37</sub>Rv and clinical isolates (MBC > 250  $\mu\text{g/mL}$ ), in both pH analyzed, which we infer the acid environment does not alter the 4b activity. On the other hand, 6a and 6b showed lower MBC values and bactericidal potential in *Mtb*, in both pH tested. Regardless of the environment tested, both acid or neutral, molecules 6a and 6b showed bactericidal potential against *Mtb*. Since during infection *Mtb* is exposed to the acidic pH inside the macrophage environment (19), the same pattern of the molecules observed in both neutral and acidic environment is an important aspect of their action.

Furthermore, once *Mtb* has particular biological characteristics, the treatment of TB is composed by a set of drugs and time-consuming. Therewith, is essential to know the interactions between a new proposed anti-TB compounds with the currently used drugs (19). One example of thiosemicarbazone with anti-*Mtb* activity is thiacetazone, an inexpensive and bacteriostatic drug used in African countries combined with INH (20) due to the high index of TB/HIV. Besides, its use combined with RIF is related in the literature to improve the permeation properties of the drugs leading synergism activity (21). In our study interaction between 4b, 6a, and 6b, when combined with INH, RIF, EMB and PZA were observed in some punctual cases (FICI < 0.5). It is worth mentioning that 6a showed synergism only with PZA (in an acid environment) in a clinical isolate and the H<sub>37</sub>Rv strain. An important point to consider is the no antagonism effect was observed in the interactions between the 4b, 6a, and 6b with anti-TB drugs analyzed.

In the literature, thiosemicarbazones have shown considerable antibacterial activity against a number of mycobacterium species (22,23). In our study were observed activity against NTM with low MICs mainly with 6a and 6b (Table 3). Among the NTM analysed, *M. avium-intracellulare* complex and *M. abscessus* complex have clinical interest once species belonging to this complex are highly resistant to most antibacterial drugs. The presence of the nitro group in the molecular structure, which is observed in 6a and 6b, seems to influence the activity of the compounds in NTM species with the lowest MIC values (7.8 – 31.2  $\mu\text{g/mL}$ ) observed against *M. abscessus* complex (*M. massiliense* and *M. abscessus*).

Additionally to the search for new active molecules against mycobacteria, the activity spectrum in microorganisms pertaining to the microbiota also should be considered (4). Once the current anti-TB



chemotherapy is prolonged, is of great interest that anti-TB drugs candidates exhibit a narrow-spectrum activity and are more effective against *Mtb* (3). Considering this, 4b, 6a, and 6b showed selectivity for *Mtb* once had lower activity against Gram-positive and -negative bacteria.

## 5. CONCLUSIONS

In summary, the 6a and 6b (-)-camphene based thiosemicarbazones showed substantial antimycobacterial activity against *Mtb* clinical isolates and some NTM, and no dramatic effects on bacteria pertaining to human microbiota. The present results suggest these compounds as promising to conduct additional studies in the search for new molecules scaffold to design new anti TB drugs.

## FUNDING AGENCIES

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

## REFERENCES

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2018. 243 p.
2. Nguta JM, Appiah-Opong R, Nyarko AK, Yeboah-Manu D, Addo PGA, Otchere I, et al. Antimycobacterial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol.* 2016; 182:10-5.
3. de Almeida AL, Caleffi-Ferracioli KR, de L Scodro RB, Baldin VP, Montaholi DC, Spricigo LF, et al. Eugenol and derivatives activity against *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. *Future Microbiol.* 2019; 14:331-44.
4. Baldin VP, Scodro RB de L, Lopes-Ortiz MA, de Almeida AL, Gazim ZC, Ferarrese L, et al. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae). *Phytomedicine.* 2018; 47:34–9.
5. Oliveira CG, Maia PI da S, Souza PC, Pavan FR, Leite CQF, Viana RB, et al. Manganese(II) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *J Inorg Biochem.* 2014; 132:21-9.
6. Pavan FR, Maia PI d. S, Leite SRA, Deflon VM, Batista AA, Sato DN, et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(5):1898-905.
7. Sriram D, Yogeewari P, Thirumurugan R, Pavana RK. Discovery of New Antitubercular Oxazolyl Thiosemicarbazones. *J Med Chem.* 2006; 49(12):3448-50.
8. Cocco MT, Congiu C, Onnis V, Pellerano ML, Logu A De. Synthesis and antimycobacterial activity of new S-alkylisothiosemicarbazone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10(3):501-6.
9. Vandresen F, Falzirolli H, Almeida Batista SA, da Silva-Giardini APB, de Oliveira DN, Catharino RR, et al. Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their antitumor activity against human tumor cell lines. *Eur J Med Chem.* 2014; 79:110-6.
10. Belicchi-Ferrari M, Bisceglie F, Buschini A, Franzoni S, Pelosi G, Pinelli S, et al. Synthesis, structural characterization and antiproliferative and toxic bio-activities of copper(II) and nickel(II) citronellal N4-ethylmorpholine thiosemicarbazones. *J Inorg Biochem.* 2010; 104(2):199-206.
11. Martins SC, Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Falzirolli H, da Silva CC, Ueda-Nakamura T, et al. 1,3,4-Thiadiazole derivatives of R-(+)-limonene benzaldehyde-thiosemicarbazones cause death in *Trypanosoma cruzi* through oxidative stress. *Microbes Infect.* 2016; 18(12):787-97.
12. Souza MRP, Coelho NP, Baldin VP, Scodro RBL, Cardoso RF, da Silva CC, et al. Synthesis of novel (-)-Camphene-based thiosemicarbazones and evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. *Nat Prod Res.* 2018; 24:1-6.
13. Baser KHC, Buchbauer G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. 2010.
14. Palomino J, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobail Agents Chemother.* 2002; 46(8):2720-2.
15. HD I. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Washington, DC; 1992.
16. Caleffi-Ferracioli KR, Maltempe FG, Siqueira VLD, Cardoso RF. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis.* 2013; 93(6):660-3.
17. Pillai S, Moellering RJ, Eliopoulos G. Antimicrobial combinations Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia; 2005.
18. CLSI. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes; Approved standard - Second Edition. 2nd ed. 2011.
19. Nakamura de Vasconcelos SS, Caleffi-Ferracioli KR, Hegeto LA, Baldin VP, Nakamura C V, Stefanello TF, et al. Carvacrol activity & morphological changes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 2018; 13:877-88.

20. Alahari A, Trivelli X, Guerardel Y, Dover LG, Besra GS, Sacchetti JC, et al. Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PLoS One*. 2007; 2(12):e1343.
21. Seydel JK, Schaper KJ, Rusch-Gerdes S. Experimental drugs and combination therapy. *Immunobiology*. 1994; 191(4-5):569-77.
22. Waisser K, Heinisch L, Slosarek M, Janota J. New antimycobacterial S-alkylisothiosemicarbazones. *Folia Microbiol. (Praha)* 2005; 50(6):479-81.
23. Petrlíková E, Waisser K, Heinisch L, Stola J, Stola J. New S-benzylisothiosemicarbazones with antimycobacterial activity. *Folia Microbiol. (Praha)* 2011; 80:10-2.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; anti-infective agents; drug synergism.



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Neurogastroenterologia

## **ANÁLISE ESTRUTURAL DO DUODENO DE CAMUNDONGOS C57BI/6 TRANSGÊNICOS DISLIPIDÊMICOS QUE SUPEREXPRESSAM A APOLIPOPROTEÍNA apoCIII HUMANA**

**Cristiany Schultz<sup>1</sup>; Nilton Rodrigues Teixeira Júnior<sup>2</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>3</sup>; Jairo Augusto Berti<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant Ana<sup>5</sup>**

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

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Educação Física, Departamento de Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: schultzcristiany@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

As dislipidemias somadas ao descontrole glicêmico, obesidade e hipertensão estão entre as principais causas do desenvolvimento da aterosclerose e conseqüentemente acidentes vasculares causando morbidade e mortalidade da população mundial (1). A hipertrigliceridemia é uma dislipidemia grave, altamente aterogênica, que pode ser causada por fatores como, dieta, alcoolismo, uso de medicamentos, tratamentos hormonais, diabetes e fatores genéticos (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Dentre os fatores genéticos, a superexpressão da apolipoproteína CIII (apoCIII) está entre as principais causas da hipertrigliceridemia. A apoCIII é uma glicoproteína de 8,8 kDa que faz parte das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TG), sintetizada principalmente no fígado e em menor quantidade no intestino. É importante moduladora da produção hepática dos TG e da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Os TG presentes nestas lipoproteínas são metabolizados pelas lipases lipoproteicas (LPL), presas no endotélio capilar, liberando ácidos graxos (AGL) e glicerol para os tecidos adjacentes. A apoCIII ao diminuir a atividade da LPL, retarda o metabolismo das VLDL causando seu acúmulo no sangue (8, 9,10).

Por ser bastante invasivo e por falta de controles adequados, é bastante complexo estudar os processos ateroscleróticos e mudanças morfológicas em humanos. Por isso, tem se criado vários modelos de animais transgênicos que expressam genes humanos. Nosso modelo experimental, camundongos que super expressam o gene humano da apoCIII, são hipertrigliceridêmicos, com altas concentrações de colesterol e de AGL no sangue (11). Nestes modelos já se conhece algumas alterações bioquímicas e morfológicas, como aumento da massa adiposa, inflamação e esteatose hepática e aterosclerose (12,13,14,15).

Diversos processos fisiológicos que envolvem motilidade, secreção, digestão, absorção, captação seletiva de nutrientes, eletrólitos, água e rejeição de substâncias nocivas acontecem através do epitélio intestinal até serem digeridos e utilizados para manutenção, crescimento e demais necessidades energéticas pelo organismo (16).

A absorção lipídica pelo intestino é bastante complexa envolvendo síntese e atividade de lipases específicas para cada tipo de lipídeo (17). A apoCIII também pode ser expressa nos enterócitos e em conjunto com outras apolipoproteínas como apoCII e apoB48, aglomeram os TG, colesterol, fosfolipídeos e outras substâncias lipossolúveis absorvidas, formando os quilomícrons que são responsáveis pelo transporte, primeiramente pela rede linfática e posteriormente pelo sangue (18).

O intestino pode dessa forma, influenciar e ser influenciado por fatores como dislipidemia, obesidade e diabetes. Em estudo realizado com camundongos knock out para apoE (os quais são hipercolesterolêmicos) observaram que a microbiota intestinal é dependente da dieta e está associada aos níveis de colesterol plasmático (19, 20). Considerando que as dislipidemias podem aumentar os processos inflamatórios, aterosclerose, acúmulo de tecido adiposo e várias alterações morfológicas tanto em humanos como animais, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da hipertrigliceridemia induzida pela superexpressão da apoCIII na estrutura do duodeno dos camundongos transgênicos para apoCIII.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**



Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá com registro CEUA nº 655818051 e Comissão Interna de Biossegurança – CTNBio nº 819/2013.

## **2.1 Grupos**

Para este experimento utilizamos como modelo de hipertrigliceridemia primária, camundongos machos, com 180 dias de vida, que super expressam a apoCIII humana (apoCIII-tg) e seus respectivos controles, os não transgênicos (ntg), totalizando 12 camundongos da linhagem C57Bl/6 que foram distribuídos em dois grupos (n=6). Estes animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, em estantes ventiladas (isolados dos outros animais), com livre acesso à água e alimento (ração balanceada Nuvilab®).

Após o cruzamento entre os animais transgênicos e não transgênicos foram obtidas a prole heterozigota de machos e fêmeas e separados para o estudo os machos aos 30 dias. Aos 60 dias de vida, foi coletado o sangue caudal de todos os animais com jejum noturno de 12h para genotipagem que consiste em dosar os triglicerídeos plasmáticos sendo considerados transgênicos os animais que apresentam trigliceridemia maior que 300mg/dL e não transgênicos abaixo de 100mg/dL (12).

## **2.2 Dosagens bioquímicas**

Aos 180 dias, os animais foram mantidos em jejum noturno por 12 horas e pesados. Foram coletadas amostras de sangue caudal para avaliação da glicemia (em glicosímetro com tiras de dosagem Optium® Xceed Point of Care). Para as demais dosagens bioquímicas, os animais foram anestesiados e exanguinados via retro orbital e o sangue centrifugado para obtenção do plasma.

Foram dosados colesterol e triglicerídeos plasmáticos com utilização de Kits colorimétricos (Labtest®) de acordo com as especificações dos fabricantes. A anestesia foi realizada individualmente em câmara de eutanásia com isoflurano (Isoforine® 100%) e mantido por aproximadamente 1 minuto após a sedação do animal, garantindo assim um estado de inconsciência e a não percepção da dor.

## **2.3 Processamento histológico**

Após a coleta do sangue e eutanásia, foi realizada a laparotomia e o duodeno coletado, fixado em paraformaldeído tamponado, submetido à rotina histológica e emblocados em parafina para obtenção de cortes transversais semi seriados de 4µm. Em seguida, os blocos foram desparafinados e corados com as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) para mensuração estrutural de vilos, criptas e parede do intestino. Para averiguação de sialomucinas ácidas e sulfomucinas neutras foram realizadas as técnicas histológicas: Alcian Blue pH 1,0 (AB 1,0), Alcian Blue pH 2,5 (AB2,5) e Periodic Acid Schiff (P.A.S) (21).

## **2.4 Quantificação de células calciformes**

Foram quantificadas 2560 células do epitélio da túnica mucosa do duodeno de cada animal e calculada a proporção de células calciformes/100 células epiteliais. Para isso, foram capturadas 16 imagens da túnica mucosa a partir de 4 cortes, sendo 1 imagem/quadrante/corte coradas na técnica histológica A.B pH 1,0 e A.B pH 2,5 e P.A.S (21).

## **2.5 Quantificação de Linfócitos Intraepiteliais (LIEs)**

Quantificamos 2560 células do epitélio intestinal de cada animal e os LIEs presentes entre estas, em lâminas coradas por H.E. A seguir, foi calculada a proporção de LIE/100 células epiteliais (21).

## **2.6 Análise morfológica da parede intestinal**

Para observação de possíveis alterações morfológicas foram utilizadas imagens ampliadas nas objetivas de 20X, 40X e de 100X. Foram realizadas medidas da espessura da camada muscular longitudinal e muscular circular, túnica muscular total, tela submucosa, altura e largura de vilos uniformemente em toda a circunferência do duodeno (ápice, meio e base). As imagens foram obtidas por meio de uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel®) acoplada a um microscópio de luz trinocular, equipado com sistema de análise de imagem (Motic Image Plus, versão 2.0®) (22).

## **2.7 Análise estatística**

Foi realizado o teste de normalidade e as distribuições dos dados foram analisadas pelo software BioEstat 5.0®. Os dados comparados entre os grupos apoCIII-tg (transgênicos) e ntg (não transgênico) utilizando o t-Student foram apresentados como média e desvio padrão com auxílio do Software GraphPadPrism® version 5.01. Os valores e p <0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## **3. RESULTADOS**

Neste estudo foram considerados transgênicos os animais que apresentaram trigliceridemia maior que 300mg/dL e não transgênicos os abaixo de 100mg/dL. Demonstramos na Tabela 1 o perfil bioquímico, triglicerídeo (TG) e colesterol plasmático (COL), o comprimento e diâmetro do duodeno e o peso destes camundongos. Observamos o aumento significativo nas concentrações de TG e COL no grupo apoCIII-tg (p<0,05), confirmando a dislipidemia em nosso modelo experimental. A comparação do comprimento e largura dos duodenos não apresentou diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 1. Perfil bioquímico e medidas do duodeno dos camundongos C57Bl/6 que super expressam a lipoproteína apoCIII humana**

Variáveis	Ntg (n=6)	apoCIII-tg (n=6)
Peso (g)	24,9±0,5	25,5±0,4
Triglicerídeo (mg/dL)	81,3±7,9	615,0±69,5*
Colesterol (mg/dL)	104,0±11,6	159,2±16,9*
Comprimento do Órgão (cm)	2,70±0,2	2,67±0,2
Diâmetro do Órgão (cm)	0,60±0,0	0,53±0,0

\*=  $p < 0,05$ , ntg: Não Transgênico; apoCIII-tg: Transgênico. Resultados apresentados como média e erro padrão.

Não foram demonstradas alterações na largura dos enterócitos, altura e largura de núcleo, altura e largura das vilosidades, profundidade e largura de cripta, tela submucosa, muscular longitudinal e muscular total no duodeno do grupo apoCIII-tg e ntg (Tabela 2).

**Tabela 2. Mensuração de estruturas da parede do duodeno de camundongos C57Bl/6 transgênicos para apoCIII humana (apoCIII-tg) e seus controles, não transgênicos (ntg)**

Variáveis (µm)	Ntg (n=6)	apoCIII-tg (n=6)	Δ %
Largura de Enterócitos	4,7±0,1	4,4±0,1	-7,0
Altura de Núcleo	5,8±0,2	5,3±0,2	-8,1
Largura de Núcleo	3,4±0,1	3,2±0,1	-4,7
Altura de Vilo	345,4±4,8	362,7±20,5	5,0
Largura de Vilo	64,6±2,0	67,3±2,8	4,1
Tela Submucosa	13,0±0,5	13,5±0,4	3,7
Muscular Longitudinal	14,7±0,9	17,3±1,2	17,8
Muscular Total	36,5±2,6	44,69±3,30	22,37

Teste *t* Student. Não houve diferença significativa em nenhuma das comparações. Δ % Comparação da variação das mensurações entre os grupos considerando o grupo controle como 100%.

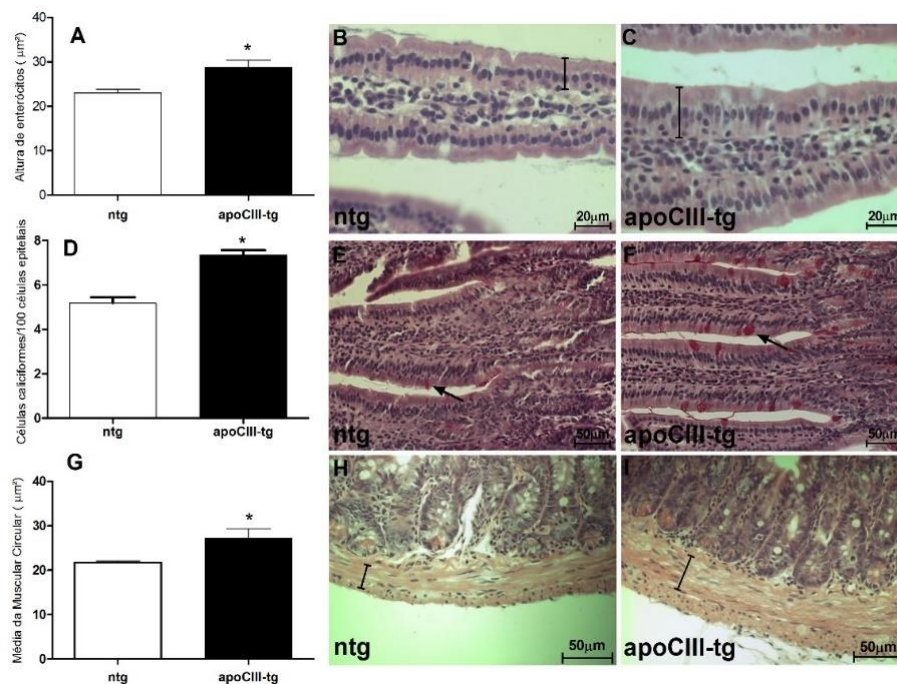
As células que produzem mucinas com pH 1,0 e pH 2,5 assim como os linfócitos intraepiteliais não apresentaram alterações significativas no grupo apoCIII-tg e ntg (Tabela 3).

**Tabela 3. Número de células calciformes e linfócitos intraepiteliais/100 células epiteliais evidenciadas por diferentes técnicas histoquímicas no duodeno de camundongos C57Bl/6 transgênicos para apoCIII humana (apoCIII-tg) e seus controles, não transgênicos (ntg)**

Técnicas histoquímicas	Ntg (n=6)	apoCIII-tg (n=6)	Δ %
A.B 1,0	9,4±1,0	10,1±1,0	6,8
A.B 2,5	13,5±2,0	13,7±1,3	1,5
H.E	13,3±1,2	12,3±0,6	-7,4

Teste *t* Student. Não houve diferença significativa nas comparações. Número de células presentes em 100 células epiteliais. (ntg) Não transgênicos, (apoCIII-tg) Transgênico. Técnicas Histoquímicas: Periodic Acid Shift, Alcian Blue pH1,0, Alcian Blue pH2,5.

Δ Comparação da variação das mensurações entre os grupos considerando o grupo controle como 100%



**Figura 1: Fotomicrografia do duodeno de camundongos C57Bl/6 apoCIII-tg e ntg demonstrando alterações significativas no epitélio intestinal dos animais apoCIII-tg.** (A) Gráfico altura de enterócitos em  $\mu\text{m}^2$ . \* para  $p < 0,05$ . (B e C) Fotomicrografia coloração H.E demonstrando aumento na altura dos enterócitos do duodeno de camundongos C57Bl/6 apoCIII-tg. Aumento 400X. (D) Gráfico da quantificação de células caliciformes/100 células epiteliais. (E e F) Fotomicrografia dos vilos corados na técnica P.A.S do duodeno de camundongos C57Bl/6 apoCIII-tg e ntg. As setas indicam células caliciformes presentes no epitélio. Aumento 200X (G) Gráfico da média da espessura da muscular circular em  $\mu\text{m}^2$ . \* para  $p < 0,05$ . (H e I) Fotomicrografia coloração H.E demonstrando aumento significativo na muscular circular do duodeno de camundongos C57Bl/6 apoCIII-tg. Aumento 200X.

### 3. DISCUSSÃO

A super expressão da apoCIII e conseqüentemente a dislipidemia, altera vários mecanismos metabólicos e pode alterar morfológicamente vários tecidos (19). Em nosso trabalho estudamos o efeito de tal mudança genética em camundongos transgênicos que super expressam a apoCIII humana.

O sistema imune da mucosa intestinal é constituído por uma grande interface protetora contra agentes patogênicos e tem a difícil tarefa de organizar respostas protetoras contra mecanismos invasores, além das funções de absorção e secreção. Alterações em sua arquitetura podem indicar resposta inflamatória (23) e conseqüentemente funcional. Neste estudo, os animais do grupo apoCIII-tg apresentaram aumento expressivo na camada muscular circular, resultado indicativo de aumento na função peristáltica do intestino delgado ou resposta inflamatória com alteração da composição tecidual, todavia, não o suficiente para provocar diarreia ou amolecimento das fezes visíveis durante o período de estudo. Outras análises morfométricas não demonstraram alterações estruturais.

O trato gastrointestinal é raramente discutido como um sistema de órgãos de importância principal para doenças metabólicas, diversos mecanismos estão relacionados ao intestino que potencialmente contribuem para a síndrome metabólica. Alterações nas funções intestinais, por si só, é um fator de risco bem estabelecido para a hiperglicemia, além disso, a mucosa intestinal pode desencadear inflamação sistêmica alterando toda microbiota intestinal. Nessa perspectiva, é intuitivo que o intestino tem papel fundamental no controle metabólico, mas os mecanismos envolvidos foram apenas parcialmente explorados (14).

Apesar deste estudo não estender para análises funcionais, percebeu-se pela análise morfométrica uma adaptação dos animais ao estado hipertrigliceridemia sem grandes mudanças no duodeno. Isso pode ter ocorrido possivelmente porque a túnica mucosa possui grande capacidade de renovação celular e reorganização tecidual. Sabe-se que o intestino desempenha importante papel para elevar os níveis de TG plasmáticos, mas não se tem conhecimento se este órgão se comporta em situações de dislipidemia como no modelo estudado. Embora um progresso significativo tenha sido feito na compreensão dos mecanismos que a apoCIII participa nas funções hepáticas, pouco é conhecido sobre a função intestinal, sendo uma lacuna na compreensão sobre essa apolipoproteína (25).

### 4. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados podemos concluir que a apoCIII humana tem papel importante como componente modulador metabólico das lipoproteínas por diferentes mecanismos envolvendo absorção, transporte e metabolismo dos triglicerídeos pelo corpo. A superexpressão desta apolipoproteína causa alterações estruturais e morfológicas no duodeno de camundongos C57Bl/6 transgênicos, aumentando a proliferação de células calciformes, produtoras de muco e o aumento da muscular circular indicando maior absorção.

## FINANCIADORES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FADEC) da Universidade Estadual de Maringá.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os colaboradores do Laboratório de Anatomia do Departamento de Ciências Morfológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas (DFS) e ao Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Benjamin JE, Blaha JM, Chiuve SE, Cushman M, Das R.S, Deo, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135(10): 146-603.
2. Mancini M, Steiner G, Betteridge DJ, Pometta D. Acquired (secondary) forms of hypertriglyceridemia. *The American Journal of Cardiology*. 1991 July; 68(3):17-21.
3. Assmann G, Brewer HB Jr. Genetic (primary) forms of hypertriglyceridemia. *The American Journal of Cardiology*.1991 July; 68(3):13-16.
4. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *American Diabetes Association*.1997 Jan; 46(1):3-10.
5. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, KHAW KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007 Jan; (115-450):4-8.
6. Pavlic M, Valero R, Duez H, Xiao C, Szeto L, Patterson BW, Lewis GF. Triglyceride-rich lipoprotein-associated apolipoprotein C-III production is stimulated by plasma free fatty acids in humans. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2008; (28)1660-1665.
7. Lee HY, Birkenfeld AL, Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Kanda S, Popov V, Frederick, et al. Apolipoprotein CIII overexpressing mice are predisposed to diet induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Hepatology*. 2011; 54 1650-1660.
8. Fredenrich A, Giroux LM, Tremblay M, Krimbou L, Davignon J, Cohn JS. Plasma lipoprotein distribution of apoC-III in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects: comparison of the apoCIII to apoE ratio in different lipoprotein fractions. *Journal of Lipid Research*.1997; (38):1421-1432.
9. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of apoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between apoC1, apoC2, and apoC3. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 1999 (19): 472-484.
10. Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, Van DBH, Van BTJ, Havekes LM. Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice. *Journal of Lipid Research*.2001; (42):1578-1585.
11. Aalto SK, Chen X, Chajek ST, Hayek T, Zechner ER. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein against fat-induced insulin resistance. *Duodecim*. 2007;13 (2)123- 207.
12. Godoi V, Mamus GB, Rezende DGL, Primo MA, Pedrosa MMD, Berti JA. Changes of Liver Glucose Metabolism in C57BL/6 Mice Transgenic for Human Apolipoprotein ApoCIII. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018; (6):456-465.
13. Raposo HF, Paiva AA, Kato LS, Oliveira HCF. Apolipoprotein CIII overexpression exacerbates diet-induced obesity due to adipose tissue higher exogenous lipid uptake and retention and lower lipolysis rates. *Nutrition & Metabolism*. 2015; (12)61.
14. Paiva AA, Raposo HF, Wanschel ABCA, Nardelli RT, Oliveira FCH. Apolipoprotein CIII overexpression induced hypertriglyceridemia increases nonalcoholic fatty liver disease in association with inflammation and cell death oxidative. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017: 1-18.
15. Yingchun H, Yahong M, Jiangping W, Xiaokui H, Xiaohong Z. Increased inflammation, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in endothelial and macrophage cells exacerbate atherosclerosis in ApoCIII transgenic mice. *Lipids in Health and Disease*. 2018; 17:220 Disponível em: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-018-0867-5>.
16. Barrett KE. *Fisiologia Gastrointestinal*. 2ed. Porto Alegre: AMGH Editora; 2015.

17. Hall JE, Guyton. Fundamentos de Fisiologia. 12ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
18. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apolipoprotein C-III gene expression in transgenic mice. *Science*,1990;(249):790-793.
19. Luck H, Tsai S, Winer S. Cell Metabolism Review The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 2016 March; 23(8): 413-426.
20. Jonsson LA, Caesar R, Akrami R, Reinhardt C, Hallenius FF, Borén J, et al. Impact of Gut Microbiota and Diet on the Development of Atherosclerosis in ApoE Mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2018; (38):2318-2326.
21. Santos AGA, Lima LL, Mota AC, Gois BM, Fernandes SBCA, Silveira VGT, et al. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliens* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. *Biomedicine & Pharmacoteraphy*. 2018;(106):1624-1632.
22. Trevizan RA, Vieira VLS, Watanabe SP, Góis BM, Melo NAG, Garcia LJ, et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Experimental Parasitology*.2016;(165):22-29.
23. Benoit B, Plaisancié P, Géloën A, Estienne M, Debard C, Meugnier E, et al. Pasture v. standard dairy cream in high-fat diet-fed mice: improved metabolic outcomes and stronger intestinal barrier. *British Journal of Nutrition*. 2014; 112: 520-535.
24. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2001 Mar;39(3):209-228.
25. Fandriks L, Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. *Journal Internal Medicine*.2017; (281):319-336.

**Palavras-chave:** metabolismo lipídico; trato gastrointestinal; morfologia.



## **EFEITO DO 5-FLUOROURACIL NO ÍLEO DE RATOS *WISTAR* TRATADOS COM DOSE EQUIVALENTE À ADMINISTRADA EM HUMANOS**

**Lilian Catarim Fabiano<sup>1</sup>; Pedro Luiz Zonta de Freitas<sup>1</sup>; Karile Cristina da Costa<sup>1</sup>; Mariana Conceição da Silva<sup>2</sup>; Camila Quaglio Neves<sup>3</sup>; Stephanie Carvalho Borges<sup>4</sup>; Ana Cristina Breithaupt-Faloppa<sup>5</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Pesquisador científico do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

<sup>6</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: lcatarim@hotmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O câncer tem uma incidência e taxa de mortalidade que vem aumentando mundialmente com o passar dos anos, podendo estar relacionado a diversos fatores. Dentre os tratamentos para tentar conter esta patologia está a quimioterapia. Esta tem como alvo reduzir o tumor matando suas células cancerígenas, pois as células com alta velocidade de mitose são mais sensíveis a estas drogas (1). Um fármaco padrão e com sua eficiência comprovada no tratamento de diversos tipos de câncer como o colo retal, de mama, estômago e pâncreas é o 5-fluorouracil (5-FU) (2), podendo ser usado em monoterapia ou em associação com outras drogas (3,4). O 5-FU é um quimioterápico antifolato, um análogo da timina e da uracila. Seu mecanismo de ação está relacionado com o bloqueio na replicação do DNA e na formação do RNA, impedindo a divisão celular (5).

A quimioterapia é distribuída de forma sistêmica e atua não apenas nas células tumorigênicas, mas também em células saudáveis, apresentando diversos efeitos colaterais (6). Dentre eles alterações no trato gastrointestinal, as quais promovem quadros de diarreia, vômito, perda de peso, mucosite, além de toxicidades hematológicas o que limita o uso do 5-FU. Visando avaliar os efeitos deste quimioterápico a maioria das pesquisas é realizada com doses muito elevadas e em intervalos de tempo diferentes da realidade clínica (7,8). Em altas doses este quimioterápico provoca complicações gastrointestinais e danos teciduais observados por meio de avaliação histológica, análise de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo (EO) (8,9). No entanto, poucos estudos foram realizados sobre as alterações no trato gastrointestinal com a dose clínica do 5-FU.

Com isso a proposta deste trabalho foi fornecer informações sobre as alterações provocadas pelo 5-FU, quando administrado em doses clínicas, sobre a inflamação, estresse oxidativo e modificações morfológicas da parede do íleo de ratos *Wistar*.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.1. Animais e protocolo experimental**

Foram utilizados 12 ratos machos da linhagem *Wistar* com 60 dias (peso 230-250g) obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas desta mesma instituição de ensino. Os ratos ficaram acondicionados com temperatura de aproximadamente 22° C, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, sem restrição de água e ração. A ração fornecida foi a padronizada para roedores NUVILAB® (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute - USA). O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº 4422140918).

Os ratos foram distribuídos em 2 grupos experimentais (n=6/grupo). O grupo tratado (T) com 5-FU recebeu via intraperitoneal 15 mg/kg de peso corporal por 4 dias consecutivos, seguido da redução da dose

para 6mg/kg de peso corporal por 4 dias alternados, por fim administrando a última dose de manutenção de 15mg/kg no 14º dia, seguindo protocolo utilizado em tratamento clínico humano. O grupo controle (C) recebeu via intraperitoneal veículo (soro fisiológico) nos mesmos dias em que foram realizados a administração no grupo T. Nas ultimas 12 horas que antecederam a eutanásia os animais foram mantidos em jejum de 12 horas de ração.

## **2.2. Coleta dos órgãos**

Todos os ratos foram eutanasiados no 15º dia com dose letal (120mg/kg de peso corporal) de Tiopental Sódico (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) por via intraperitoneal. Sucessivamente ocorreu a laparotomia abdominal mediana e coleta do íleo. Os segmentos foram fracionados para a realização das técnicas de estresse oxidativo, inflamação e histológicas.

## **2.3. Avaliação do estresse oxidativo**

### **2.3.1. Espécie reativa de oxigênio (EROs)**

As amostras foram pesadas e homogeneizadas em tampão sódio 80 mM pH 7,4. O homogenato foi incubado por 40 minutos com sonda fluorescente DCFH (diclorofluoresceína) (1 mM) por 40 minutos ao abrigo da luz. A fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro. Todas as medidas foram feitas utilizando comprimento de onda com excitação de 488 nm e emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidade de fluorescência.

### **2.3.2. Hidroperóxidos Lipídicos (LOOH)**

A concentração de hidroperóxidos lipídicos foi medida através do ensaio de oxidação de ferro II na presença de xilenol laranja. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas. O sobrenadante e o reativo foram incubados em microplacas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (560 nm). Os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido.

### **2.3.3. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)**

Essa técnica baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. As reações foram realizadas em tampão TRIS-HCL 200 mM com EDTA 2 mM em pH 8,5 a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405 nm) e os resultados expressos em U SOD/mg de proteína.

### **2.3.4. Atividade enzimática da catalase (CAT)**

Para a realização da técnica CAT foi adicionado ao sobrenadante a solução mix contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) e tampão TRIS-HCL 0,4 M pH 8,5. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 240 nm em um período de 5 min. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

### **2.3.5. Grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH)**

Para verificação dos níveis de GSH, o ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado ao homogenato para precipitação de proteínas. Em seguida foi adicionada o DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico). A leitura foi realizada em Espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. Os valores foram interpolados numa curva padrão de GSH e expressos em µg GSH/g de tecido.

### **2.3.6. Atividade enzimática da glutiona S-transferase (GST)**

Para a atividade da GST foi adicionado ao sobrenadante tampão fosfato de potássio contendo CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e GSH. A cinética foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

## **2.4. Marcadores inflamatórios**

### **2.4.1. Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)**

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 200 mM pH 6,5. O precipitado resultante foi ressuspendido em tampão fosfato de potássio (0,08 M) com hexadeciltrimetilamônio (HTAB) em pH 5,4. A amostra foi novamente centrifugada e adicionada tetrametilbenzidina (TMB). A atividade enzimática foi observada sob leitura em espectrofotômetro a 620 nm, e os resultados foram expressos em unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína.

### **2.4.2. Atividade enzimática da N-acetil-glucosaminidase**

A análise de n-acetil-glicosaminidase (NAG) foi realizada ressuspendendo o pellet com tampão fosfato de potássio (0,08 M) com HTAB (0,5 %) pH 5,4. A amostra foi centrifugada, colocada em microplaca de 96 poços e adicionado tampão citrato (50 mM, pH 4,5) e solução NAG (2,24 mM). A reação foi interrompida com tampão glicina (200 mM, pH = 10,4). Foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos em unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína.

### 2.4.3. Proteínas totais

A análise da concentração proteica do sobrenadante foi realizada utilizando o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA). A leitura foi realizada utilizando placa de 96 poços em espectrofotômetro a 462 nm.

### 2.4.4. Interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6)

As amostras de tecido foram centrifugadas e as concentrações foram verificadas por kit de ensaio (ELISA) (R&D Systems) conforme instruções do fabricante.

### 2.5. Histologia

O material coletado para realização das técnicas histológicas foi fixado em álcool 70% por 6 horas, posteriormente desidratado em bateria de álcool e diafanizado em xilol. Após este processo foi incluído em parafina e cortado em micrótomo (5  $\mu$ m) e mantido em lâmina histológica. O material foi submetido a técnica de coloração HE (Hematoxilina e Eosina). As imagens foram capturadas por meio de microscópio óptico (objetiva de 10X) com auxílio de sistema de captura de câmera de alta resolução. Foram realizadas 50 medidas para cada uma das estruturas analisadas (parede total, altura do vilos, profundidade da cripta, largura do vilos, submucosa e muscular).

### 2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Graphpad Prism 7. Para os dados com distribuição normal de dados foram realizadas as análises de variância One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Os dados que não passaram no teste de normalidade, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns. Foi considerado estatisticamente significativo valor de  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

Os resultados bioquímicos de estresse oxidativo (Tabela 1), parâmetros inflamatórios (Tabela 2) e histológicos (Tabela 3) constataram diversas alterações no íleo de animais tratados com 5-FU. O tratamento promoveu aumento de 28,8% de EROs no grupo T em comparação ao grupo C ( $p < 0,05$ ). A LOOH foi alterada no grupo T, ocorrendo um aumento no seu nível de 8,23% ( $p < 0,05$ ). A enzima SOD não apresentou alteração significativa no grupo T em comparação ao grupo C. A enzima CAT sofreu uma redução de 23,71% na sua atividade ( $p < 0,01$ ) comparado com o grupo C. O nível de GSH tecidual no íleo do grupo T sofreu redução de 21,25% em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que a atividade da enzima GST foi alterada no grupo T tendo um aumento 6,01% ( $p < 0,01$ ). A atividade das enzimas NAG e MPO e a concentração das IL-1 e IL-6 não apresentaram alterações significativas no grupo T em comparação ao grupo C. No entanto, houve uma redução de 28,54% no nível de proteínas totais do grupo T quando comparado com o grupo C ( $p < 0,01$ ). Quanto aos parâmetros histológicos houve uma redução de 3,04% na altura dos vilos ( $p < 0,0001$ ) e aumento de 6,71% da submucosa ( $p < 0,0001$ ), profundidade da cripta de 15,44% ( $p < 0,0001$ ) e largura do vilos de 17,31% ( $p < 0,0001$ ) no grupo tratado. No entanto não houve alteração nas medidas de parede total e da túnica muscular.

**Tabela 1. Parâmetros de estresse oxidativo**

	GRUPO C	GRUPO T
EROs (unidade de fluorescência)	5760 $\pm$ 648,0	7419 $\pm$ 312,1 *
LOOH (mmol/mg de tecido)	82,21 $\pm$ 2,560	88,98 $\pm$ 0,4351 *
SOD (U SOD/mg de proteína)	1,023 $\pm$ 0,06595	0,8746 $\pm$ 0,03881
CAT (mmol/min/mg de proteína)	0,01921 $\pm$ 0,004350	0,004555 $\pm$ 0,001003 **
GSH ( $\mu$ g GSH/g de tecido)	257,8 $\pm$ 14,37	203,0 $\pm$ 11,59 *
GST (mmol/min/mg de proteína)	18,79 $\pm$ 1,248	19,92 $\pm$ 0,3972 **

Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

**Tabela 2. Parâmetros inflamatórios**

	GRUPO C	GRUPO T
IL-1 (pg/mg de proteína)	21,6 $\pm$ 8,512	21,66 $\pm$ 16,58
IL-6 (pg/mg de proteína)	38,54 $\pm$ 11,62	40,08 $\pm$ 16,78
MPO (mD.O./mg de proteína)	0,1378 $\pm$ 0,01539	0,1605 $\pm$ 0,02928
NAG (mD.O./mg de proteína)	0,7925 $\pm$ 0,06477	0,8931 $\pm$ 0,04338
Proteína ( $\mu$ g/ $\mu$ L)	18,39 $\pm$ 1,225	13,14 $\pm$ 0,5372 **

Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

**Tabela 3. Parâmetros histológicos**

	<b>GRUPO C</b>	<b>GRUPO T</b>
<b>Parede total (µm)</b>	495,4 ± 3,199	508,2 ± 4,478
<b>Altura do viló (µm)</b>	243,2, ± 2,348	235,8, ± 2,84 ***
<b>Profundidade da cripta (µm)</b>	145, ± 1,664	167,4, ± 2,375 ***
<b>Largura do viló (µm)</b>	53,47, ± 0,6906	62,73, ± 0,8929 ***
<b>Submucosa (µm)</b>	30,99, ± 0,354	33,07, ± 0,381***
<b>Muscular (µm)</b>	52,06, ± 0,6517	50,96, ± 0,8584

Os resultados representam a média ± erro padrão. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $p < 0,0001$

#### 4. DISCUSSÃO

A patogênese da mucosite envolve uma cascata de fatores biológicos, como a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que desencadeia alteração na morfologia e interrupção da integridade na barreira da mucosa intestinal, danifica tecidos e vasos sanguíneos e adicionalmente liberam citocinas inflamatórias como as IL-1 e IL-6 (10). Apesar da mucosite ser caracterizada, também, por alterações inflamatórias, não observamos alteração das IL-1 e IL-6 e nem na atividade das enzimas MPO e NAG. Outros trabalhos observaram elevação na expressão de IL-1 e IL-6 (11) e na atividade de NAG e MPO (12), no entanto, a dose por eles utilizada foi maior (50mm/kg e 200mg/kg de peso respectivamente). Segundo Sonis (9) a inflamação que acontece na mucosite é desencadeada somente por altas doses de quimioterápico. Em nosso trabalho utilizamos dose equivalente ao tratamento clínico a qual não foi capaz de promover inflamação.

Além da inflamação, a mucosite também é caracterizada por outros fatores e em nosso trabalho encontramos um aumento significativo de EROs e hidroperóxidos lipídicos, além de alteração morfológica da mucosa. Estas alterações também foram observadas por outros autores (8, 13). Os efeitos oxidativos podem ser o ponto inicial para a formação da mucosite (9,12) sendo evidenciado após o uso de altas doses de 5-FU (14). A formação de EROs e consequente aparecimento de um quadro de estresse oxidativo por quimioterápicos causam danos ao DNA podendo causar morte celular no epitélio intestinal, danificando diretamente o tecido e vasos sanguíneos e gerando uma cascata de eventos biológicos (9). Na tentativa de proteção desses efeitos tóxicos ocorre a ação do sistema de defesa antioxidante, prevenindo os danos oxidativos decorrentes de quimioterápicos (15,16). Os efeitos oxidativos podem estar relacionados ao aumento da peroxidação lipídica e na geração de EROs e/ou na falha do sistema antioxidante endógeno composto dentre outras pelas enzimas GST, SOD e CAT. Em nosso estudo, não observamos alteração na SOD, no entanto, a CAT apresentou uma redução significativa. O declínio na atividade enzimática da CAT resulta em acúmulo de peróxido de hidrogênio e consequentemente a célula sofre efeitos deletérios como a perda da integridade da membrana celular (15). Outros trabalhos observaram que os quimioterápicos realmente podem desencadear a depleção da atividade de enzimas como a CAT, que participam do sistema de defesa antioxidante (16). Observamos, contudo, que a GST apresentou aumento significativo. A atuação da GST pode ser observada após o uso de compostos xenobióticos, incluindo quimioterápicos, cuja atividade pode aumentar devido a citotoxicidade desse grupo de drogas (17). Ray e colaboradores (7) observaram uma redução no nível de GSH assim como em nosso estudo. O aumento de GST e a redução da GSH podem estar relacionados, pois a GSH é um doador de elétrons para a GST (18). Estes resultados demonstram que o 5-FU promove estresse oxidativo.

Além do estresse oxidativo, dentre os parâmetros que caracterizam a mucosite temos a alteração na morfologia da parede intestinal. Altas doses de 5-FU causam graus variados de toxicidade acompanhados de diversas alterações na morfologia da parede intestinal (8), no entanto, pouco se sabe sobre as alterações ocasionadas com a dose clínica de 5-FU. Na avaliação da morfologia da parede, observamos em nosso estudo uma redução na altura e aumento na largura dos vilos, aumento na profundidade da cripta e espessura da túnica submucosa. As perturbações na mucosa intestinal por quimioterápicos foram relacionadas ao efeito tóxico causado pelos antineoplásicos, com formação de abscessos e destruição das criptas, espessamento e edema da camada submucosa e encurtamento das vilosidades (16,19).

#### 5. CONCLUSÃO

A administração de dose clínica de 5-FU é capaz de desencadear diversas alterações estruturais e bioquímicas no íleo de ratos, com evidentes danos oxidativos acompanhados de alterações na estrutura da parede caracterizando a mucosite. As alterações com altas doses demonstram modificações mais acentuadas, no entanto, não condizem com a prática clínica utilizada na terapia oncológica. Novos estudos poderão avaliar promissoras moléculas capazes de amenizar os efeitos colaterais do 5-FU, dentre eles a mucosite.



## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Ciências morfológicas e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá e ao laboratório LIM/11- Laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação da Faculdade de Medicina da USP.

## REFERÊNCIAS

1. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:206-12.
2. Jatto J, Oboh E, Ntekim A. 5-fluorouracil induced cardiotoxicity in a young patient with colon cancer: An unusual finding. *J Oncol Res Ther: JONT-135.* 2017; doi: 10.29011/2574-710X. 000035.
3. Xu ZY, Tang JN, Xie HX, Du YA, Huang L, Yu PF, et al. 5-fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells. *Int J Biol Sci.* 2015;11(3):284-94.
4. Malet-Martino MMR. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): A review. *Oncologist.* 2002;7(4):288-323.
5. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8.
6. Gelen V, Şengül E, Yıldırım S, Atila, G. The protective effects of naringin against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(4):404-10.
7. Ray S, Roy k, Sengupta C. In vitro evaluation of protective effects of ascorbic acid and water extract of *Spirulina plantesis* (blue green algae) on 5-fluorouracil-induced lipid peroxidation. *Acta Pol Pharm.* 2007;64(4):335-44.
8. Soares PM, Mota JMS, Souza EP, Justino PF, Franco AX, Cunha FQ, et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. *Cytokine.* 2013;61(1):46-9.
9. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):277-84.
10. Mashtoub S, Tran CD, Howarth GS. Emu oil expedites small intestinal repair following 5-fluorouracil-induced mucositis in rats. *Exp Biol Med.* 2013;238(11):1305-17.
11. Medeiros ADC, Azevedo ÍM, Lima ML, Araújo Filho I, Moreira MD. Effects of simvastatin on 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2018;45(5).
12. Leocádio PC, Antunes MM, Teixeira LG, Leonel AJ, Alvarez-Leite JI, Machado DC, et al. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice. *Nutr Cancer.* 2015;67(3):486-93.
13. Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Kang HK, Chang WY, Park IC, et al. Epigenetic modification of Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells: Involvement of TET-dependent DNA demethylation. *Cell Death Dis.* 2014;5(4):e1183.
14. Shiota A, Hada T, Baba T, Sato M, Yamanaka-Okumura H, Yamamoto H, et al. Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. *J Med Invest.* 2010;57(3,4):314-20.
15. Muthu R, Thangavel P, Selvaraj N, Ramalingam R, Vaiyapuri M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Biomedicine & Preventive Nutrition.* 2013;3(1):74-82.
16. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Amri M, Sebai H, Marzouki L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicol Mech Methods.* 2018;28(4):262-7.
17. Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD, Reddy CC. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 2004;424(1):72-80.
18. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(9-10):916-21.
19. Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Limori M, Matsumoto K, Utsumi D, et al. 5-HT3 receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *Br J Pharmacol.* 2013;168(6):1388-1400.

**Palavras-chave:** 5-fluorouracil; estresse oxidativo; mucosite.



## TRATAMENTO COM ROSUVASTATINA INTENSIFICA ALTERAÇÕES NO DUODENO DE CAMUNDONGOS SWISS (*Mus musculus*) INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii*

Nelson Raimundo de Miranda Júnior<sup>1</sup>; Isabela Alessandra Mariano<sup>2</sup>; Priscilla de Laet Sant'Ana<sup>3</sup>; Ana Lucia Falavigna Guilherme<sup>3</sup>; Andréia Vieira Pereira<sup>4</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia – Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia - Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

e-mail: prof.junior07@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, é considerado o protozoário mais difundido no mundo, pois, infecta cerca de 50 a 80% da população humana (1). No Brasil, apresenta frequências mais elevadas nos Estados do Sul (2) e Norte (3,4,5).

Nos seres humanos a infecção ocorre por meio das três formas evolutivas do parasito: esporozoítos, bradizoítos e taquizoítos. Os esporozoítos presentes em oocistos são eliminados nas fezes de felídeos infectados e dispersos no ambiente atingindo a água, frutas e verduras que quando ingeridas levam a infecção. Os bradizoítos presentes nos cistos teciduais em carnes cruas ou mal cozidas quando ingeridos também levam à infecção. E, os taquizoítos, que por via transplacentária em gestantes sob infecção aguda causam toxoplasmose congênita (6,7) e podem mais raramente ser transmitidos por sangue, tecidos ou órgãos (8).

Vários estudos já demonstraram que a toxoplasmose pode acarretar muitos danos a vida dos indivíduos, e, dentre estes, alterações intestinais envolvendo desde o intestino delgado ao grosso (9-15) independente da via de infecção (16). Na infecção aguda por *T. gondii* podem ocorrer mudanças na parede intestinal e em células do epitélio de revestimento interno do duodeno de ratos, bem como aumento na largura dos vilos (18), mudanças que caracterizam uma reação inflamatória local e podem alterar sua função.

Apesar da importância desta doença ainda não existem tratamentos eficazes. O tratamento da fase aguda apresenta amplos efeitos colaterais e baixa eficácia. E, na fase crônica não há medicamentos capazes de destruir o parasito no interior dos cistos. A impossibilidade de eliminar o parasito leva a quadros de reatuação em imunodeprimidos, bem como alterações resultantes da cronificação tornando-se cada vez mais graves.

Este contexto justifica a necessidade de pesquisas no desenvolvimento de novas formas medicamentosas de tratamento, porém, sabe-se que este processo é demorado e dispendioso. Uma alternativa é a utilização de medicamentos já disponíveis em formulações comerciais para outros fins (16) aumentando a segurança e rapidez na obtenção de novos fármacos. Assim, diversas drogas têm sido testadas experimentalmente, mas poucas têm dados conclusivos sobre estudos clínicos e laboratoriais, já que cepas de *T. gondii* são resistentes a muitos deles (17).

Na busca de novos medicamentos para combate ao *T. gondii*, foram analisadas as estatinas, e, especificamente a Rosuvastatina que nos humanos inibe a síntese de colesterol. Esta molécula também inibiu os processos iniciais de biossíntese de isoprenóis neste protozoário apresentando efeitos antiproliferativos em taquizoítos (19) e ampliando a possibilidade de novo uso terapêutico para este fármaco. As estatinas também exibem propriedades imunomoduladoras e sua ação está relacionada à estimulação de células imunes (22). As estatinas são drogas relativamente bem toleradas e apresentam poucos efeitos adversos (19).

Tendo em vista a eficácia das estatinas sobre a proliferação de taquizoítos de *T. gondii* *in vitro* descrito na literatura recente, e a ausência de estudos sobre tratamentos que além de controlar a infecção auxiliem na redução, ou melhora das alterações intestinais, objetivou-se avaliar se a terapia com Rosuvastatina na concentração de 40mg/kg/dia, previne as alterações provocadas pela infecção toxoplásmica em sua fase crônica sobre o duodeno de camundongos.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. Animais, infecção e tratamento

O procedimento experimental foi aprovado pela CEUA/UEM sob nº 5654290317. Foram utilizados 20 camundongos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas, com 21 dias de idade e massa corporal entre 40 e 45g obtidos no biotério central da UEM, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5). Grupo Controle (GC) animais saudáveis sem infecção, Grupo Infectado (GI), Grupo Tratado (GTR-40) sem infecção, mas receberam o tratamento e Grupo Infectado e Tratado (GITR-40). Estes animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas (6h – 18h). Todos os animais foram tratados com antiparasitários por 5 dias antes do início dos procedimentos experimentais. Aos 27 dias de idade os animais dos grupos GI e GITR-40 foram infectados por via oral com 25-30 cistos teciduais da cepa ME-49 (genótipo II) de *T. gondii* re-isolados do encéfalo de outros camundongos previamente inoculados. Após 23 dias de infecção (aos 50 dias de idade), os animais dos grupos GTR-40 e GITR-40 foram tratados por 21 dias consecutivos com rosuvastatina na dose de 40 mg/Kg/dia por via oral. Os grupos infectado e não tratado receberam solução salina no mesmo volume.

## 2.2. Eutanásia e coleta de amostras

Após 24 horas do término do tratamento, os camundongos foram submetidos à eutanásia numa câmara saturada com halotano. Sofreram laparotomia e coletado o duodeno.

## 2.3. Procedimentos histológicos

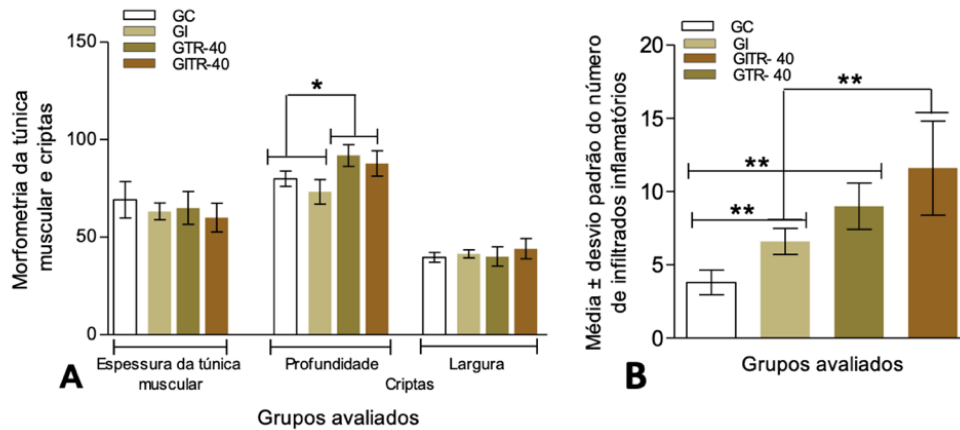
Cortes corados em hematoxilina e eosina (H&E) foram utilizados para as análises histopatológica, morfométricas e quantitativas de células no intestino; (PAS) mais solução de diástase para detecção de mucinas neutras e sialomucinas lábeis; *alcian-blue* (AB) pH 2,5 para detecção de sialomucinas e sulfomucinas; e *alcian-blue* (AB) pH 1,0 para detecção de sulfomucinas. *Picro-sirius red* para evidenciação de fibras colágenas. (PAS, AB pH 2,5 e AB pH 1,0) foi adotado para quantificar as células caliciformes. Para contagem de células de *Paneth*, utilizou-se 50 campos em uma área de 0,14 mm<sup>2</sup>/campo, escolhidos aleatoriamente na região de criptas, com distância mínima de 100µm entre eles, por animal em objetiva de 40x. Contagem de infiltrados inflamatórios realizado por meio de imagens de 100 campos microscópicos e capturadas por meio de microscópio fotônico trinocular e lente objetiva de 40X (*Olympus BX50*<sup>®</sup> - Minato - Ku, Japão) acoplado à câmera de vídeo (3CCD Pro-series<sup>®</sup>) de alta resolução. Todos os cortes foram fixados com *permount* e laminulas.

## 2.4. Análise estatística

Os dados foram, inicialmente, submetidos ao teste de *Shapiro-Wilk* ou *D'Agostino-Pearson* para a verificação do tipo de distribuição. Os dados com distribuição normal foram comparados por meio de ANOVA - *One Way* e pós-teste de *Tukey*. Aqueles com distribuição livre foram comparados por ANOVA - *One Way* e o pós-teste foi o teste de *Mann Whitney*. Em todas as análises foi utilizado o *software* GraphPad Prism version 5.01. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

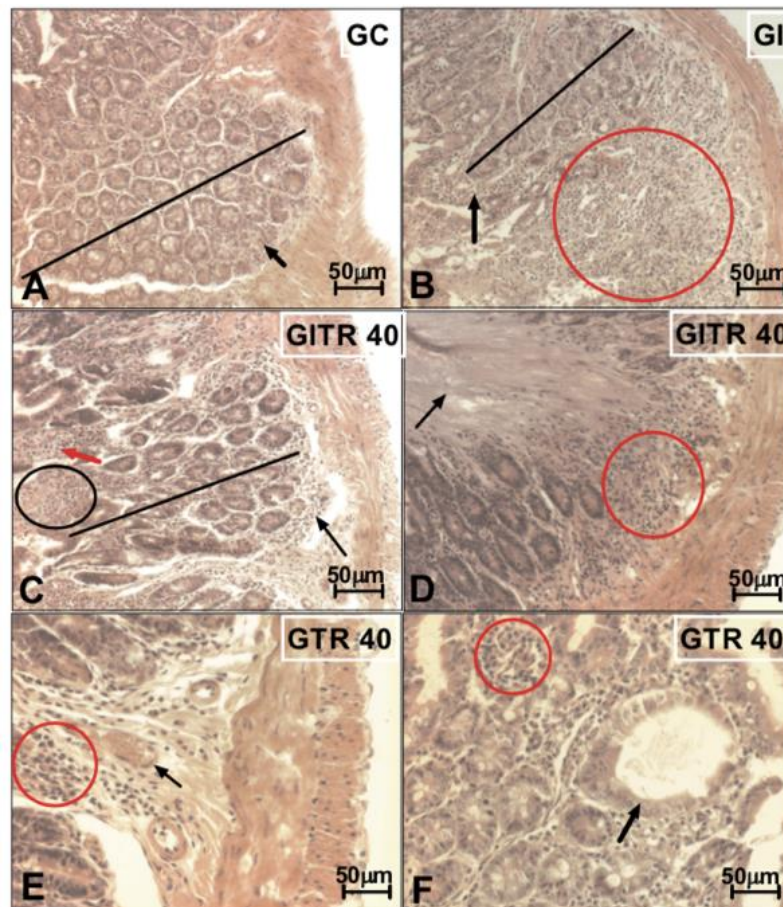
## 3. RESULTADOS

Na análise morfométrica da parede intestinal, não observou significância estatística quanto a espessura da túnica muscular (Figura 1 A), entretanto, observou alterações quanto a profundidade das criptas entre os grupos GC ( $79,9 \pm 3,9 \mu\text{m}$ ) e GI ( $73,2 \pm 6,3 \mu\text{m}$ ), quando relacionado aos GTR-40 ( $91,8 \pm 5,5 \mu\text{m}$ ) e GITR-40 ( $87,7 \pm 6,5 \mu\text{m}$ ) ou seja, a infecção promoveu uma diminuição da profundidade das criptas (GC x GI; GTR40 x GITR40) enquanto a rosuvastatina promoveu um aumento (GC x GTR40; GI x GITR40;  $p < 0,05$ ), (Figura 1 A). Observou-se infiltrados mononucleares difusos e intensos na túnica muscular, túnica mucosa, mais expressivos nos grupos GTR-40 ( $9,0 \pm 1,5$  infiltrados/animal) e GITR-40 ( $11,6 \pm 3,2$ ) em relação aos seus respectivos controles GC ( $3,8 \pm 0,8$  infiltrados/animal) GI ( $6,6 \pm 0,8$ ;  $p < 0,05$ ). Ademais, podemos observar diferença significativa entre GC ( $3,8 \pm 0,8$ ) e GI ( $6,6 \pm 0,8$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 1 B). Ou seja, tanto a infecção quanto o uso da rosuvastatina induziram uma resposta inflamatória local no duodeno.



**Figura 1. Aspectos morfométricos e histopatológicos do duodeno de camundongos infectados com cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II) e tratados com Rosuvastatina.** Média ± desvio padrão de mensurações da parede intestinal, espessura da túnica, profundidade e largura das criptas expressos em µm (A). Média ± desvio padrão de infiltrados inflamatórios por animal (B) apresentados como números de infiltrados inflamatórios por animal. Cortes histológicos com 4 µm de espessura, corados em H&E, objetiva de 20x. \* e \*\* indicam  $p < 0,05$ .

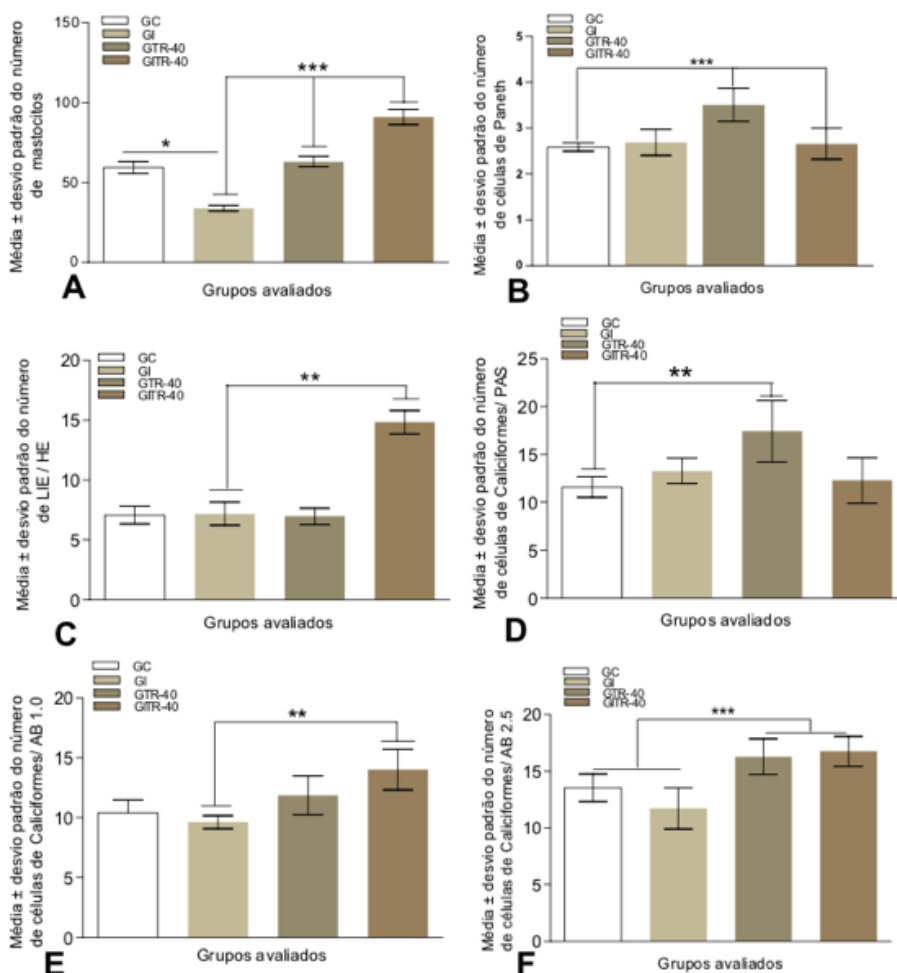
Na Figura 2, podemos observar os danos causados pelo parasito e intensificados pela Rosuvastatina. Constatou-se diminuição da área ocupada pelas glândulas de Brunner em GI e GI-R40; lesões mais severas como erosão e infiltrados inflamatórios difusos em epitélio, lâmina própria e muscular. No grupo infectado e tratado com Rosuvastatina, foi observado erosão (lateral e apical do vilos), edema e prolapso de glândula de Brunner. Já no grupo tratado com rosuvastatina, os infiltrados inflamatórios foram mais intensos e distribuídos difusamente em epitélio, lâmina própria e muscular.



**Figura 2. Aspectos histopatológicos do duodeno de camundongos infectados com cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* da cepa ME-49 (genótipo II).** Cortes histológicos com 4 µm de espessura, corados

**em HE, objetiva de 40x.** (A) Grupo controle (GC), seta indica glândulas de Brunner; (B) grupo infectado, pode-se observar diminuição da área ocupada pelas glândulas de Brunner em GI e GI-R40 (linha preta); Erosão em epitélio (seta preta); Infiltrado difuso em epitélio, lâmina própria e muscular (círculo vermelho). (C e D), grupo infectado e tratado com Rosuvastatina, Erosão lateral e apical do vilos (seta vermelha); Edema moderado (círculo preto); prolapso da glândula de Brunner (seta preta), Infiltrado Difuso (círculo vermelho). (E e F), grupo tratado com rosuvastatina, observa-se foco inflamatório intenso (círculo vermelho); congestão intensa em vaso (seta preta E); erosão total de vilos (seta preta F) e Foco inflamatório intenso (círculo vermelho) bem como focos inflamatórios distribuídos difusamente em epitélio, lâmina própria e muscular.

Nos vilos do duodeno dos animais do GI ( $33,8 \pm 1,8 \text{ mm}^2$ ) foi observado diminuição de mastócitos em relação ao GC ( $59,3 \pm 3,7 \text{ mm}^2$ ), sendo observado no GITR-40 ( $91,1 \pm 4,7 \text{ mm}^2$ ) aumento na proporção destas células em relação ao GTR-40 ( $63,1 \pm 3,3 \text{ mm}^2$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 3 A). Portanto, a infecção levou a redução destas células quando não houve tratamento, todavia, o tratamento pela rosuvastatina provocou um aumento dos mastócitos. Foi também observada redução de células de *Paneth*, apenas no GITR-40 ( $2,6 \pm 0,3$  células/campo microscópico) em relação ao GTR-40 ( $3,5 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 3 B). Os linfócitos intraepiteliais (LIEs) apresentaram aumento em sua proporção apenas no GITR-40 ( $14,8 \pm 0,9$  % LIEs/100 células epiteliais) em relação ao GI ( $7,1 \pm 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 3 C). As células calciformes produtoras de mucinas neutras (PAS) do GTR-40 ( $17,4 \pm 3,2$ ) tiveram sua proporção aumentada, alcançando significância estatística quando comparado ao GC ( $11,6 \pm 1,0$  % de células epiteliais) (Figura 3 D). As produtoras de sulfomucinas (AB 1,0) sofreram alterações quanto a sua proporção no GITR-40 ( $14,0 \pm 1,6$ ) em relação ao GI ( $9,6 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 3 E), enquanto as produtoras de sialomucinas (AB 2,5) tiveram seu número aumentado GTR-40 ( $16,2 \pm 1,5$ ) e GITR-40 ( $16,7 \pm 1,3$ ) em relação aos seus respectivos controles GC ( $13,5 \pm 1,2$  por células epiteliais) e GI ( $11,7 \pm 1,8$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 3 F).



**Figura 3. Média ± desvio padrão de mastócitos, linfócitos intraepiteliais (LIEs) e células calciformes/100 células epiteliais e células de *Paneth* presentes na túnica mucosa do duodeno, quantificados em objetivas de 40x e 100 x respectivamente.** (A) No GI foi observado uma diminuição na proporção de mastócitos em relação ao GC, sendo observado no GITR-40 aumento na proporção destas células em relação ao GTR-40 ( $p < 0,05$ ). (B) Redução na proporção de células de *Paneth*, no GITR-40 em relação ao GTR-40 e ao GC. (C) Aumento na proporção de LIEs apenas no GITR-40 em relação ao GI ( $p < 0,05$ ). (D) (PAS) do GTR-40 tiveram seu número aumentado, alcançando significância estatística



quando comparado ao GC. (E)(AB 1,0) sofreram alterações quanto a sua proporção no GTR-40 em relação ao GI ( $p < 0,05$ ), (F)(AB 2,5) tiveram seu número aumentado GTR-40 e GTR-40 em relação aos seus respectivos controles GC e GI ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

A literatura aponta que em modelos de cultura celular o uso de diferentes estatinas reduzem o número de células *Hela* infectadas e o número de parasitos intracelulares (19) sendo que a rosuvastatina apresentou melhores efeitos (19). Todavia, é necessário o estudo in vivo visando compreender como o organismo animal responde a este tratamento, neste estudo, pela primeira vez foi analisado os efeitos da rosuvastatina sobre o intestino de roedores.

Neste modelo experimental a cepa do parasito utilizada é caracterizada por cronificação da doença e já demonstrou em outros estudos com roedores seu potencial histopatológico intestinal (11). Neste estudo verificamos que a rosuvastatina pode ampliar os efeitos inflamatórios locais provocados pela infecção toxoplásmica. Um possível mecanismo esteja no fato da rosuvastatina exercer efeitos que alteram a resposta imune intestinal (23) e possivelmente também altere o balanço entre a resposta do hospedeiro e a infecção. Isso foi verificado no duodeno, pois a infecção promoveu uma diminuição da profundidade das criptas enquanto a rosuvastatina promoveu um aumento. Houve uma resposta inflamatória local, com maior concentração de mastócitos na lâmina própria, promovida tanto pela infecção quanto pelo uso da rosuvastatina, mostrando-se acumulativo entre os fatores. O número de linfócitos que se tornaram intraepiteliais aumentou significativamente quando se somou a infecção e o tratamento, mostrando também efeitos cumulativos.

A rosuvastatina promove aumento das mucinas produzidas por células caliciformes em geral, o que resulta numa maior quantidade de muco luminal (18). O número de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas aumentaram em animais infectados e tratados, mostrando que a rosuvastatina sozinha tenderia a aumentar o muco com características neutras e em animais infectados passa a acidificar o muco produzido, tornando-o mais fluido.

#### 5. CONCLUSÃO

O uso da rosuvastatina induziu uma resposta inflamatória no duodeno e a infecção reduziu os mastócitos quando não houve tratamento. O tratamento provocou um aumento dos mastócitos. Redução de células de *Paneth* no grupo infectado e tratado. LIEs aumentaram em sua proporção apenas no grupo infectado/tratado. Produtoras de mucinas neutras tiveram seu número aumentado no grupo tratado. As sulfomucinas alteraram quanto a sua proporção no grupo infectado. As produtoras de sialomucinas tiveram seu número aumentado nos dois que houve tratamento com rosuvastatina.

#### REFERÊNCIAS

1. Silva AF, Brandão FZ, Oliveira FCR, Ferreira AMR. *Toxoplasma gondii* in the sheep industry: A global overview and the situation in Brazil. Rev Bras Cien Vet. 2013;20:179-88.
2. Gilbert R, Cook A, Dunn D. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicenter case-control study. BMJ. 2000;312:142-7.
3. Yan J, Huang B, Liu G, Wu B, Huang S, Zheng H, et al. Meta-analysis of prevention and treatment of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. Acta Trop. 2013;127(3):236-44.
4. Dunn JD, Butcher B, Denkers E, Boothroyd J. Alterations in host-cell biology due to *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM, Kim K, editors. *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. Perspectives and methods. London: Elsevier; 2007.
5. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.
6. Duarte MIS, Andrade HFJ. Toxoplasmose. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. In: Brasileiro Filho G, editor. Bogliolo Patologia. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
7. Ferguson DJ, Graham DI, Hutchinson WM. Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: A histological, imunocytochemical and ultrastructural study. Int J Exp Pathol. 1991;72:463-74.
8. Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Sci Med. 2010;20(1):131-43.
9. Atmaca HT, Kul O, Karakuş E, Terzi OS, Canpolat S, Antepioğlu T. Astrocytes microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. J. Neurosci. 2014;269:184-91.
10. Araújo EJA, Zaniolo LM, Vicentino SL, Góis MB, Zanoni JN, da Silva AV, et al. *Toxoplasma gondii* causes death and plastic alteration in the jejunal myenteric plexus. World J Gastroenterol. 2015;21(16):4829-39.
11. Sant'Ana DMG, Góis MB, Zanoni JN, da Silva AV, da Silva CJ, Araújo EJ. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. Int J Exp Pathol. 2012;93(4):279-86.



12. Slaven EM, Stone SC, Lopez FA. Doenças infecciosas: Diagnóstico e tratamento no setor de emergência. McGraw Hill; 2007.
13. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Patologia Básica. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
14. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012; 5(1):15.
15. Pathak S, Banerjee A, Paul S, Khuda-Bukhsh AR. Protective potentials of a plant extract (*Lycopodium clavatum*) on mice chronically fed hepato-carcinogens. *Indian J Exp Biol*. 2009;47(7):602-7.
16. Falkowski GJS, Aleixo DL, Moreira NM, Veiga FK, Araújo SM, Tiyo R. Medicamento altamente diluído reduz temporariamente a parasitemia de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. *UNINGÁ Review*. 2012;12:86-95.
17. Bonapaz RS, Hermes-Uliana C, Santos FN, Da Silva AV, Almeida EJA, Sant'Ana DMG. Effects of infection with *Toxoplasma gondii* oocysts on the intestinal wall and the myenteric plexus of chicken (*Gallus gallus*). *Pesq Rev Bras*. 2010;30(9):787-92.
18. Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, Watanabe PS, Góis MB, de Melo GA, Garcia JL, et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Exp Parasitol*. 2016 Jun 1;165:22-9.
19. Sanfelice RA, Silva SS, Bosquia LR, Miranda-Sapla MM, Barbosa BF, Silva RJ, et al. Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Acta Tropica*. 2017;167:208-15.
20. Endo, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*. 1992;33:1569-82.
21. Cortese F, Gesualdo M, Cortese A, Carbonara S, Devito F, Zito A, et al. Rosuvastatin: Beyond the cholesterol-lowering effect. *Pharmacol Res*. 2016;107:1-18.
22. Kuipers HF, van den Elsen PJ. Immunomodulation by statin: Inhibition of cholesterol vs. isoprenoid biosynthesis. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(7):400-7.
23. Basso PJ. Avaliação dos efeitos imunomoduladores de estatinas e glicocorticóides na terapêutica da colite experimental. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2015.

**Palavras-chave:** toxoplasmose; duodeno; rosuvastatina.

## **IMPACTS OF PERINATAL GLYPHOSATE EXPOSURE ASSOCIATED TO HIGH-FAT DIET IN ADULTHOOD ON JEJUNUM OF MICE**

**Stéfani Bueno Panza<sup>1</sup>; Rodrigo Vargas<sup>2</sup>; Sandra Lucinei Balbo<sup>3</sup>; Maria Lúcia Bonfleur<sup>3</sup>; Daniele Cristina Tita Granzotto<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate Student (Master), Bioscience and Pathophysiology Program, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Postgraduate Student in Biological Sciences (Doctorate), Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Laboratory of Biophysics and Human Physiology, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Statistics, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Professor, Department of Morphology, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: stefani.panza@gmail.com

### **1. INTRODUCTION**

Pesticides are products and agents used to preserve the fauna and flora against living beings considered harmful to them (1). Once they are potentially toxic to humans and other organisms (2), the registration of new pesticides needs approval of IBAMA, ANVISA and the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (3). However, it has increased exponentially in recent years (4).

As a way to warn of the risks offered by these compounds, the toxicity is classified into four groups varying from extremely toxic (group I) to less toxic (group IV) (5) and should be highlighted on the product label (1). Classified as class IV toxicity, Glyphosate is a broad-spectrum systemic herbicide (6) banned throughout the European Union (7). On the other hand, this agrototoxic is the most traded in Brazil, with around 174,000 tons sold in 2017 (8).

This herbicide inhibits the enzyme 5-enolpyruvylchiquimate acid-3-phosphate synthase (EPSP synthase), essential for the synthesis of aromatic amino acids produced by the shikimate pathway (9). Decreased synthesis of these amino acids and their resulting proteins causes disruption on plant growth and its eventually death (10). As EPSP synthase is not found in vertebrate cells, some researchers and most regulators have assumed that glyphosate would offer minimal risk to mammals (11). However, studies have reported several side effects associated to this herbicide and its commercial formulation (12, 13).

About 20% of dietary glyphosate is absorbed into the gastrointestinal tract (14). Chlopecka demonstrated, using intestines segments of Wistar rats, that this herbicide is capable of causing permanent reduction on intestinal spontaneous contractility (15). After its absorption, glyphosate can bioaccumulate causing several damages, such as numerous teratogenic effects. Kruger concluded that glyphosate-contaminated soybean-based foods used in the pig industry were associated with various gastrointestinal system-related conditions and birth defects in young pigs (16).

As glyphosate-based herbicides can contaminate water through the rain, runoff and groundwater leaching, people can be exposed to it through drinking water (17). In tests conducted by UK-Food Standard Agency in 2012, residues of this pesticide were found above 0.2 mg/kg in 27 out of 109 bread samples evaluated (18). In other research by Samsel and Seneff, the authors argue that glyphosate is a major contributor to the autism and obesity epidemic in the United States (11).

According to data provided by Worldwide Health Organization (WHO) in 2016, 62.5% of the Brazilian population is overweight, with an average increase of 0.55% per year in this percentage over the last ten years (2006-2016) (19). Fat-rich diets may induce the inflammatory response (20). Several studies indicate that inflammatory cytokines are produced by adipose tissue infiltrating macrophages in response to increased adipocytes (21). Although inflammatory cytokines produced in adipose tissue may circulate to the intestinal epithelial layer, a local inflammatory response changes in the microenvironment. Microbiota in the gut may also play a critical role in promoting intestinal inflammation and thus contributing to gastrointestinal disorders (22).

Among the various organs, those related to gastrointestinal tract are directly influenced by glyphosate (20) and the hyperlipid diet (23). There is a gap in literature about the effects of perinatal exposure to glyphosate in the intestines of rodent offspring. Therefore, the objective of this study was to evaluate changes in the jejunum of offspring submitted to a high-fat diet after maternal exposure to glyphosate during pregnancy.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Experimental design

This study was approved by the Committee on Ethics in Animal Experimentation and Practical Classes (CEEAAP) of the Universidade Estadual do Oeste Paraná (number 3730/2016). For this experiment, 10 males and 20 females adult C57BL/6 strain mice aging 60-90 days were kept in the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism (LAFEM) of UNOESTE, in controlled temperature ( $28 \pm 2$  °C) and light/dark cycle of 12 h, with water and food *ad libitum* for two weeks. After mating, the animals were randomly separated into control group (CG), which received standard food and water *ad libitum* and glyphosate group (GF), which received water with 0.5% glyphosate (1ml GF/200ml). The treatment occurred from day 01 of pregnancy until the 30<sup>th</sup> day after birth. At 150<sup>th</sup> day, male offspring were separated into four groups (n=6). The CG was divided into: CG-SD, which continued to receive the standard diet; and CG-HD, which received high-fat diet to induce obesity. The GF group was separated into: GF-SD (standard diet) and GF-HD (high-fat diet). The standard rodent diet used was purchased from BioBase, which has 3.8 kcal/g (70% carbohydrate, 20% protein and 10% fat). For the high-fat diet, the animals received a laboratory-produced pallet feed consisting of cornstarch (29.95%), casein (14%), sucrose (12%), soybean oil (4%), microcrystalline cellulose-fiber (5%), AIN 93 M mineral mix (3.5%), AIN 93 vitamin mix (1%), L cystine (0.3%), choline bitartrate (0.25%) and lard (30%). The animals were euthanized after the 12th week of obesity induction.

### 2.2. Histological analysis

Two segments of jejunum of each animal were collected and sent to the State University of Maringá. One of them was fixed in a solution containing 3% of paraformaldehyde and 1.5% of acetic acid, specifically for the Giemsa technique. The other part was fixed in a 10% buffered paraformaldehyde and submitted to histological routine.

### 2.3. Intraepithelial lymphocyte (IEL) and goblet cells count

Semi-serial cross sections of 5  $\mu$ m were stained by hematoxylin-eosin (HE) technique for IEL. For goblet cells evaluation, the cross sections were stained by periodic acid Schiff (PAS<sup>+</sup>), alcian blue pH 1.0 (AB1.0<sup>+</sup>) and alcian blue pH 2.5 (AB2.5<sup>+</sup>). The number of intraepithelial lymphocytes and goblet cells were quantified in 2,560 epithelial cells per animal and the proportion of these cells/100 epithelial cells was calculated.

### 2.4. Morphometric analysis of intestinal wall

Sixteen photos from 4 different cross sections stained by HE technique were captured with a Moticam 3.0 MP high resolution camera coupled to the Motic BA210E optical microscope. The thickness of muscular layer, submucosa, the height and width of villi and the depth of the crypts were determined.

### 2.5. Collagen and fibrillar analyses

The collagen types were analyzed in 16 images from 4 cross-sections (5  $\mu$ m) stained by Picrosirius red (type I and III collagen) and Azan (fibrillar collagen) techniques.

### 2.6. Statistical analysis

Data distribution were analyzed by Shapiro-Wilk and D'Agostino Pearson tests and then compared by ANOVA followed by Tukey post-test and represented by mean  $\pm$  standard deviation.  $p < 0.05$  was considered significant. The validation of the constructed models was performed by using Shapiro Wilks and Batlett tests, in addition to the plot analyses.

## 3. RESULTS

After the statistical analysis, it was found that height of villi and depth of crypt were increased in the group fed with high-fat diet ( $258.72 \pm 66.48$ ,  $82.19 \pm 17.52$ , respectively) when compared to the control group ( $237.71 \pm 87.16$  and  $74.52 \pm 17.81$ ). In the groups exposed to glyphosate during the perinatal period, both GF-SD and GF-HD showed a decrease in depth of crypt ( $70.10 \pm 21.20$  and  $65.94 \pm 16.28$ , respectively), whereas only the GF-HD group showed an increase in width of villi ( $70.01 \pm 19.31$ ) when compared to the control group ( $64.65 \pm 17.81$ ), as shown in Table 1.

**Table 1. Morphometry of the jejunum wall in C57BL/6 mice exposed or not to glyphosate and/or fed a high-fat diet groups**

	CG-SD	CG-HD	GF-SD	GF-HD
Total Wall	112.95 $\pm$ 22.29 <sup>a</sup>	130.72 $\pm$ 25.36 <sup>ab</sup>	107.68 $\pm$ 24.44 <sup>a</sup>	106.85 $\pm$ 19.10 <sup>a</sup>

<b>Longitudinal Muscular</b>	16.31±5.02 <sup>a</sup>	17.18±5.35 <sup>a</sup>	15.98±4.48 <sup>a</sup>	16.11±5.00 <sup>a</sup>
<b>Circular Muscular</b>	23.34±6.59 <sup>a</sup>	24.41±5.64 <sup>a</sup>	24.98±7.58 <sup>a,c</sup>	24.87±6.72 <sup>a,c</sup>
<b>Total Muscular</b>	37.24±9.49 <sup>a</sup>	41.02±10.02 <sup>a</sup>	38.33±10.08 <sup>a,c</sup>	39.86±9.08 <sup>a,c</sup>
<b>Submucosa</b>	14.24±4.24 <sup>a</sup>	16.18±4.51 <sup>b</sup>	13.85±4.64 <sup>a</sup>	14.04±4.19 <sup>a</sup>
<b>Height of Villi</b>	237.71±87.16 <sup>a</sup>	258.72±66.48 <sup>a</sup>	222.52±51.57 <sup>a</sup>	217.28±54.68 <sup>a</sup>
<b>Width of Villi</b>	64.65±17.26 <sup>a</sup>	64.23±19.02 <sup>a</sup>	61.25±19.13 <sup>a</sup>	70.01±19.31 <sup>a</sup>
<b>Depth of Crypt</b>	74.52±17.81 <sup>a</sup>	82.19±17.52 <sup>a</sup>	70.10±21.20 <sup>a</sup>	65.94±16.28 <sup>a</sup>
<b>Width of Crypt</b>	26.38±4.65 <sup>a</sup>	27.67±35.79 <sup>a</sup>	28.68±5.7 <sup>a</sup>	28.83±6.67 <sup>a</sup>

Means ± standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control. ANOVA. CG-SD - Control group submitted to standard diet, CG-HD - Control group submitted to hyperlipid diet, GF-SD - Group exposed to glyphosate during the perinatal period, GF-HD - Group exposed to glyphosate during the perinatal period and submitted to the hyperlipid diet.

The intestinal wall morphometry showed that the submucosa and total muscular presented hypertrophy in CG-HD (16.18±4.51 and 41.02±10.02, respectively) when compared to CG-SD (14.24±4.24 and 37.24±9.49). GF-HD also presented circular and total muscular hypertrophied (24.87±6.72 and 39.86±9.08). The total wall was increased in CG-HD (130.72±25.36) and decreased in GF-HD (106.85±19.10) when compared to CG-SD (112.95±22.29) (Table 1).

It was also found a significant decrease in the intraepithelial lymphocyte count of CG-HD (9.06±4.25) and GF-HD groups (7.96±5.13) while there was an increase in GF-SD group (14.35±6.48) when compared to CG-SD mice (11.52±4.78).

CG-HD group animals showed significant increase in the number of goblet cells, evidenced by alcian blue pH 1.0 staining for glycosaminoglycans and acid glycoproteins (10.1±4.42), and by PAS for the quantification of neutral glycoproteins (10.31±3.45) when compared to CG-SD group (7.53±3.95 and 7.85±2.92, respectively). Among the groups exposed during the perinatal period to glyphosate, only GF-SD presented increase of PAS+ goblet cells (9.96±3.72) compared to CG-SD, as described in Table 2.

**Table 2: Changes in the number of goblet cells in the jejunum of C57BL/6 mice exposed or not to glyphosate and/or fed a hyperlipid diet**

	<b>AB 1.0</b>	<b>AB 2.5</b>	<b>PAS</b>
<b>CG-SD</b>	7.53±3.95 <sup>a</sup>	9.68±3.91 <sup>a</sup>	7.85±2.92 <sup>a</sup>
<b>CG-HD</b>	10.10±4.42 <sup>b</sup>	9.47±3.79 <sup>a</sup>	10.31±3.45 <sup>b</sup>
<b>GF-SD</b>	8.78±2.87 <sup>a,c</sup>	10.41±3.83 <sup>a</sup>	9.96±3.72 <sup>a</sup>
<b>GF-HD</b>	8.47±3.02 <sup>a,c</sup>	9.68±3.09 <sup>a</sup>	6.78±3.06 <sup>a,c</sup>

Means ± standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control. ANOVA. CG-SD - Control group submitted to standard diet, CG-HD - Control group submitted to hyperlipid diet, GF-SD - Group exposed to glyphosate during the perinatal period, GF-HD - Group exposed to glyphosate during the perinatal period and submitted to the hyperlipid diet.

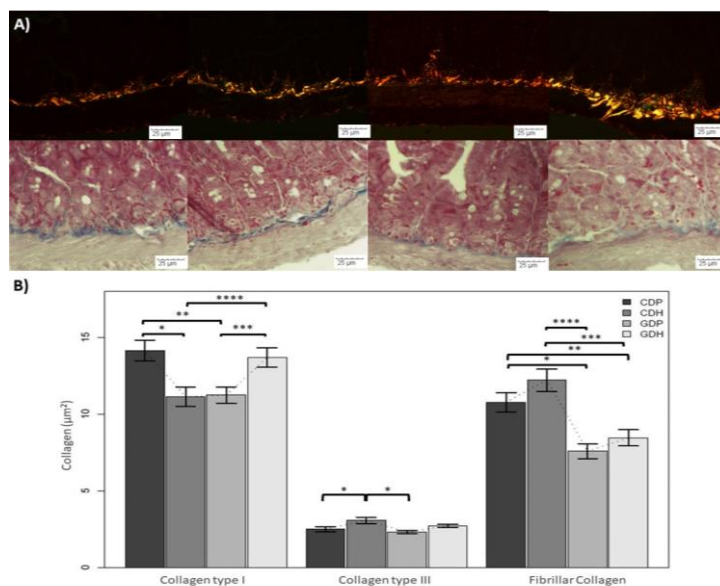
The type I collagen was decreased in CG-HD (11.13±6.12) and GF-SD (11.24±5.28) when compared to CG-SD (14.15±6.59). On the other hand, type III collagen was increased only in CG-HD (3.08±2.01), also compared to CG-SD (2.50±1.70). The fibrillar collagen was significantly decreased in the groups exposed to glyphosate (GF-SD: 7.58±4.67 and GF-HD: 8.45±5.14, respectively), when compared to CG-SD (10.77±6.11) (Table 3 and Figure 1).

**Table 3: Collagen analyses in the jejunum of C57BL/6 mice exposed or not to glyphosate and/or fed a high fat diet**

	<b>Collagen I</b>	<b>Collagen III</b>	<b>Fibrillar Collagen</b>
<b>CG-SD</b>	14.15±6.59 <sup>a</sup>	2.50±1.70 <sup>a</sup>	10.77±6.11 <sup>a</sup>
<b>CG-HD</b>	11.13±6.12 <sup>b</sup>	3.08±2.01 <sup>b</sup>	12.22±7.16 <sup>b</sup>
<b>GF-SD</b>	11.24±5.28 <sup>b</sup>	2.32±1.08 <sup>a</sup>	7.58±4.67 <sup>b</sup>
<b>GF-HD</b>	13.69±6.16 <sup>a</sup>	2.73±1.04 <sup>a,b</sup>	8.45±5.14 <sup>b</sup>



Means  $\pm$  standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control. ANOVA. CG-SD - Control group submitted to standard diet, CG-HD - Control group submitted to hyperlipid diet, GF-SD - Group exposed to glyphosate during the perinatal period, GF-HD - Group exposed to glyphosate during the perinatal period and submitted to the hyperlipid diet.



**Figure 1. Graph and photomicrograph of collagen analyses in the jejunum of C57BL/6 mice from groups exposed or not to glyphosate and/or fed a high fat diet in adulthood.** A- Photomicrographs of jejunum of mice from CG-SD: normal-fed and without perinatal glyphosate exposure (first column); CG-HD: Hyperlipidic diets without perinatal glyphosate exposure (second column); GF-SD: exposed to glyphosate in the perinatal and normo-fed period (third column); GF-HD: exposed to glyphosate in the perinatal period and fed a hyperlipid diet (fourth column). Type I and III collagen (first row, 400X magnification, scale bar = 25µm) and total collagen (second row, 400X magnification, scale bar = 25µm) evidenced by Picrosirius and Azan techniques, respectively. B- Graph representing the analysis of type I, type III and fibrillar collagen. Asterisks above the bar represent significant difference ( $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSION

The present study evaluated the effects of high-fat diet in adult life after perinatal exposition to a glyphosate-based herbicide. The Brazilian Ministry of Health Ordinance 2914 allows up to 0.5 mg/L glyphosate in water whereas the American Water Control Organization (EPA) determines this value can reach up to 0.7 mg/L (24, 25). The concentration of the formulation used in our experiment was 0.5% and, therefore, within the limit stipulated by the ministry ordinance. However, it is clear that the dosage is already able to cause damage, although low and indirectly administered.

There are few studies in the literature relating damage to the gastrointestinal tract with glyphosate in contrast to changes attributed to the great ingestion of fat, which is a widely studied topic. Alterations on the motoric activity of intestine was already described in both cases (15, 26). Indeed, high-fat diet and inflammation response also cooperate with intestinal fibrosis (27). While type I collagen are thicker and more compact fibers, type III collagen is thin fibers (28). Our results demonstrated an increase in total muscular, as well as a decrease in type I collagen and an increase in type III collagen in the group fed with hyperlipidic diet and a significant decrease in type I and fibrillar collagen in animals exposed to the herbicide.

Likewise, Sissener et al. (29) found shortening and fusion of simple and complex folds of the intestinal mucosa in animals exposed to glyphosate. During morphometric analysis, we found a decrease in the depth of the crypts and fusion of several villi, although we did not find significant alterations in the height of the villi. In the group fed with hyperlipidic diet the height of the villi and depth of the crypts were increased, corroborating to the results previously found by Monteiro-Supulveda et al. (30). These authors explained the alterations as a reduction in apoptosis in obesity.

After histological analyses we could observe the presence of leukocytes infiltration along with the increase of intraepithelial lymphocytes in animals exposed to glyphosate without the interference of the hyperlipid diet as also observed by Sissener et al. (29). We also found a decrease in intraepithelial lymphocytes proportion in the group fed a high-fat diet, corroborating to Jamerson et al. (31) findings explained by the decrease in CCR9 and CD103, lower production of growth factor and cytokines, resulting in deregulation of the immune barrier.

On the other hand, Monteiro-Supulveda et al. (30) found an increase in T and B lymphocyte density in the tissue after flow cytometric analysis, which would indicate a larger amount of these cells. As the authors did not evaluate histologically, this increase may not be directly linked to LIE but to lymphocytes present in other parts of the organ. This may indicate that the lymphocytes, instead of going into the intestinal lumen, remain in the lamina propria, where we have taller villi and deeper crypts.

When analyzed the effects of the herbicide on goblet cells responsible for mucin secretion, we evidenced an increase in the number of these cells in exposed animals compared to the control group. Goblet cells acts as a barrier to limit interactions with microbes present in the lumen, assuming that these cells multiplied in response to glyphosate exposure.

Our results also showed increased number of goblet cells in animals fed a high-fat diet, maybe explained by induction of cell proliferation and differentiation of stem cells in the hyperlipid diet group (32). Different results from these were found by June-Chul Lee et al. (33), who found goblet cell depletion in mice fed the hyperlipid diet and Gulhane et al. (34) who found no significant differences in animals subjected to the same diet.

Regarding the association between perinatal exposure to glyphosate based-product and the intake of high-fat diet in adulthood, we observed some alterations similar to those found in the group only exposed to glyphosate such as the decrease in the depth of the crypts and fibrillar collagen, the increase in the width of the crypts and decrease total wall which it is not significant in GF-SD group but became more evident when associated to the diet. The hyperlipidic diet was able to reduce the proportion of intraepithelial lymphocytes and increase total muscular.

All of these changes can result in impairment to organ function such as peristalsis, immune response to pathogens. These alterations must be studied more carefully to better understand the effects of this herbicide and diet in the human body, as thousands of people are exposed daily.

## 5. CONCLUSION

The perinatal exposure to low doses of glyphosate caused alterations on the morphometry of the wall and reduced the collagen fibers while the hyperlipidic diet hypertrophied the muscular layer and the submucosa. The dietary lipid intake induced alterations at cellular level such as the decrease of IELs and increase of goblet cells, evidenced also by the higher villi and deeper crypts. The association between perinatal exposure and in adulthood showed shallower crypts and lower villi, but also a hypertrophied muscular layer. All these changes may compromise some intestinal functions. Further studies are needed to understand the real impact of these changes in bowel function.

## FUNDINGS

CAPES and CNPq.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the collaborators of the Neurogastroenterology, the crew from Universidade Estadual do Oeste do Paraná and everyone involved in this research.

## REFERENCES

1. BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho 1989. Lei dos Agrotóxicos. Diário Oficial da república Federativa do Brasil. Brasília, DF 11 jul 1989;11459.
2. World Health Organization [Internet]. Global Health Observatory (GHO) data: Pesticides. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: <https://www.who.int/topics/pesticides/en/>.
3. ANVISA [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regularização de Produtos - Agrotóxicos. [Accessed 2 ago 2019]. Available in: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotóxicos/produtos/registro>.
4. BRASIL. Projeto de Decreto Legislativo nº 43, de 2019. Diário Oficial da república Federativa do Brasil. Brasília, DF 26 fev 2019.
5. Agência Embrapa de Informação Tecnológica [Internet]. Uso de agrotóxicos. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>.
6. Vasiluk L, Pinto LJ, Moore MM. Oral bioavailability of glyphosate: Studies using two intestinal cell lines. *Env Tox Chem*. 2005 Jan;24(1):153-60.
7. Universidade Federal do Paraná [Internet]. Observatório do agrotóxico. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: <http://www.saude.ufpr.br/portal/observatorio/noticias/apos-votacao-uso-de-glifosato-fica-proibido-uniao-europeia-a-partir-de-30-de-junho/>.
8. IBAMA [Internet]. Relatório de comercialização de agrotóxicos. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>.
9. de María N, Becerril JM, Garca-Plazaola JI, Hernandez AH, de Felipe MR, Fernández-Pascual M. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *J Agric Food Chem*. 1996;54:2621–28.
10. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA, Castellano VJ, Martínez M, Martín MT, et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett*. 2009 out;190(1):91-5.

11. Samsel A, Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdiscip Toxicol*. 2013 dez;6(4):159–84.
12. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendomois J, Seralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol*. 2015;84:133–53
13. El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28:379–85.
14. Bus JS. Analysis of moms across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S. mother's breast milk: Implausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxicokinetic, human biomonitoring, and physico-chemical data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;73:758–64.
15. Chlopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses – In vitro study. *Pest Bio Phys*. 2014 Jul;113:25-30.
16. Kruger M, Schrodli W, Pedersen I, Shehata AA. Detection of glyphosate in malformed piglets. *J Environ Anal Toxicol*. 2014;4:5.
17. Majewski MS, Coupe RH, Foreman WT, Capel PD. Pesticides in Mississippi air and rain: A comparison between 1995 and 2007. *Environ Toxicol Chem*. 2014;33(6):1283–93.
18. Food Standard Agency [Internet]. Pesticides in food. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: <http://www.food.gov.uk/business-industry/farmingfood/pesticides>.
19. World Health Organization [Internet]. Global Health Observatory (GHO) data: Overweight and obesity. [Accessed 25 jul 2019]. Available in: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/).
20. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Dia*. 2007 Nov;50(11):2374-83.
21. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280:E745–51.
22. Guo X, Li J, Tang R, Zhang G, Zeng H, Wood RJ, et al. High fat diet alters gut microbiota and the expression of paneth cell-antimicrobial peptides preceding changes of circulating inflammatory cytokines. *Mediat Inflamm*. 2017 Fev;2017.
23. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model of type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharm Res*. 2005 Out;52(4):313-20.
24. EPA [Internet]. 2018 Edition of the drinking water standards and health advisories. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-03/documents/dwtable2018.pdf>.
25. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. [Accessed 24 jul 2019]. Available in: [http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp\\_doctos/kit\\_arsesp\\_portaria2914.pdf](http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/kit_arsesp_portaria2914.pdf).
26. Progzatzky F, Sangha NJ, Yoshida N, McBrien M, Cheung J, Shia A, et al. Dietary cholesterol directly induces acute inflammasome-dependent intestinal inflammation. *Nat Commun*. 2014 Dez 23;5:5864.
27. Mascaraque C, Elangovan S, Petti L, Piontini A, Correale C, Arena V, et al. OP018 high-fat diet and inflammation drive intestinal fibrosis enhancing epithelial–mesenchymal transition through the activation of S1P3 signalling. *J Crohns Colitis*. 2018 Jan 16;12(1):S013.
28. Dayan D, Bodner L, Hammel I, Wolman M. Histochemical characterization of collagen fibers in fibrous overgrowth (irritation fibroma) of the oral mucosa: Effect of age and duration of lesion. *Arch Gerontol Geriatr*. 1994 Jan;18:53-7.
29. Sissener NH, Bakkebc M, Gu J, Penn MH, Eie E, Krogdahl Å, et al. An assessment of organ and intestinal histomorphology and cellular stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed genetically modified Roundup Ready® soy. *Aquacult*. 2009 Dez 16;298(1-2):101-10.
30. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T cell inflammation in human obesity correlates with decreased enterocyte insulin signaling. 2015 Jul 7;22(1):113-24.
31. Jameson JM, Park CS, Limon N. Obesity and intraepithelial lymphocyte dysfunction. *J Immunol*. 2018 May 1;200(1)119.3.
32. Zhou W, Davis EA, Dailey MJ. Obesity, independent of diet, drives lasting effects on intestinal epithelial stem cell proliferation in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018 Jun;243(10):826-35.
33. Lee JC, Lee HY, Kim TK, Kim MS, Park YM, Kim J, et al. Obesogenic diet-induced gut barrier dysfunction and pathobiont expansion aggravate experimental colitis. *PLoS One*. 2017 Nov 06;12(11):e0187515.
34. Gulhane M, Murray L, Lourie R, Tong H, Sheng YH, Wang R, et al. High fat diets induce colonic epithelial cell stress and inflammation that is reversed by IL-22. *Sci Rep*. 2016 Jun 28;6:28990.

**Keywords:** glyphosate; high-fat diet; small intestine.

## **SLEEP RESTRICTION PROMOTES CHANGES IN COLON OF WISTAR RATS**

**Adriano Araujo Ferreira<sup>1</sup>; Aline Rosa Trevizan<sup>1</sup>; Maria Jose Pastre<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Gessilda Alcântara Nogueira de Melo<sup>3</sup>; Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo<sup>4</sup>; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>5</sup>; Marcelo Biondaro Gois<sup>6</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>2</sup>Graduate student (PhD degree), Comparative Biology Program, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>4</sup>Graduate student (PhD degree), Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR

<sup>5</sup>Professor, Histology Department, State University of Londrina, Londrina, PR

<sup>6</sup>Professor, Health Department, Federal University of Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, BA

<sup>7</sup>Professor, Department of Morphological Sciences, State University of Maringa, Maringa, PR

e-mail: prof.adriano.af@gmail.com

### **1. INTRODUCTION**

The behavioral changes of living beings over a twenty-four-hour period are rhythmic and prominent features of life on Earth (1). The existence of biological rhythms in plants, animals and man has been reported since the beginning of human history. References to cyclical biologic events are found, for example, in the book of Genesis and Ecclesiastes, in the accounts of Hippocrates, Aristotle, and others (2).

The circadian period is the cycle duration of a biological rhythm over 24 hours. It occurs through an endogenous synchronization process (3), even when the organism is isolated from temporal environmental cues. This synchronization is performed by the suprachiasmatic nucleus (SCN), situated in the anterior part of the hypothalamus, considered the primary center of circadian rhythm regulation (4).

The circadian timing system (CTS) includes the SCN, which receives retinal afferences through the retinohypothalamic tract, mediating its synchronization to the environmental light/dark cycle. There is a temporal relationship between the sleep-wake cycle and other biological rhythms in the body itself, influencing the release of melatonin, growth hormone, cortisol and hormones that influence this cycle (5).

All these regulatory effects of melatonin on the body's biological rhythms may be hindered when there is a disruption such as sleep restriction. When these rhythms are disrupted, either by genetic or environmental factors, many systemic disorders have been observed, such as insomnia, cardiovascular and gastrointestinal disorders, obesity, depression, anxiety, stress, diabetes, metabolic and endocrine disruption, sterility, and even some forms of cancer (2). Recently, sleep disorders and melatonin levels have also been reported in the development increased systemic and local inflammatory response of neurodegenerative diseases such as Parkinson's (6) and Alzheimer's disease (7).

In the long term, sleep restriction induces an increase systemic and local inflammatory response, which may cause several tissue changes. Collagen is a protein found in large amounts in the tissues of the layers of the intestinal segments, and it may undergo changes due to the inflammatory processes, thus affecting local regenerative capacity (8). Mast cells, which participate in local inflammatory motility and response (9), are also present in the mucous membrane.

The Enteric Nervous System (ENS) may also undergo changes in its structural components. Myenteric plexus neurons control especially the intestinal motility, using inhibitory neurotransmitters, such as nitric oxide, and excitatory neurotransmitters, such as acetylcholine (10). On the other hand, the neurons of the submucosal plexus have a primary vasomotor effect, which leads to vasodilation when stimulated, thus increasing local vascularization through the vasoactive intestinal peptide (VIP), a potent vasodilator and controller of mucin release and goblet cell proliferation (11); and also substance P, which, after being produced by excitatory motor neurons, acts as a neuropeptide recruiting immune cells.

Since changes in the circadian cycle may have deleterious effects on cellular, structural and nerve components of the colon, our aim was to investigate the colon of sleep-restricted Wistar rats to see if this condition can cause changes in this intestinal segment.



## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Experimental design**

We used sixteen male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with 30 days of age and body mass of approximately 125g. The rats were supplied by the Central Biottery of Universidade Estadual de Londrina (CCB - UEL) and acclimatized in the new environment (Laboratory of the Toxicology Laboratory and Metabolic Reproduction Disorders) for 10 days before the experimental period. The experimental protocol was approved by the Committee on Ethical Conduct on Animal Use at the Universidade Estadual de Londrina - UEL (# 046/2014). The rats were randomly assigned to 2 experimental groups (08/group) and submitted to the experimental period for 21 days (postnatal day - DPN 40 to DPN 61).

The Sleep Restriction (SR) group was submitted protocol to sleep restriction by the modified multiple platform method, with 16 animals in a tank (140 x 60 x 30 cm) containing twenty 6.5-cm-diameter-circular platforms with the water level 3 cm below its surface. More platforms than animals allow them to move from one to another. The muscular atony present in paradoxical sleep (REM) causes the animal to wake up by touching its muzzle or even the whole body in water. The rats were daily housed in the water tank for 18h (from 4 PM to 10 AM the next day). At 10 AM, the animals were returned to their home cages (43 x 30 x 15 cm), where they remained until 4 pm, thus allowing 6 hours of sleep (10 am to 4 pm) (12). The Control group animals were kept in home cages throughout the experimental period. Both groups had free access to food and filtered water.

### **2.2. Global and differential blood leukocyte count**

We collected the blood from the venous sinus of the retroorbital plexus after anesthetizing the animal. The global leukocyte count was performed in Neubauer chambers from 1:20 diluted blood samples in Turk fluid. For dilution, micropipettes were used. The material obtained was homogenized on a magnetic stirrer for 45 seconds.

Differential counting of leukocyte series cells was performed on fixed and stained blood smears by the May-Grunald-Giemsa panchromic method. Cells were counted under light microscopy using oil immersion objective.

### **2.3. Euthanasia and sample collection**

The rats were euthanized by halothane vapor anesthetic deepening. After a vertical laparotomy, we removed the colon and separated it into a 1-cm segment for histological processing and a 3-cm segment to obtain the total preparation.

### **2.4. Stereomicroscopic evaluation**

After removal of colon, we opened the colon by longitudinal incision (at the mesocolic edge) and fixed the ends on a Styrofoam plate. We then carefully washed it with 0.9% saline to remove the feces, fibrin crust and other residual remnants and examined it under stereomicroscope.

We scored the characteristics observed on the intestinal surface from 0 to 5, according to the increasing level of lesion and animal condition, based on the adapted score (13).

### **2.5. Histological processing**

One-cm colon rings were opened at the mesenteric border, fixed in styrofoam with the aid of thorns and placed in the Bouin fixative for 6 hours. The colons were embedded in paraffin to obtain 4µm and 10µm semi-serial cross sections. These sections underwent deparaffinization and were stained. The 4µm sections were stained by the Alcian-Blue 1.0 (goblet cell disclosure), Picro Sirius (collagen fiber type I and type III) and Toluidine blue (total mast cell count) techniques.

### **2.4. Immunohistochemical techniques**

Semi-serial 4µm cross sections of the colon were deparaffinized, rehydrated and antigenically recovered. These sections were exposed to the primary anti-5HT antibody overnight. Then, we added a peroxidase-conjugated polymer for 30 minutes and revealed by the brown coloration of the diamino benzidine chromogen (DAB) for 5 minutes. Finally, hematoxylin counterstaining was performed and the slide was mounted with permount and coverslip.

The 3-cm colon segment was washed and fixed in 4% Paraformaldehyde for 3 hours. The segment was dissected, under a stereomicroscope, into 1-cm fractions to obtain total myenteric plexus preparations. Antigen recovery and blockade was performed, followed by incubation for 48 hours with primary antibodies for the following double markings: HuC/HuD and S100 (pan-neuronal and pan-glial staining). Total preparations were incubated in secondary antibodies conjugated with 2-hour fluorescence. The slides were mounted with antifade prolong and coverslip.

### **2.5. Quantitative and morphometric analyzes**

The total mast cell count was done in 100 fields per animal under a light microscope (40x objective) using the Toluidine Blue technique. Mast cells and 5 HT-IR enteroendocrine cells were counted in 50 fields per animal under a light microscope (40x objective).

As for the Azan technique, we took 16 images (20x objective) per animal to measure the total collagen area. For Picro Sirius analysis, we took 16 images per animal (20x objective) with polarized light to measure the area of type I and type III collagen.

The counting in the HuC/HuD and S100 immunohistochemical techniques, performed in the submucosal myionic plexus, we took 36 images per animal (20x objective) under light microscope with immunofluorescence filters. We performed the morphometry of 100 cell bodies per animal of immunoreactive neurons.

The Image Pro Plus software was used in all techniques in which the images were taken.

## 2.6. Statistical analysis

Statistical analysis used the Bioestat 5.3<sup>®</sup> program. Data distribution was assessed using the D'Agostino-Pearson test. The data showed normal distribution and, therefore, were shown as mean  $\pm$  standard deviation. The one-way ANOVA was also used. Tukey test was employed to compare the groups. The significance level is 5%.

## 3. RESULTS

No significant differences were found in global leukocyte count and mononuclear cell differential regarding the hematological profile assessment; the number of polymorphonuclear cells was significantly lower in the group without sleep restriction when compared to the SR group (Table 1).

**Table 1. Number of leukocytes in the blood of rats subjected to sleep restriction (RS) and without sleep restriction (TC)**

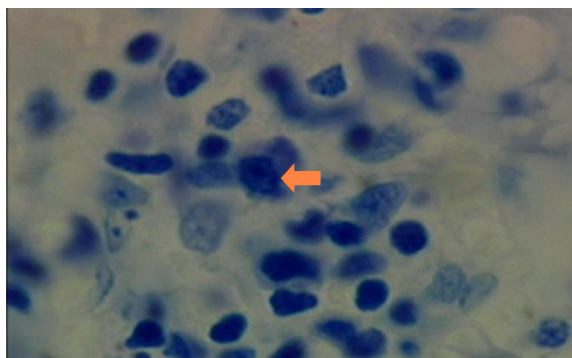
GROUPS	LEUKOCYTES/mm <sup>3</sup>		
	TOTAL	MONONUCLEAR	POLYMORPHONUCLEAR
CG (N=07)	8748 $\pm$ 947.7	7394 $\pm$ 804.7	1354 $\pm$ 204.9*
SR (N=08)	8430 $\pm$ 2224	5871 $\pm$ 1607	2559 $\pm$ 645.9

Values are represented as mean padrão  $\pm$  standard deviation. N = number of animals per group. \*p <0.05 to the control group (without sleep restriction).

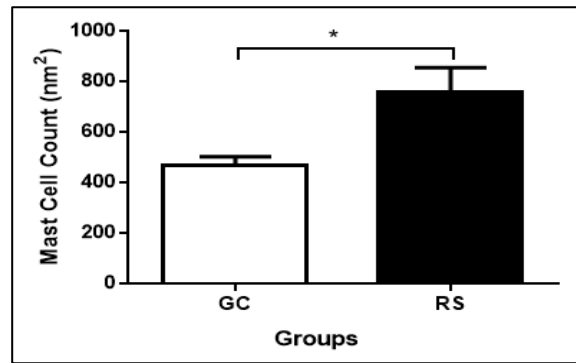
The macroscopic analysis of the colon in both groups showed the absence of inflamed areas, being zero the score for macroscopic lesions. There was no significant difference in the collagen area indicating absence of type I and III collagen neoformation.

No significant changes were observed in the number of goblet cells (AB pH 1.0+) in the colon of rats belonging to the SR group (7.83  $\pm$  1.5 cells) when compared to the CG ( 5.73  $\pm$  2.86 cells) for the Alcian Blue pH 1.0 technique.

Total mast cell count (Toluidine Blue staining (Figure 1)) revealed a significant increase in the number of mast cells in the SR group (758.40  $\pm$  178.82 mast cells/mm<sup>2</sup>) compared to the CG (468.83  $\pm$  78.73 mast cells mm<sup>2</sup>) (Figure 2).

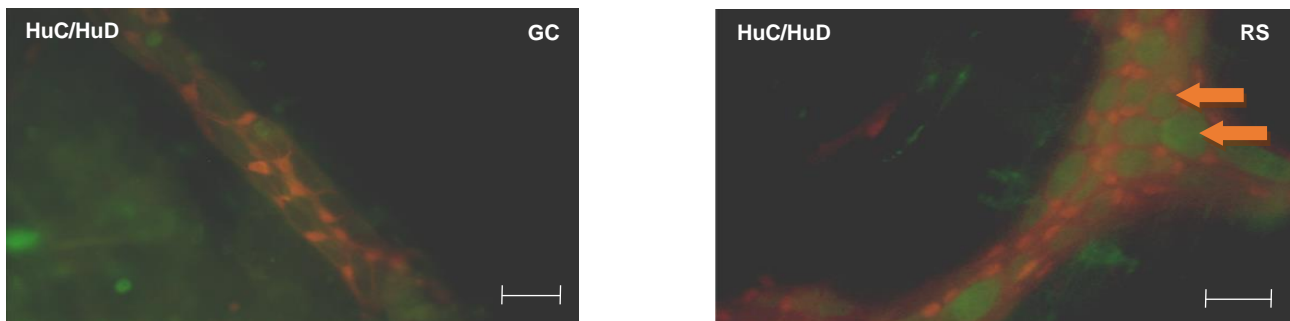


**Figure 1. Photomicrograph of the toluidine blue stained colon showing cells present in the lamina propria of the mucosa of rats subjected to sleep restriction (SR). Toluidine Blue. 1000x magnification. Arrow indicating a mast cell.**

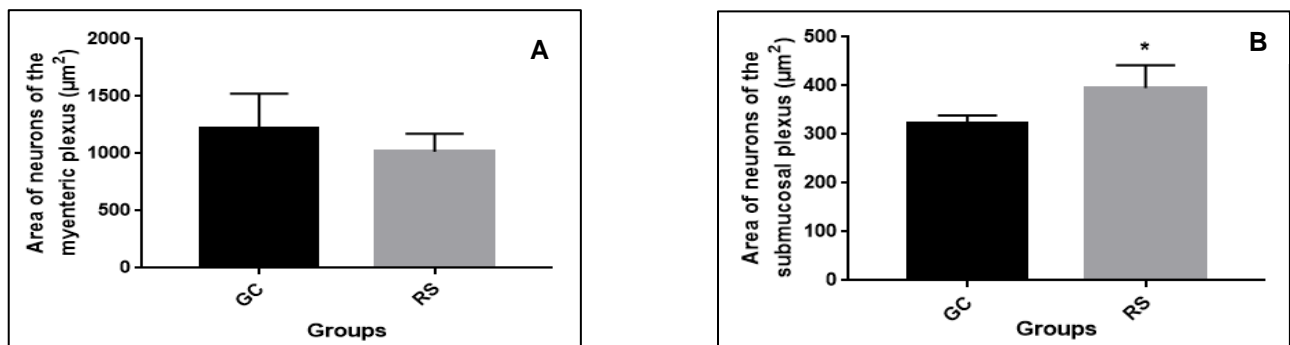


**Figure 2. Total mast cell count.** Sum of mast cells present in 100 microscopic fields (40x objective) in the lamina propria of the colonic mucosa of rats subjected to sleep restriction (SR) and its control (CG). The statistical difference with the CG is represented by the \* ( $p < 0.05$ ).

As for neuronal morphometric parameters, we observed hypertrophy of submucosal HuC/HuD neurons in SR rats compared to CG ( $p < 0.05$ ) (Figures 3 and 4-B). This result was not seen in the myenteric plexus neurons of both groups (Figure 4-A).



**Figure 3. Photomicrographs of submucosal ganglia indicating HuC/HuD-IR neurons (green, arrow) and S100 glia cells (red) - IR in submucosal plexus of rat's colon.** There is an increase in the neuron area in the restricted sleep group compared to the control group. 20x objective. Bar 100 $\mu$ m. Arrow indicating bodies of hypertrophied neurons.



**Figure 4. Cell body area (µm<sup>2</sup>) of myenteric (Figure 4-A) and submucosal (Figure 4-B) neurons HuC/HuD-IR of the colon of rats of the CG and the SR group.** The \* represents significant difference with the CG ( $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSION

Chronic sleep disorders lead to the onset of inflammatory processes, which may cause several chronic diseases. Sleep restriction promotes an increase in the number of cells and systemic inflammatory mediators (14), which may explain the difference evidenced in the hematological evaluation of the CG animals compared to SR, with an increased number of polymorphonuclear cells.

Despite the change in hematological profile, this systemic factor did not influence the occurrence of macroscopic lesions in the intestinal mucosa, a result corroborated by the analysis of total collagen and collagen type I and type II.

There were no changes regarding the proportion of goblet cells, which producing sulphomucine-like acid mucins (AB 1.0+), thus indicating that the chemical and physical composition of the mucus was not influenced by these cells. Mucins provide a hydrophilic mesh that helps local protection by aggregating

protective agents such as lysozyme and immunoglobulins (15). This response may be explained in part because inflammatory mediators released due to sleep restriction do not alter the function of these cells (14).

Mastocytosis seen in the total mast cell count may be due to a tissue cell change in an attempt to adapt to sleep restriction. When activated by neuropeptides, mast cells may induce a proinflammatory state along the intestinal tunics, causing changes in the local inflammatory response and even the intestinal motility (16). The few changes seen in our study may indicate an attempt by the SR group in regulating the stress induced in this experimental model.

The hypertrophy evidenced in submucosal plexus neurons may be an attempt at functional adaptation, increasing neuronal metabolic activity to ensure the maintenance of their functions. During stress, neurons of the enteric nervous system may undergo structural changes and reorganize themselves to maintain intestinal function (17).

Several multiorgan injuries have been reported in the presence of sleep disorders, especially those related to the endocrine, cardiovascular, renal and hepatic system (18).

In general, inflammatory bowel diseases are associated with serum leukocyte increase, evidencing the systemic character of sleep disorders in relation to the systems. Despite the presence of a mastocytosis, the integrity of the intestinal wall still remained, which is evidenced by the collagen fibers and mucin-producing goblet cells assessment. This leads to infer an adaptive and resistive capacity of the intestinal wall against stress suffered by lack of sleep, thus maintaining the intestinal barrier integrity. This adaptation to the intestinal barrier maintenance was also seen with the submucosal plexus neurons that increased their cell volume due to the greater work demand.

The mechanism by which sleep restriction may cause changes in intestinal structure and function has not been fully understood yet. However, these results may be associated with an increase in C-reactive protein, IL-6 and TNF- $\alpha$  often found in the presence of sleep disorders and chronic sleep disorders in both animals and humans. These evaluations together with the biochemical evaluation of oxidative stress and 5-HT cell immunohistochemistry may help in understanding the possible pathophysiological mechanisms present between sleep restriction and inflammatory bowel disorders.

## 5. CONCLUSION

Our results suggest that sleep restriction may lead to inflammatory changes at the blood and intestinal levels. It is also worth, to study inflammatory markers and the role played by 5-HT cells in this process, and their influence on the adaptive process of enteric nervous system cells. Therefore, by knowing that, we will be able to elucidate the involvement of sleep restriction in inflammatory bowel diseases.

## FINANCERS

CAPES and CNPq.

## ACKNOWLEDGEMENT

We thank the collaborators of the Laboratory of Neurogastroenterology of the State University of Maringá.

## REFERENCES

1. Peres MF, Zukerman ECTF, Moreira FR, Cipolla NJ. Melatonin, 3 mg, is effective for migraine prevention. *Neurology*. 2004; 757(4):24-63.
2. Barbosa-Lima LE, Guerreiro-Vargas NN. O Relógio biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. *Revista da Biologia*. 2014; 12(2):1-7.
3. Martynhak BJ, Back FA, Louzada F. O valor biológico do período circadiano. *Revista da Biologia* 2012; 9(3):58-61.
4. Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res*. 1996; 73(1-2):125-30.
5. Ribeiro CRF, Silva YMGP, Oliveira SMC. O impacto da qualidade do sono na formação médica. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2014; 12(1):8-14.
6. Palma JA, Urrestarazu E, Iriarte J. Sleep loss as risk factor for neurologic disorders: A review. *Sleep Med*. 2013; (3)14:229-36.
7. Olsson M, Arlig J, Hedner J, Blennow K. Sleep deprivation and CSF biomarkers for Alzheimer disease. *Sleep*. 2018; 41(5):1-8.
8. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2013; 18(7):1028-40.
9. Ferreira GLS. Mastócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 e a susceptibilidade a infecção por *Toxoplasma gondii* (cepas RH e ME-49) [tese]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2005.
10. Furness JB. The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone; 2006.



11. Toumi F, Neulist M, Denis MG, Oreshkova T, Laboisse CL, Galmiche JP, et al. Vasoactive intestinal peptide induces IL-8 production in human colonic epithelial cells via MAP kinase-dependent and PKA-independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 317(1):187-91.
12. Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Comparison of the sleep pattern throughout a protocol of chronic sleep restriction induced by two methods of paradoxical sleep deprivation. *Brain Res Bull*. 2006; 70(2):13–20.
13. Wallace JL, Le T, Carter L, Appleyard CB, Beck PL. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 33(4):237-9.
14. Irwin MR, Olmstead R, Carroll JE. Sleep disturbance, sleep duration, and inflammation: a systematic review and meta-analysis of cohort studies and experimental sleep deprivation. *Biol Psychiatry*. 2016; 80(1):40-52.
15. Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Manole; 2005.
16. Ramsay DB, Stephen S, Borum M, Voltaggio L, Doman DB. Mast Cells in gastrointestinal disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2010; 6(12):772-7.
17. Spiller R, Grundy D. *Pathophysiology of the Enteric Nervous System: A Basis for Understanding Functional Diseases*. Oxford: Blackwell Publishing; 2004.
18. Periasamy S, Hsua D, Fu Y, Liu M. Sleep deprivation-induced multi-organ injury: role of oxidative stress and inflammation. *EXCLI J*. 14:672-83.

**Keywords:** sleep restriction; enteric nervous system; gut.



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Modelos Farmacocinéticos, Farmacodinâmicos e analíticos

## **AValiação DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE COMPRIMIDOS DE AMOXICILINA EM VOLUNTÁRIOS OBESOS**

**Ana Luiza PelissariPessanha de Paula Soares<sup>1</sup>; MaiaraCamotti Montanha<sup>1</sup>; Conrado de Souza Alcantara<sup>2</sup>; Cristina Megumi Kuroda<sup>2</sup>; Sandra Bin Silva<sup>2</sup>; Sergio Seiji Yamada<sup>2</sup>; Caroline Ferraz Simões<sup>3</sup>; João Carlos Locateli<sup>3</sup>; Antônio Eduardo Nicacio<sup>4</sup>; Elza Kimura<sup>2,5</sup>.**

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado/Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisa Clínica e Bioequivalência do Hospital Universitário Regional de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado/ Doutorado), Programa de Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>4</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

e-mail: analuizappps@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

A obesidade constitui cada vez mais um desafio para a saúde pública mundial e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso e cerca de 600 milhões eram obesos (1,2). A projeção para 2025 é que aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estarão em sobrepeso e mais de 700 milhões de obesos (3).

Em uma análise realizada com 1698 estudos populacionais publicados entre 1975 e 2014, envolvendo 186 países constatou-se que o peso médio da população aumentou consideravelmente na maioria dos países, incluindo o Brasil, que passou da décima posição no ranking de países com maior número de homens obesos para terceira, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos (4).

Para a classificação da obesidade a OMS utiliza como ferramenta o índice de massa corporal (IMC), estimado pela relação entre peso e estatura, sendo considerado sobrepeso ou pré-obeso indivíduos com IMC entre 25 a 29,9 kg/m<sup>2</sup>, obesidade grau I com IMC de 30 a 34,9 kg/m<sup>2</sup>, obesidade grau II com IMC de 35 a 39,9 kg/m<sup>2</sup> e obesidade grave ou grau III com IMC acima de 40 kg/m<sup>2</sup>(2).

A obesidade é considerada, simultaneamente, uma doença e um fator de risco para outras doenças crônicas não transmissíveis, sendo elas: doenças cardiovasculares, diabetes, dislipidemias, alguns tipos de cânceres, osteoartrite e distúrbios da saúde mental (5). Além disso, uma maior atenção está sendo dada ao aumento do risco de infecção associada a obesidade, já que evidências demonstraram que o excesso de peso afeta a disposição de alguns medicamentos (6,7).

A prescrição de medicamentos em pacientes obesos ainda é um desafio e requer avaliação adequada tanto das propriedades físico-químicas dos medicamentos quanto das alterações fisiológicas nesta população que podem afetar a farmacocinética, descrita pela absorção, distribuição, metabolização e excreção do fármaco (8-10).

Embora estudos da literatura elucidem algumas alterações fisiológicas e patológicas possíveis de impactar nos parâmetros farmacocinéticos (PK) de alguns medicamentos, como o aumento da permeabilidade do intestino, esvaziamento gástrico acelerado, aumento do débito cardíaco, proporção de massa gorda e massa magra, poucas são as recomendações de ajuste de dose para a população obesa (8-11). Além disso, não há a exigência da inclusão de participantes obesos no desenvolvimento de medicamentos ou a análise do impacto da obesidade neste processo pelas agências regulatórias (9). Na maioria dos casos, as doses são baseadas no peso total do paciente, entretanto, esta relação dose/peso pode levar a níveis tóxicos para os medicamentos com faixa terapêutica estreita.

No caso de antimicrobianos, poucos medicamentos foram investigados quanto à farmacocinética nesta população e informações inconclusivas sobre a prescrição destes fármacos para obesos estão disponíveis na literatura (10,12).

Os antibióticos beta-lactâmicos são amplamente utilizados para tratamento de diferentes focos

infeciosos por apresentarem efetividade contra bactérias gram-positivas e negativas (13). Dentre esta classe, a amoxicilina (AMX) é um antibiótico de uso ambulatorial, comumente indicado para tratamento de infecções de vias aéreas superiores e tratamento contra bactéria *Helicobacter pylori*, responsável por provocar úlcera gástrica (14).

A AMX é descrita como uma substância hidrossolúvel e de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), é considerado um fármaco altamente solúvel e permeável nas doses até 875mg (14). Considerando que até o momento nenhum estudo foi desenvolvido para confirmar se há necessidade de ajuste de dose da AMX em indivíduos obesos, e por se tratar de um medicamento amplamente prescrito e disponível em diferentes formas farmacêuticas, este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil farmacocinético da AMX em voluntários obesos e comparar com os dados disponíveis na literatura em voluntários eutróficos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Desenho do estudo

Trata-se de um ensaio clínico unicêntrico, prospectivo, aberto, de dose única, com comprimido de AMX 875mg administrado em voluntários com obesidade grau I e/ou II, a fim de comparar os parâmetros farmacocinéticos da AMX nesta população com indivíduos eutróficos. O estudo está em processo de registro na Plataforma de Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos – REBEC (REQ:8110) e possui aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (02902518.2.0000.0104).

### 2.2. População

Foram incluídos no estudo voluntários de ambos os sexos com idade entre 18 a 50 anos, que apresentavam IMC entre 30 a 40 kg/m<sup>2</sup>, sem histórico de: intolerância ou hipersensibilidade a AMX e a outros antibióticos da mesma classe, insuficiência renal ou hepática, trombocitopenia, anemia, cardiopatias, diabetes, hipertensão e doenças endócrinas. Excluiu-se do estudo grávidas, lactantes e indivíduos em uso contínuo de procinéticos. Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento para participação da pesquisa no momento da triagem.

### 2.3. Protocolo Clínico

O protocolo do estudo bem como o processamento e análise das amostras foram realizados com base no descrito por Montanha *et al.*, (2019) (15). Os participantes foram avaliados em três momentos: triagem, intervenção e visita final. Na triagem, dados antropométricos e clínicos foram coletados (sexo, idade, etnia, peso, altura, IMC, frequência cardíaca e pressão arterial), além da realização de exames laboratoriais (hemograma, lipidograma, dosagem de bilirrubina total e frações, albumina, creatinina, glicose, uréia, transaminases e  $\beta$ HCG) para inclusão e exclusão dos participantes no estudo. Foi utilizado um prontuário clínico para registro de todos os dados resultantes nas visitas do estudo.

Na visita de intervenção os participantes foram internados no Centro de Pesquisa Clínica e Bioequivalência do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR, após jejum noturno de 10 horas. Os participantes foram acompanhados por uma equipe multiprofissional incluindo médico, enfermeiro e farmacêutico. Foi administrado um comprimido de AMX875mg (EMS Sigma Pharma, São Paulo, Brasil) com 200mL de água como auxílio na ingestão do medicamento.

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo EDTA com auxílio de um cateter Abocath® nos momentos pré – dose (0h), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6 e 8 horas após a ingestão da AMX. Café da manhã, almoço e café da tarde padronizados foram oferecidos 2, 4 e 7h após a administração do medicamento. As concentrações de AMX foram quantificadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem triplo quadrupolo – LC-MS / MS (15).

Um intervalo de no mínimo 48h foi considerado para o completo "wash out" do medicamento e então os participantes retornaram para a visita final, na qual foram realizadas avaliação clínica e laboratorial e o fechamento do estudo. Os voluntários foram instruídos a informar qualquer evento adverso durante todo o período do estudo.

### 2.4. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e análise estatística

Os dados registrados no prontuário clínico e as concentrações plasmáticas obtidas para cada participante foram organizadas em planilhas no Microsoft Excel e uma análise descritiva dos dados clínicos e antropométricos foi realizada.

Os parâmetros farmacocinéticos: concentração plasmática máxima observada ( $C_{max}$ ), tempo necessário para atingir  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (AUC) desde o tempo zero até a última coleta ( $AUC_{0-8}$ ), AUC do tempo zero ao tempo infinito ( $AUC_{0-inf}$ ), constante de eliminação ( $kel$ ), tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), depuração ( $Cl/F$ ) e volume de distribuição ( $Vd/F$ ); foram calculados considerando a análise monocompartimental utilizando o Programa Phoenix WinNonlin® e Microsoft Excel. A  $AUC_{0-8}$  e  $AUC_{0-inf}$  foram determinadas a partir da curva de concentração-tempo utilizando a regra trapezoidal linear (16).



Para comparação do perfil farmacocinético da AMX em obesos com voluntários eutróficos nas doses de 875mg e 500mg utilizou-se os valores obtidos por Baglie *et al.* (2005) e Thambavita *et al.* (2017), respectivamente (14,17).

A correlação entre as co-variáveis IMC, peso total, peso ajustado, peso ideal e peso magro e a variável  $AUC_{0-\infty}$  e  $C_{max}$  foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson, considerando uma correção forte quando o coeficiente de Pearson ( $r$ ) foi  $> 0,7$ .

### 3. RESULTADOS

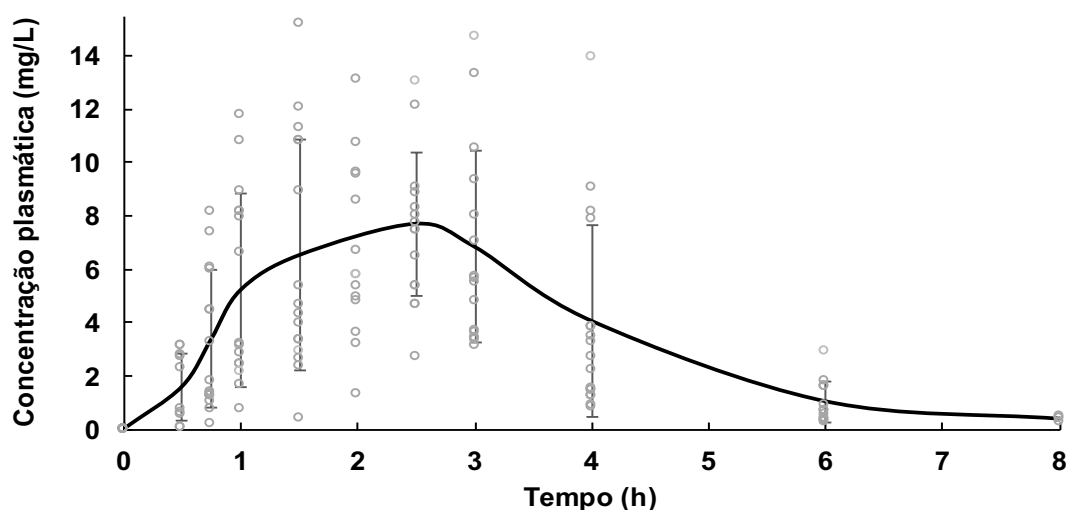
Foram incluídos no estudo um total de 18 voluntários obesos apresentando IMC entre 30 a 40  $kg/m^2$ , sendo 13 do sexo feminino e 5 do sexo masculino. As características antropométricas e os dados laboratoriais dos participantes são mostrados na Tabela 1. A população do estudo apresentou idade média de  $34,67 \pm 7,26$  anos, peso médio de  $92,82 \pm 11,52$  kg e IMC médio de  $33,11 \pm 2,26$   $kg/m^2$ . Não houve relato de evento adverso pelos participantes durante todo o estudo.

**Tabela 1. Dados antropométricos e laboratoriais dos 18 voluntários obesos que receberam comprimido de amoxicilina 875mg.**

Variáveis	Média $\pm$ DP	Mediana
<i>Antropométricas</i>		
Sexo n (%)		
Masculino	5 (28)	
Feminino	13 (72)	
Idade (anos)	$34,67 \pm 7,26$	34,50
Peso (kg)	$92,82 \pm 11,52$	89,80
IMC ( $kg/m^2$ )	$33,11 \pm 2,26$	33,40
<i>Laboratoriais</i>		
Creatinina (mg/dL)	$0,72 \pm 0,13$	0,73
Albumina (g/dL)	$4,24 \pm 0,20$	4,30
Glicemia (mg/dL)	$91,61 \pm 11,02$	89,00
Colesterol Total (mg/dL)	$190,11 \pm 31,27$	193,5
HDL (mg/dL)	$43,5 \pm 9,66$	42,5
LDL (mg/dL)	$119,56 \pm 30,93$	121,5
Triglicerídeos (mg/dL)	$135,33 \pm 79,77$	130,5
TGO/AST (U/L)	$22,00 \pm 3,27$	22,00
TGP/ALT (U/L)	$26,11 \pm 12,78$	21,00

HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; TGO/AST: aminotransferase de aspartate; TGP/ALT: aminotransferase de alanine.

Os valores observados de AMX *versus* tempo para cada indivíduo obeso são mostradas na Figura 1, sendo representados pelos círculos vazados. Além disso, também está representada a curva do perfil farmacocinético médio de todos os indivíduos e o desvio padrão.



**Figura 1: Perfil farmacocinético da amoxicilina 875mg em voluntários obesos**

Os parâmetros farmacocinéticos da AMX calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo em obesos obtidos neste estudo foram comparados com os dados publicados na literatura em voluntários eutróficos (14,17). Pode-se observar que os valores de  $C_{max}$  e  $AUC_{0-inf}$  dos voluntários obesos representa metade dos encontrados em voluntários eutróficos na dose de 875mg próximo dos obtidos quando administrada uma dose de 500mg (cápsula) de AMX. No entanto, os parâmetros de  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $ke$  e  $Vd/F$  foram equivalentes nos três grupos.

**Tabela 2. Média  $\pm$  DP dos parâmetros farmacocinéticos de amoxicilina 875mg em voluntários obesos comparados com dados da literatura de voluntários eutróficos.**

Parâmetros Farmacocinéticos	AMX875mg (comprimido)		AMX 500mg (cápsula)
	Voluntários obesos (N=18)	Voluntários eutróficos <sup>1</sup>	Voluntários eutróficos <sup>2</sup>
$C_{max}$ (mg/L)	9,56 $\pm$ 3,22	18,21 $\pm$ 6,08	7,6
$AUC_{0-inf}$ (mg.h/L)	26,17 $\pm$ 10,13	53,36 $\pm$ 17,99	25,40
$AUC_{0-8}$ (mg.h/L)	25,35 $\pm$ 10,33		
$t_{max}$ (h)	2,22 $\pm$ 0,84	2,03 $\pm$ 0,81	1,65
$t_{1/2}$ (h)	0,82 $\pm$ 0,19	1,51 $\pm$ 1,44	1,03
$ke$ ( $h^{-1}$ )	0,89 $\pm$ 0,19	0,46	0,67
$Vd/F$ (L)	46,89 $\pm$ 29,99	35,68	35,50
$Cl/F$ (L/h)	38,95 $\pm$ 16,73		
$Clcr$ (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	114,65 $\pm$ 23,32		

1. Bagliee *et al.* (2005) (16); 2. Thambavita *et al.* (2017) (13);  $C_{max}$ : concentração plasmática máxima observada;  $AUC_{0-8}$ : área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC) desde o tempo zero até a última coleta;  $AUC_{0-inf}$ : AUC do tempo zero ao tempo infinito;  $t_{max}$ : tempo necessário para atingir  $C_{max}$ ;  $t_{1/2}$ : tempo de meia vida;  $Ke$ : constante de eliminação;  $Vd/F$ : volume de distribuição;  $Cl/F$ : depuração;  $Clcr$ : depuração de creatinina calculado pelo método MDRD.

Não foi encontrada correlação entre as co-variáveis IMC, peso total, peso ajustado, peso ideal e peso magro considerando  $AUC_{0-inf}$  e  $C_{max}$ , não sendo possível sugerir qual seria a melhor forma de ajuste da dose com relação ao peso.

#### 4. DISCUSSÃO

Até o presente momento, este estudo foi o primeiro a avaliar os parâmetros farmacocinético em pacientes obesos com administração de comprimidos de 875 mg de AMX. Comparado com os dados em voluntários saudáveis descritos na literatura, foi observado uma diminuição nos parâmetros farmacocinéticos de  $C_{max}$  e  $AUC_{0-inf}$  da AMX nos obesos.

Os antibióticos pertencentes a classe dos beta-lactâmicos, possuem melhor eficácia quando a concentração plasmática do medicamento se mantém 40% do tempo do intervalo entre as doses acima da concentração inibitória mínima (CIMs) (18). Com base na média das concentrações plasmáticas obtidas nos voluntários obesos, observa-se que, os comprimidos contendo 875 mg de AMX seriam suficientes para combater a infecção de patógenos com CIMs < 4 mg/L.

De acordo com Longo *et al.* (2011), dentre 828 indivíduos que sofreram falha no tratamento com antibióticos, 64% estavam acima do peso ideal ou eram obesos, portanto, a obesidade foi considerada um preditor significativo para falha no tratamento com antimicrobianos (7).

Estudos com cápsulas contendo 500 mg de AMX, foram concordantes com nosso estudo e também mostraram que os valores de  $AUC_{0-t}$  (2,03  $\pm$  0,77  $\mu$ g.h/mL) e  $C_{max}$  (0,62  $\pm$  0,14  $\mu$ g/mL) foram menores para os participantes obesos (19).

Foi observado um leve aumento no  $Vd/F$  nos participantes obesos do nosso estudo e esta elevação pode ser resultado da água intersticial existente no tecido gorduroso e muscular, cuja AMX ao ser absorvida se desloca rapidamente para esta água intersticial e retarda o seu retorno ao compartimento central, podendo justificar assim, o baixo  $C_{max}$  e AUC após administração de dose única (8,12, 20).

Em geral, medicamentos com  $Vd$  baixo, tendem a se correlacionar melhor com peso ideal ou ajustado enquanto os fármacos com alto  $Vd$  correlacionam-se melhor com o peso total do corpo (21).

Embora a maioria dos parâmetros fisiológicos que podem afetar a biodisponibilidade do fármaco não se correlacione linearmente com o aumento do peso total, há de se ter precaução nos ajustes de doses, pois nos casos de aumento no valor de  $Vd$ , a AMX pode ser distribuída na água do tecido adiposo, que representa cerca de 30% da composição (10, 21) e retornar rapidamente ao compartimento central.

Portanto, este efeito de distribuição é esperado nas primeiras doses, entretanto, há necessidade de se prever a dose de manutenção considerando o retorno gradativo ao compartimento central, para evitar possíveis intoxicações (22).

O presente estudo possui algumas limitações a serem consideradas: 1) foi observada uma alta variabilidade entre os participantes que pode ser devido ao critério de inclusão baseados no IMC, pois a área superficial de um indivíduo com 73 kg e 150 cm comparado com outro de 106 kg e 181 cm recebendo a mesma dose será esperado concentrações mais baixas neste último indivíduo. Este critério foi adotado devido classificação de obesidade descrita pelos principais guias de obesidade. Outro fator confundidor pode ser a atividade dos transportadores peptídicos PEPT 1 para absorção da AMX que pode variar entre indivíduos (23, 24); 2) Não foi calculado tamanho de amostras pois não houve nenhum estudo do perfil farmacocinético de comprimidos da AMX em pacientes obesos e optou-se por realizar uma análise preliminar com 18 voluntários; 3) a literatura apresenta valores de  $C_{max}$  e AUC divergentes em relação aos voluntários sadios após administração de cápsulas e comprimidos e, portanto, há a necessidade de se realizar um grupo controle para eliminar estas possíveis divergências que podem existir entre os estudos. Em relação à comprimidos de 875 mg, apenas um estudo foi encontrado e os valores de  $C_{max}$  e AUC foram muito acima quando calculados proporcionalmente às cápsulas e suspensões contendo 500 mg.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo entre os parâmetros farmacocinéticos avaliados, foram observados a diminuição de  $C_{max}$  e  $AUC_{0-inf}$  e um pequeno aumento no  $Vd/F$  quando comparados com voluntários não obesos. O aumento no  $Vd/F$  pode indicar que a quantidade de água presente no obeso deve ser considerada nos ajustes de doses para esta população.

## FINANCIADORES

CAPES

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro de Pesquisa Clínica e Bioequivalência e a todos os funcionários do Hospital Universitário de Maringá, onde o protocolo clínico foi realizado. Grupo de Pesquisa em Hipertensão Arterial Sistêmica, Rigidez Arterial e Envelhecimento Vascular (GPHARV/UEM/HUM) responsáveis pelas avaliações antropométrica e bioimpedância dos voluntários. Em especial a todos os voluntários que concordaram em participar do estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Diretoria de Normas e Habilitação dos Produtos. Gerência-Geral de Regulação Assistencial. Gerência de Monitoramento Assistencial. Coordenadoria de Informações Assistenciais. Manual de diretrizes para o enfrentamento da obesidade na saúde suplementar brasileira. Rio de Janeiro: ANS, 2017. Disponível em: [http://www.ans.gov.br/images/Manual\\_de\\_Diretrizes\\_para\\_o\\_Enfrentamento\\_da\\_Obesidade\\_na\\_Sa%C3%BAde\\_Suplementar\\_Brasileira.pdf](http://www.ans.gov.br/images/Manual_de_Diretrizes_para_o_Enfrentamento_da_Obesidade_na_Sa%C3%BAde_Suplementar_Brasileira.pdf).
2. WHO. World Health Organization. Nutrition – double burden of malnutrition. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/double-burden-malnutrition/en/>.
3. WHO. World Health Organization. Global Nutrition Monitoring Framework: operational guidance for tracking progress in meeting targets for 2025. ISBN 978-92-4-151360-9. 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259904/9789241513609-eng.pdf?sequence=1>.
4. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 million participants. *Lancet*. 2016;387:1377–1396.
5. Adela Hruby, PhD M, Frank B. Hu, MD, PhD M. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2015;33(7):673–89.
6. Huttunen R, Syrjänen J. Obesity and the risk and outcome of infection. *Int J Obes*. 2013;37(3):333–40.
7. Longo C, Bartlett G, MacGibbon B, Mayo N, Rosenberg E, Nadeau L, et al. The effect of obesity on antibiotic treatment failure: a historical cohort study. *PharmacoepidemiolDrugSaf*. 2013 Sep;22(9):970-6.
8. Smit C, De Hoogd S, Brüggemann RJM, Knibbe CAJ. Obesity and drug pharmacology: a review of the influence of obesity on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Expert Opin Drug MetabToxicol*. 2018 Mar;14(3):275-285.
9. Jain R, Chung SM, Jain L, Khurana M, Lau SWJ, Lee JE, et al. Implications of obesity for drug therapy: Limitations and challenges. *ClinPharmacolTher*. 2011 Jul;90(1):77-89.
10. Morrish GA, Pai MP, Green B. The effects of obesity on drug pharmacokinetics in humans. *Expert Opin*

- Drug Metab Toxicol. 2011 Jun;7(6):697-706.
11. Knibbe CAJ, Brill MJE, Rongen A Van, Diepstraten J, Graaf PH Van Der, Danhof M. Drug Disposition in Obesity : Toward Evidence-Based Dosing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:149-67
  12. Meng L, Mui E, Holubar MK, Deresinski SC. Comprehensive Guidance for Antibiotic Dosing in Obese Adults. *Pharmacotherapy.* 2017 Nov;37(11):1415-1431.
  13. Liapikou A, Torres A. The Clinical Management Of Lower Respiratory Tract Infections. *Expert Rev Respir Med.* 2016 Apr;10(4):441-452.
  14. Thambavita D, Galappatthy P, Mannapperuma U, Jayakody L, Cristofolletti R, Abrahamsson B, et al. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms : Amoxicillin Trihydrate. *J Pharm Sci [Internet].* 2017;106(10):2930–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.068>.
  15. Montanha MC, Dos Santos Magon TF, de Souza Alcantara C, Simões CF, Silva SRB, Kuroda CM, et al. Reduced bioavailability of oral amoxicillin tablets compared to suspensions in Roux-en-Y gastric bypass bariatric subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2019 Jun 19. Available from: <https://doi.org/10.1111/bcp.14023>.
  16. Shargel L, Yu A, Wu-Pong S. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics.* 6 ed, 2015.
  17. Baglie S, Rosalen PL, Franco LM, Silva P, Groppo FC. Comparative bioavailability of 875 mg amoxicillin tablets in healthy human volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2005 Jul;43(7):350-4.
  18. Jacobs MR. How can we predict bacterial eradication? *Int J Infect Dis* 2003; 7: S13-S20.
  19. Becker M, Rocha S, Nucci G De, Lemos FN, Feitosa R, Lima DA, et al. Impact of Bariatric Surgery on the Pharmacokinetics Parameters of Amoxicillin. *Obes Surg.* 2019 Mar;29(3):917-927.
  20. Payne KD, li RGH. Dosing of antibacterial agents in obese adults : does one size fit all? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014 Jul;12(7):829-54.
  21. Tucker CE, Lockwood AM, Nguyen NH. Antibiotic dosing in obesity : the search for optimum dosing strategies. *Clin Obes.* 2014 Dec;4(6):287-95.
  22. Sime FB, Roberts MS, Roberts JA. Optimization of dosing regimens and dosing in special populations. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Oct;21(10):886-93.
  23. Bretschneider B, Brandsch M, Neubert R. Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H<sup>+</sup>/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm Res.* 1999;16(1):55-61.
  24. Nakashima E, Tsuji A, Kagatani S, Yamana T. Intestinal absorption mechanism of amino-beta-lactam antibiotics. III. Kinetics of carrier-mediated transport across the rat small intestine in situ. *J Pharmacobiodyn.* 1984;7(7):452-64.

**Palavras-chave:** Farmacocinética; Obesidade; Amoxicilina.

# USO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA SUPORTADA POR FIBRA OCA (HF-LPME) PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE COCAÍNA E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM AMOSTRAS DE CABELO

**Deborah Thais Palma Scanferla<sup>1</sup>, Mariana Aparecida Oliveira Madia<sup>1</sup>, Jéssica Yuri Sakurada<sup>2</sup>, Jéssica Cristina Zoratto Romoli<sup>3</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4</sup>**

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: deborahscanferla@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo da cocaína (COC) continua crescendo na América do Sul, sendo o Brasil o país com maior mercado, contribuindo em 4,4 milhões de usuários de COC, em um total de 18,8 milhões de usuários no mundo inteiro (1). O uso abusivo da cocaína possui forte associação a fatores de risco tanto mentais quanto físicos impactando diretamente a segurança e o status da saúde pública (2, 3).

Os tratamentos de dependentes químicos em de clínicas de recuperação podem ajudar no controle e, eventualmente, na superação do vício sendo, portanto, protetor contra o risco de mortalidade (3). Em associação, vem crescendo a demanda por monitorização do uso de substâncias psicoativas por meio da realização de testes toxicológicos, e frequentemente amostras de cabelo são analisadas. Os setores privados realizam estas análises, porém apresentam custos elevados e de difícil acesso a população que necessita desses serviços para manutenção de seu trabalho.

Atualmente há avanços notáveis em técnicas analíticas que permitem a análise de drogas com elevada sensibilidade, rapidez, e capacidade de analisar amostras complexas, como o cabelo. As vantagens da amostra cabelo em relação às matrizes convencionais como urina e sangue, correspondem a coleta ser relativamente fácil de executar, ser um procedimento não invasivo e, em situações forenses, pode ser realizada sob supervisão rigorosa para evitar adulterações ou substituições. Além disso, apresenta característica única, relacionada à janela de detecção de drogas que é estendida para semanas, meses ou até anos (4, 5). A análise do cabelo possibilita ainda a avaliação do abuso crônico de drogas por meio da análise segmentar (6) e pode fornecer informações mesmo após uma única dose de administração da droga (7, 8).

As técnicas miniaturizadas de preparo de amostras merecem destaque, principalmente a Microextração em Fase Líquida Suportada com Fibra Oca (HF-LPME), que é conhecida como procedimento "verde", devido à redução para uma quantidade mínima de uso de solventes orgânicos (microlitros), garantindo maior segurança ambiental. A HF-LPME apresenta ainda, vantagens como suportar grande demanda, menor custo final e possuir alta eficiência (9). Associado a extração, o equipamento Cromatografo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas (CG-EM) tem sido o mais empregado para a análise de drogas de abuso em matrizes biológicas, nos últimos anos (6), devido a sua sensibilidade e excelente limite de detecção. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, definida como "Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado" (10).

A proposta deste trabalho foi validar uma metodologia de análise para detecção de cocaína, benzoilecgonina (metabólito) e cocaetileno (metabólito resultante do uso concomitante com álcool), em CG-EM, por meio do preparo da amostra cabelo por HF-LPME.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Espécimes biológicos

Amostras de cabelo isentas das drogas em estudo foram fornecidas por voluntários. Quatorze (14) amostras de cabelo foram fornecidas por voluntários, dependentes químicos de cocaína, internados em clínica



de recuperação. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, parecer nº 458.185.

Após coleta, a matriz cabelo foi cuidadosamente armazenada usando uma folha de papel alumínio e inserida em envelopes de papel corretamente rotulados com seu respectivo número de referência, até o momento da análise. Este processo seguiu o guia “Diretrizes sobre o Exame de Drogas em Cabelos e Pelos: Coleta e Análise (v.3)”, publicado pela Sociedade Brasileira de Toxicologia (11,12). Juntamente com a coleta, foi aplicado aos doadores o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), além de uma entrevista para recolhimento de dados sócio-demográficos e padrão do uso de drogas.

## 2.2. Preparação das amostras

Um segmento de 6 cm de cabelo foi coletado iniciando da região proximal em relação a distal do couro cabeludo. Realizou-se a pesagem do segmento, correspondente a uma massa de cabelo suficiente para realização de duplicatas. Posteriormente, a amostra foi higienizada com detergente suave e água, seguido de diclorometano (2,0 mL, para cada 50 mg de cabelo), durante 15 min a 37°C, em banho de água. Em seguida, retirou-se o diclorometano da amostra e a mesma permaneceu em temperatura ambiente para secagem (13). Uma vez seca, cortou-se os fios de cabelo em pedaços pequenos e, em seguida, foram separadas alíquotas de 50 mg em tubos falcon, adicionados de 2,0 mL de metanol juntamente com padrões internos deuterados de benzoilecgonina (BZE-d3) e cocaína (COC-d3) (2,5 ng/mg de BZE-d3 e 10 ng/mg de COC-d3). Os tubos foram completamente selados com parafilme, sendo posteriormente incubados a 50°C durante 18 horas, para aumentar a liberação das possíveis quantidades de COC e seus metabólitos, a partir da matriz cabelo. Passado esse tempo, esperou-se o resfriamento dos tubos em temperatura ambiente. Em seguida, todo o volume de metanol foi transferido para um frasco de vidro de 4,0 mL e o conteúdo foi evaporado a 50°C, em banho de água (13). O resíduo obtido foi submetido à derivatização com 100 µL de acetonitrila, 2,0 µL de piridina e 2,0 µL de isobutilclorofornato sob banho ultrassônico por 6 min (14). Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de água deionizada ao frasco, agitando-o em vórtex. Posteriormente transferiu-se todo volume a um Eppendorf contendo 30 mg de tampão sólido (NaHCO<sub>3</sub>: K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>—2:1), agitando-o em vórtex, para ajustar o pH da solução entre 9 a 10. Assim, os tubos Eppendorf contendo as respectivas soluções foram submetidos à técnica HF-LPME. Esse processo de extração envolveu a imersão de uma fibra oca de polipropileno de 9 cm em frasco, contendo éter di-hexílico (fase orgânica), vertendo-o cerca de cinco vezes. Depois disso, o lúmen da fibra foi preenchido com cerca de 50-70 µL de HCl 0,05 M (fase aceptora) usando uma ponta de eletroforese. Ambas as extremidades da fibra foram então fechadas com auxílio de uma pinça de ponta chanfrada, e então inseridas na solução (amostra) contida no tubo Eppendorf. O mesmo foi transferido ao banho-ultrassônico, por 10 min. Após, o extrato foi retirado do interior da fibra e os solventes foram evaporados em banho de água a 40°C. Para a realização da análise em CG-EM as amostras foram ressuspensas em 50 µL de acetato de etila, sendo 1,0 µL injetado no aparelho (14).

## 2.3. Procedimento de validação

O método descrito foi totalmente validado de acordo com os princípios de orientadores do Grupo de Trabalho Científico para a Toxicologia Forense (SWGTOX) (15), *Society of Hair Testing* (12) e Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) (16). Um protocolo de validação foi seguido, contemplando os parâmetros como seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, efeito matriz e efeito residual.

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás TRACE 1300 GC System acoplado ao detector seletivo de massa quadrupolo (MSD) Thermo Scientific® ISQ Series (Thermo Fisher Scientific, Milão, Itália), com o auxílio do analisador automático AI 1310. A separação dos analitos foi realizada utilizando uma coluna capilar (30 m x 0,25 µm x 0,25 µm) com 5% de fenilpolisilfenilenosiloxano (TR-5MS), fornecido pela Thermo Scientific (Milão, Itália). A temperatura da porta do injetor foi de 250°C, e a temperatura da interface foi de 280°C. A rampa do forno consistiu em iniciar a estufa a 90°C por 1 min, aumentada em 15°C/min até 250°C, mantida por 2 min e, em seguida, aumentou novamente em 25°C/min subindo até 280°C e manteve-se durante 2 min, completando uma corrida de aproximadamente 17 min. O gás transportador (hélio) foi ajustado a uma vazão constante de 1,0 mL/min. As injeções foram feitas no modo sem divisão pulsado. O espectrômetro de massa foi operado por impacto eletrônico (70 eV).

A qualificação e quantificação de íons foram realizadas no modo de monitoramento iônico selecionado (SIM), os quais foram escolhidos com base em seletividade e abundância, a fim de maximizar o sinal – ruído em extratos preparados. Os íons selecionados foram os seguintes (íons de quantificação destacados em negrito): COC—m/z **182**, 272, 303; COC-d3—m/z **185**, 275, 306; CE—m/z **196**, 272, 317; BZE éster de isobutil—m/z **224**, 272, 345 e BZE éster de isobutil-d3—m/z **227**, 275, 348.

Para confecção das tabelas e demais análises estatísticas, os dados brutos foram capturados dos softwares de cada equipamento e plotados no Microsoft® Excel® 2010 e Minitab®18.

### 2.3.1. Seletividade

O ensaio de seletividade foi avaliado através da análise de sete brancos de matriz (sem adição de padrões) e dois zeros (brancos adicionados de padrão interno) (12). A presença ou ausência de quaisquer

picos interferentes (substâncias endógenas), em nível significativo, próximos ao tempo de retenção dos analitos e do padrão interno foram avaliados (15).

### 2.3.2. Linearidade

A linearidade do método foi estabelecida em amostras de cabelo preparadas, enriquecidas e analisadas pela técnica de extração descrita anteriormente. Foi utilizado uma faixa de trabalho de 0,1 a 20 ng/mg para cocaína (COC) e 0,05 a 20 ng/mg para benzoilecgonina (BZE) e também para o cocaetileno (CE). Assim, seis concentrações distintas, dentro da faixa estipulada, foram realizadas em cinco repetições (15). Curvas de calibração dos analitos foram obtidas pela correlação entre a resposta do sinal (razão da área do pico do analito e do padrão interno) e a concentração do analito na amostra (12). Os critérios de aceitação incluem um coeficiente de correlação (R) acima de 0,99. A avaliação do fenômeno homocedasticidade do modelo de calibração foi efetuado através do teste de falta de ajuste (Lack of fit), pelo software estatístico Minitab®18 (15, 16).

### 2.3.3. Limite de detecção (LoD) e Limite de quantificação (LoQ)

As análises do LoD e LoQ foram realizadas de formas similares. Para isso, em cada um dos limites, foram usadas três diferentes amostras de cabelo em branco, fortificadas com concentrações de analitos decrescentes, analisadas em duplicata em três execuções. O LoD foi definido como sendo a concentração mais baixa que produz uma resposta reproduzível do instrumento maior ou igual a três (3) vezes o nível de ruído do sinal de fundo das amostras negativas e atinge critérios de detecção e identificação pré-definidos aceitáveis (tempo de retenção, forma do pico, razões de íons espectrais de massa). Como critério de aceitação, o LoQ estimado foi considerado como sendo a concentração mais baixa que é capaz de obter detecção, identificação, exatidão e critérios de precisão em todas as três amostras fortificadas.

### 2.3.4. Precisão e exatidão intra-dia e inter-dia

A exatidão e precisão intra-dia foram avaliados através da análise no mesmo dia de 5 réplicas (n=5) de amostras de cabelo em branco enriquecidas com os analitos (COC, BZE e CE) em três (3) níveis de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) ao longo da faixa de variação da curva de calibração (n=15). A exatidão e precisão inter-dia foi avaliada em três dias consecutivos, em 5 repetições. O parâmetro precisão foi calculado usando o coeficiente de variação (CV), que foi caracterizado em termos da média dos valores encontrados das concentrações que foram fortificadas com os analitos, utilizando a equação linear. A exatidão foi calculada pela diferença da concentração média experimental obtida e a concentração esperada (teórica), sendo expressa em porcentagem do valor e erro padrão relativo (EPR). O critério de aceitação para os dois parâmetros foi de  $\pm 15\%$  para todas as concentrações, exceto no nível de concentração baixo, onde  $\pm 20\%$  foi aceito.

### 2.3.5. Efeito matriz

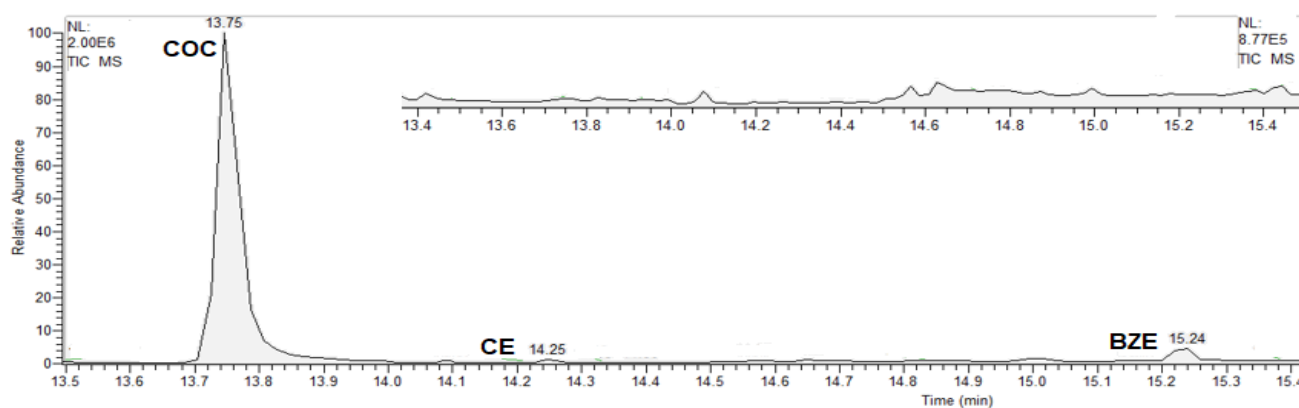
Foram extraídas soluções testes (sem adição de matriz cabelo) adicionadas de padrão interno e de analito em 6 concentrações diferentes (idêntico a curva de calibração), realizadas em triplicata. Este parâmetro foi realizado em condições idênticas à linearidade, de modo que o teste fornece a mesma diluição final que o procedimento normal produz, e o intervalo de adições abrangeu o mesmo intervalo em que a linearidade foi realizada. Pelo fato da calibração ser linear as inclinações da função de calibração usual e as de solução testes foram comparadas quanto à diferença significativa. Como critério de aceitação foi realizado um teste *t* de *Student*, pelo software estatístico Minitab®18, assumindo um nível de significância de 5% (cinco por cento) no teste de hipóteses, em que se avaliou a falta de significância (17).

### 2.3.6. Efeito residual

Para análise do efeito residual foram realizadas análises de três (3) injeções de uma mesma amostra branco, logo após a injeção de uma amostra processada (extraída) do ponto com concentração mais alta da curva de calibração. Como critério de aceitação os resultados das injeções, subsequentes à amostra no ponto mais alto da curva, foram comparados com aqueles obtidos para amostras em branco fortificadas com concentrações correspondentes ao limite de quantificação (LoQ).

## 3. RESULTADOS

O método de estudo foi seletivo, conforme ilustrado no cromatograma superior da Figura 1. Nesta mesma ilustração, há um cromatograma referente ao primeiro ponto da curva de calibração (0,1 ng/mg de COC, 0,05 ng/mg de BZE e 0,05 ng/mg de CE).



**Figura 1. Cromatograma CG-EM obtido por HF-LPME em amostras de cabelo, no ponto mais baixo de calibração.** \*Amostra de referência positiva: amostra de cabelo negativa adicionada dos padrões de COC (13,75 min; 0,1 ng/mg), CE (14,25 min; 0,05 ng/mg) e BZE éster de isobutil (15,24 min; 0,05 ng/mg). Fonte: próprio autor.

O método mostrou-se linear, dentro de todos intervalos de calibração adotados para os analitos, com coeficiente de correlação (R) acima de 0,99. A Tabela 1 apresenta o LoD, LoQ, as equações das curvas de calibração, coeficiente de correlação (R) e valores de *lack off fit* para todos os analitos analisados.

**Tabela 1. Resultados de linearidade do método de determinação de cocaína e produtos de biotransformação em cabelo e suas respectivas equações**

Analito	LoD (ng/mg)	LoQ (ng/mg)	Faixa de concentração	Equação da reta	R	Lack of fit
COC	0,05	0,1	LoQ a 20ng/mg	$y = 0,0938 + 0,0103x$	0,999	0,273
BZE	0,03	0,05	LoQ a 5ng/mg	$y = 0,4057 + 0,0338x$	0,999	0,257
CE	0,03	0,05	LoQ a 5ng/mg	$y = 0,1894 - 0,0026x$	0,999	0,375

Sendo: LoD= Limite de Detecção; LoQ= Limite de Quantificação; R= Coeficiente de correlação; Lack of fit= Valor *p* para o nível de significância de 0,05.

Subsequentemente, a Tabela 2 demonstra os resultados dos cálculos para avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão, intra-dia e inter-dia.

**Tabela 2. Parâmetros de validação analítica para o método HF-LPME–CG-EM para amostras de cabelo**

Analito	Concentração (ng/mg)	Precisão (CV)		Exatidão (EPR)	
		Intra	Inter	Intra	Inter
COC	0,3 (CQB)	1,26	17,86	-6,21	-6,21
	10,0 (CQM)	2,58	7,71	-2,74	-1,92
	16,0 (CQA)	1,6	1,8	3,16	3,32
BZE	0,15 (CQB)	9,3	11,43	8,38	8,38
	2,5 (CQM)	6,48	6,31	-1,96	-1,96
	4,0 (CQA)	1,92	2,56	2,04	2,04
CE	0,15 (CQB)	1,84	4,76	16,31	17,65
	2,5 (CQM)	3,86	3,58	-0,53	-1,58
	4,0 (CQA)	0,44	2,41	-1,24	-1,24

Sendo: CQB= Controle de Qualidade Baixo; CQM= Controle de Qualidade Médio; CQA= Controle de Qualidade Alto; CV= Coeficiente de Variação; EPR= Erro Padrão Relativo.

O efeito matriz foi avaliado de acordo com os valores-p encontrados dos três analitos COC, BZE e CE: 0,955, 0,729 e 0,852, respectivamente. Isto é, os valores-p para todos analitos, encontrados neste

método, foram maiores do que 0,05, confirmando paralelismo das retas. Por fim, não houve nenhum efeito residual no presente método.

Posteriormente à validação do método analítico, houve a aplicação da análise em amostras autênticas de cabelo, as mesmas foram fornecidas por quatorze (14) pacientes internados em clínica de recuperação de dependência química, os quais relataram ter utilizado cocaína, declarando a última vez de uso variável entre 1 a 90 dias. As concentrações de analitos encontradas variaram de 0,8 ng/mg a concentrações superiores de 20 ng/mg (COC), de 0 a 0,6 ng/mg (CE) e de 0,2 ng/mg a concentrações superiores de 5 ng/mg (BZE).

#### **4. DISCUSSÃO**

Neste estudo tivemos como objetivo principal validação de uma metodologia de análise para detecção de cocaína, benzoilecgonina (metabólito) e cocaetileno (metabólito resultante do uso concomitante com álcool). Nossos resultados demonstram que a utilização da técnica de HF-LPME e análise por CG-EM foi validada eficientemente. Não foram observados interferentes próximos aos três (3) tempos de retenção dos analitos selecionados, comprovando a seletividade do método. Quanto à curva de calibração, o método provou ser linear pelo coeficiente de correlação (R) de todos analitos serem adequados ( $R > 0,99$ ) e a falta de ajuste (valor de p) foi superior a 0,05, indicando que os modelos matemáticos estavam bem ajustados ao nível de 5%.

Segundo as recomendações da *Society of Hair Testing* (SoHT) há um valor de corte de detecção de cocaína e seus metabólitos em cabelo, sendo esses valores menores ou iguais à 0,5 ng/mg e 0,05 ng/mg, respectivamente (12). Neste trabalho, obteve-se LoD inferiores a estes valores de corte. E, quanto ao LoQ, somente o referente a cocaína foi inferior a este valor, porém, os metabólitos (benzoilecgonina e cocaetileno) estão também adequados, uma vez que foram iguais ao recomendado.

Tanto a precisão intra-dia como a inter-dia cumpriram os critérios estabelecidos por diretrizes internacionais, uma vez que os coeficientes de variação (CVs) obtidos foram inferiores a 15%, para todas as concentrações testadas dos analitos. Exceto para precisão inter-dia em CQB (0,3 ng/mg) do analito cocaína em que o valor obtido foi maior do que 15% (17,86%). Porém, por ser um nível de concentração baixo, uma porcentagem de 20% é aceita (15). Além disso, este controle de qualidade é menor que o valor de corte (0,5 ng/mg) do analito em questão, não sendo, portanto, um valor de referência para consumo da droga. Adicionalmente, os valores de exatidão intra-dia variaram de -6,21 a 16,31% e a exatidão inter-dia variou de -6,21 a 17,65%, os quais estão adequados (15). Como pode ser visto na Tabela 2 os valores mais altos referem-se ao CE, e isto é provavelmente devido ao fato de que foi a única substância sem referência de um padrão próprio analógico deuterado, pela ausência no laboratório em que foi realizado o método. Para tal fim, o COC-d3 foi utilizado.

Comprovou-se a ausência de interferência dos constituintes da matriz, pela confirmação do paralelismo das retas, pelo parâmetro de efeito matriz. Além disso, o método desenvolvido não detectou nenhuma transferência de analitos, não havendo efeito residual no mesmo.

As análises de rotina comprovaram a ingestão de cocaína em todas as amostras analisadas pelo método de estudo.

#### **5. CONCLUSÃO**

Uma técnica miniaturizada, de custo reduzido e menor uso de solventes foi executada na matriz cabelo para detecção e quantificação simultânea de cocaína e produtos de biotransformação (BZE e CE), por CG-EM. Todos os parâmetros de validação foram realizados com sucesso, de acordo com diretrizes internacionais. O método foi aplicado eficientemente em amostras autênticas, comprovando ser adequado para uso rotineiro no laboratório.

#### **FINANCIADORES**

CAPES e CNPq.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao professor Maurício Yonamine, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela doação de fibras oca de polipropileno, tornando possível a execução deste trabalho.

#### **REFERÊNCIAS**

1. United Nations Office on Drugs and Crime [Internet]. World drug report 2016, United Nations Publication; 2016 [Acesso em 10 Jul 2017]. Disponível em: <https://www.unodc.org/wdr2016/>.
2. United Nations Office on Drugs and Crime [Internet]. World drug report 2018: Global overview of drug demand and supply; 2017. Disponível em: <https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/Pre-briefingAM-fixed.pdf>.
3. Public Health England [Internet]. Guidance health matters: preventing drug misuse deaths; 2017 [Acesso em 10 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/health-matters-preventing-drug-misuse-deaths/health-matters-preventing-drug-misuse-deaths>.

4. Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int*. 2004;142(2–3):127–34.
5. Miller ML, Donnelly B, Martz RM. The forensic application of testing hair for drugs of abuse. *NIDA Res Monogr*. 1997;167:146–60.
6. Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta*. 2006;370(1–2):17–49.
7. Kim J, Yum H, Jang M, Shin I, Yang W, Baeck S, et al. A comprehensive and sensitive method for hair analysis in drug-facilitated crimes and incorporation of zolazepam and tiletamine into hair after a single exposure. *Anal and Bioanal Chem*. 2016 Jan;408(1):251-63.
8. Madry MM, Steuer AE, Hysek CM, Liechti ME, Baumgartner MR, Kraemer T. Evaluation of drug incorporation into hair segments and nails by enantiomeric analysis following controlled single MDMA intakes. *Anal Bioanal Chem*. 2016 Jan;408(2):545-56.
9. Moreda-Piñeiro J, Moreda-Piñeiro A. Recent advances in combining micro-extraction techniques for sample pre-treatment, *Trends Anal Chem*. 2015;(71)265–74.
10. World Health Organization [Internet]. Expert committee on specifications for pharmaceutical preparations: thirty second report; 1992. p. 134.
11. Sociedade brasileira de toxicologia [Internet]. Diretrizes sobre o exame de drogas em cabelos e pelos: coleta e análise; 2016 [Acesso em 22 Jul 2018]. Disponível em: <https://www.sbtox.org/>.
12. Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. Society of hair testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int*. 2012;218(1–3):20–4.
13. Pego AMF, Roveri FL, Kuninari RY, Leyton V, Miziara ID, Yonamine M. Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography – mass spectrometry (GC–MS). *Forensic Sci Int*. 2017;274:83–90.
14. de Toledo FC, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;25;798(2):361-5.
15. Scientific Working Group for Forensic Toxicology [Internet]. Scientific working group for forensic toxicology: standard practices for method validation in forensic toxicology. *J Anal Toxicol*. 2013;37(7):452–474.
16. United Nations Office on Drugs and Crime [Internet]. Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens; 2009 [Acesso em 22 Jul 2018]. Disponível em: [https://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf).
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet]. Validação de métodos analíticos: resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017; 2017 [Acesso em 9 Jul 2019]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>.

**Palavras-chave:** validação; cocaína; amostras de cabelo.



## REDUCED ORAL BIOAVAILABILITY OF AMOXICILLIN IN RYGB BARIATRIC SUBJECTS

**Maiara Camotti Montanha<sup>1,2</sup>; Thiago Ferreira dos Santos Magon<sup>3</sup>; Conrado de Souza Alcantara<sup>2</sup>; Caroline Ferraz Simões<sup>4</sup>; Sandra Regina Bin Silva<sup>2</sup>; Cristina Megumi Kuroda<sup>2</sup>; Sérgio Seiji Yamada<sup>2</sup>; Josmar Mazucheli<sup>5</sup>; Paulo Jorge Pereira Alves Paixão<sup>6</sup>; Elza Kimura<sup>2,7</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate Student (Ph.D.), Postgraduate Program in Biosciences and Physiopathology (PBF), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Clinical Researcher, Clinical Research Centre and Bioequivalence Studies, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Postgraduate Student (Ph.D.), Postgraduate Program in Food Science (PPC), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Postgraduate Student (Ph.D.), Postgraduate Program in Physical Education, Universidade Estadual de Maringá/Universidade Estadual de Londrina, Maringá/Londrina, PR

<sup>5</sup>Associate Professor, Department of Statistics, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Invited Professor, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Lisbon, Portugal

<sup>7</sup>Associate Professor, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: maiara.teofilos@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Amoxicillin (AMX), an amino-penicillin, is one of the most commonly prescribed antibiotics for the treatment of upper and lower respiratory tract, skin, genitourinary tract and *Helicobacter pylori* infections. It is listed in the WHO's 20th list of Essential Medicines (2017) (1) and it is available in many countries in tablet forms, capsule, powder for oral suspension and intravenous injection solution, the latter not being available in Brazil. The oral AMX is completely absorbed in the small intestine (2) and presents absolute bioavailability ranging from 89.4% to 97%, for doses of 125 up to 1000 mg (3, 4).

According to the Biopharmaceutical Classification System (BCS), AMX may be classified differently because it presents dose-dependent behavior. As such it can be considered a class I for doses up to 875 mg, class II between 875 mg and 1000 mg and class IV for doses over 1000 mg (5). Therefore, it is hypothesized that any physiologic changes in the gastrointestinal (GI) tract may interfere in the AMX absorption rate, especially when given as tablets at higher doses, because the processes of disintegration and dissolution of tablets are directly dependent on the fluid content, pH and motility of the GI tract and any changes in this environment may affect the rate and extension of the drug absorption (6).

A special population that present these physiologic changes are the overweight patients who have undergone bariatric surgery, namely the Roux en Y gastric bypass (RYGB), a restrictive and mal-absorptive surgery. Since their stomach is reduced to a small proximal gastric pouch of around 50 mL, their duodenum and the initial part of the jejunum (around 60 cm) are deviated, these patients may present some issues regarding drug absorption because of the reduced length of the small intestine (7). In particular, very little information is available about AMX absorption in bariatric subjects, which leads to uncertainty on how to prescribe oral antibiotics for this population in order to avoid the risk of therapeutic failure and development of antimicrobial resistance (8-11).

There is only one study published in the literature (12) suggesting a lower absorption of AMX after bariatric surgery. However, this study is a case report and therapeutic failure was only observed when oral AMX was administered to a pregnant patient, no blood quantification or pharmacokinetic parameters were measured and calculated. It is not clear whether there was a loss in the AMX absorption or whether the therapeutic failure was inherent to the patient, although sensitivity testing showed that the microorganism was sensitive to the AMX prescribed.

Therefore, the aim of this study was to carry out a randomized clinical study to evaluate the bioavailability of AMX suspension in RYGB bariatric subjects.

### 2. MATERIAL AND METHODS

#### 2.1. Study design and population

This was a single-center, randomized, blinded (analytical) study. The study protocol was registered in the Brazilian Clinical Trials Registry (REBEC) under the number RBR-3DGCPV. The protocol was approved by

the State University of Maringá Institutional Review Board (CAAE57476516.3.0000.0104) and all subjects provided written informed consent before inclusion in the pre-screening study.

Adult subjects, aged 18 to 55 years old, who have undergone RYGB surgery for more than 3 months and less than 10 years of surgery, from Maringá – Paraná State, were included in the study. Subjects who presented with a history of allergy to AMX and other antibiotics of the same class, with renal and hepatic impairment, pregnant women, with hemoglobin levels below 9.9 g/dL, under treatment with pro-kinetics or that underwent other type of bariatric surgery were excluded from the study.

## 2.2. Study protocol

A total of 26 subjects were pre-screened for the inclusion criteria (exams of hemogram, lipidogram, glycemia, creatinine, urea, albumin, transaminases, bilirubin and  $\beta$ HCG for women) and among them 20 subjects fulfilled the inclusion criteria.

The anthropometric and clinical data were collected, namely, gender, age, ethnicity, weight, height, body mass index (BMI, kg/m<sup>2</sup>), heart rate (HR), blood pressure (systolic and diastolic) and time of surgery. Three visits were scheduled for the whole study: the 1<sup>st</sup> visit was for inclusion screening; the 2<sup>nd</sup> was for the administration of AMX suspension to the subjects and, finally, the 3<sup>rd</sup> visit was for the clinical evaluation and closing the study. On each day of visit, before any intervention, the vital signs were measured from each subject.

## 2.3. AMX Dosing and blood sampling

The dosage form of AMX used in this study was amoxicillin – 400 mg/5 mL suspension (EMS Sigma Pharma, São Paulo, Brazil).

On the second visit day, the subjects were admitted to the Clinical Research Center of the University Hospital of Maringá at 7 am for pharmacokinetic (PK) studies after overnight fasting. An abocath® catheter was placed in the forearm of the subjects for serial blood collection. The subjects received 10 mL of AMX suspension (400 mg/5mL) which was freshly prepared, according to randomization, with up to 200 mL of water in small portions of 50 mL over a period of 2 minutes to help swallow the formulations. The blood samples were collected at times 0 (before the drug intake), 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6 and 8 hours after AMX intake. Standardized snacks were given 2 hours and 7 hours after drug administration and a standardized meal was given to all subjects 4 hours after drug administration. The subjects were discharged from the unit after the last blood sampling. During the whole protocol, the subjects were assisted by a physician from the Clinical Research Center.

## 2.4. Analytical method and sample processing

Immediately after blood sampling, the tubes were coded for blinding purposes. The samples were centrifuged for 15 minutes (3500 rpm, 4° C) and the plasma was separated and kept at – 80 ° C until analysis for a maximum time of 30 days, according to stability studies. The method was validated according to the International Conference Harmonization (ICH) rules accomplished with the local and international regulation for bioanalytical method (13, 14). Five replicate samples per concentration were used to determine the lower limit of quantification of 0.2 mg/L, intra- and inter-day coefficients of variation (CVs) of less than 5% over a linear range of peak height ratios ( $r^2 = 0.99$ ) from 0.2 to 15 mg/L and sample stability was obtained by the analytical method validation.

Amoxicillin concentrations were quantified in the plasma samples by liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS), according to the method described by Dong X. et al. (2013) with slight modifications, for validation of the method (15).

## 2.5. Data entry and statistical analyses

Standardized clinical report forms (CRF) were used and the data files were inputted into Microsoft Excel datasheets (Version 2010; Microsoft Corp.) and R-package R-commander.

A descriptive analysis was carried out for the anthropometric and clinical data, the correlation between co-variables: gender, age, adjusted weight, BMI and time of surgery and the variable  $AUC_{0-inf}$  was determined by Pearson correlation coefficient. It was considered a strong correlation when the *pearson (r) coefficient* was > 0.7.

Noncompartmental analysis was used to estimate the pharmacokinetic parameters: maximum observed plasma concentration ( $C_{max}$ ); time required to reach  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ); area under the plasma concentration versus time curve (AUC) from time zero (pre-dose) to the last sampling time ( $AUC_{0-8}$ ); AUC from time zero to infinity ( $AUC_{0-inf}$ ); residual area or percentage of extrapolated part of  $AUC_{0-inf}$  (%AUC); apparent terminal elimination rate constant ( $Ke$ ); apparent terminal elimination half-life ( $t_{1/2}$ ); clearance (Cl/F) and volume of distribution (Vd/F). The  $AUC_{0-8}$  and  $AUC_{0-inf}$  were determined from the concentration–time curve using the linear trapezoidal rule (16). Bioequivalence studies of AMX suspension (400 mg/mL) with healthy volunteers from ANVISA were used to compare the amount of AMX absorbed in RYGB subjects.

## 3. RESULTS

### 3.1. Demographic and clinical data

A total of 20 RYGB subjects (4 males and 16 females) were enrolled in the study and all completed both study periods. The main demographic and clinical data of the included subjects are shown in Table 1. The mean age was  $42.65 \pm 7.21$  years, mean weight of  $79.76 \pm 12.55$  kg and the mean BMI of  $29.88 \pm 4.36$  kg/cm<sup>2</sup>. The mean time of surgery was 41.25 months with a range of 5 – 108 months.

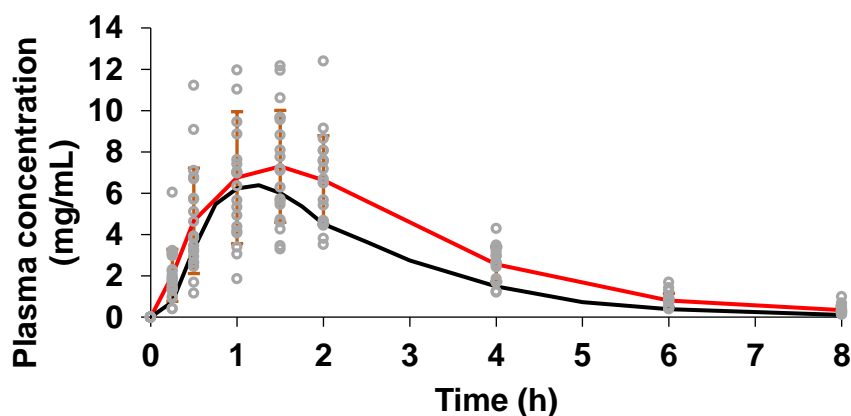
**Table 1. Population demographic and clinical data.**

Variable	Subjects (N=20)
Gender, n (%)	
Male	4 (20)
Female	16 (80)
Age (years)	42.65 (7.21)
Weight (kg)	79.76 (12.55)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.88 (4.36)
Months post-bypass	41.25 (36.76)
Systolic pressure (mmHg)	109.35 (10.52)
Glycemia (mg/dL)	90.05 (19.42)
Hemoglobin (g/dL)	12.53 (1.28)
Creatinine (mg/dL)	0.67 (0.08)
ALT (U/L)	34.45 (10.85)
Total cholesterol (mg/dL)	151.00 (25.02)
Triglyceride (mg/dL)	86.50 (28.42)
HDL (mg/dL)	53.20 (16.22)
LDL (mg/dL)	95.05 (21.77)

Mean (SD); HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ALT, alanine aminotransferase.

### 3.2. Amoxicillin pharmacokinetics

The curve of AMX concentration *versus* time after oral administration of suspension in RYGB bariatric subjects shows that the mean amount of suspension formulation absorbed was lower than expected when compared to the amount absorbed of AMX by healthy volunteers from bioequivalence studies (Figure 1).



**Figure 1. AMX plasma concentrations versus time.** Mean suspension pharmacokinetic profile of AMX suspension 800 mg in RYGB subjects (red line). Mean suspension pharmacokinetic profile of AMX suspension 400 mg in healthy volunteers (bold line).

This difference can be better observed by comparison of the relevant pharmacokinetics parameters presented in Table 2, where we can see that the mean  $C_{max}$  of the suspension ( $8.73 \pm 3.26$  mg/L), the mean  $T_{max}$  of the suspension ( $1.7 \pm 0.86$  h) and, the mean  $AUC_{0-8}$  and  $AUC_{0-inf}$  of the suspension ( $26.82 \pm 8.18$  mg.h/L and  $27.59 \pm 8.32$  mg.h/L, respectively) were lower than expected, once the observed concentrations in healthy volunteers correspond to 400 mg of AMX (half of the administered dose to bariatric subjects), indicating a reduced absorption in post-bariatric subjects. The mean %AUC (97.21 %) indicates that the sampling times were sufficient for the complete characterization of absorption, as  $AUC_{0-8}$  corresponded to more than 80% of  $AUC_{0-inf}$ .

**Table 2. Pharmacokinetic parameters of AMX after oral administration of suspension.**

Pharmacokinetic parameters	AMX	
	RYGB suspension 800 mg (N=20)	Healthy suspension 400 mg (N=24)
C <sub>max</sub> (mg/L)	8.73 (3.26)	6.97 (1.84)
AUC <sub>0-8</sub> (mg.h /L)	26.82 (8.18)	16.88 (1.96)
AUC <sub>0-inf</sub> (mg.h /L)	27.59 (8.32)	17.14 (1.99)
%AUC	97.21 (2.51)	97.15 (1.73)
t <sub>max</sub> (h)	1.7 (0.86)	1.24 (0.75-1.5)
t <sub>1/2</sub> (h)	1.32 (0.31)	1.16 (0.26)
Ke/ (h <sup>-1</sup> )	0.55 (0.12)	0.63 (0.13)
Cl/F (L/h)	28.99	23.33
Vd/F (L)	52.72	37.04

Mean (SD); SD, standard deviation; CI, confidence interval; C<sub>max</sub>, maximum observed plasma drug concentration; AUC<sub>0-8</sub>, total area under the curve (from time zero to 8 hours); AUC<sub>0-inf</sub>, total area under the curve (from time zero to infinity); %AUC, percentage of extrapolated part of AUC<sub>0-inf</sub>; t<sub>max</sub>, time to C<sub>max</sub> (range); t<sub>1/2</sub>, elimination half-life; Ke/, elimination rate constant; CL, clearance; Vd, volume of distribution.

None of the co-variables: gender, age, adjusted weight, BMI and time of surgery correlated with AUC<sub>0-inf</sub>, for both the tablets and the suspension.

#### 4. DISCUSSION

Our study showed that the suspension formulation presented a lower bioavailability in the RYGB bariatric subjects than in healthy volunteers. We believe that this is a consequence of the physiological alterations after RYGB surgery. The physiological changes after RYGB surgery such as gastric volume and intestinal length reduction, increase of pH, decrease of gastric and intestinal motility and decrease of bile salts and hydrochloric acid excretion may play an important role in the absorption process (7).

The intestinal transit rate and the motility in RYGB subjects are still uncertain, since some authors suggest that the time of intestinal transit is decreased while others state that it is increased after surgery (17-19).

Some excipients and vehicles are well known to decrease the gastro-intestinal transit time, such as polyethylene glycol 400 (PEG 400), mannitol, xylitol and others, which decrease the drug bioavailability (20). According to Adkin et al. (1995) (21), the intestinal transit time of the saccharine or sucrose solution, vehicles used in the suspension formulation in our study, is similar to the water, not affecting the suspension bioavailability. These results support the pharmaceutical recommendations described by some authors that liquid dosage forms are preferable than solid forms for patients undergoing bariatric surgery (6,11). In addition to being easier to ingest, they do not present the disintegration and dissolution step as a limitation.

Several studies available in the literature, with healthy subjects and a dose of 875 mg of AMX tablets (alone or in combination with Clavulanic acid), presented values of AUC<sub>0-inf</sub> and C<sub>max</sub> from 43.80 to 51.29 mg.h/L and 12.13 to 15.30 mg/L, respectively (22-24). Compared to our results, RYGB subjects appear to present a mean reduction of AMX absorption of 40 % for suspension.

One of the reasons why the amount of AMX absorbed is lower in RYGB subjects may be because AMX presents absorption process mediated by PEPT-1 carriers, which are present mainly in the proximal region of the intestine. The deviation of the duodenum and part of the jejunum may decrease the absorption sites of AMX leading to a lower amount absorbed. For this reason, the reduced bioavailability that occurs only at doses higher than 1000 mg is due to the transport saturation process (25-28) which can be observed at lower doses in RYGB subjects due to the lack of this process. Furthermore, at an increased pH, which corresponds to the pH of the distal intestine, AMX is partially deprotonated (29), since it is not completely in the neutral form, the amount absorbed by the passive diffusion process is decreased.

At doses of 800 mg, a therapeutic failure may not occur, since it is very high (30). However, the prescribers should make a strict follow up with the RYGB subjects because it may affect the clinical outcome, mainly in long term treatments. Therefore, it is important to follow the clinical evolution and response to the treatment through the symptoms, not only for AMX, but for all drugs prescribed for RYGB subjects, mainly those with narrow therapeutic index.

Our study has some limitations, ideally a bioavailability study is performed with the intravenous dosage form, however we could not carry out this study using intravenous formulation as reference since it is not approved in Brazil. We did not run the study with non-bariatric subjects, as control group, we compared the results obtained by this study to findings available in the literature, which increases the variability between the results.



Future studies to investigate the impact of gastric bypass surgery on pharmacokinetics of other drugs are necessary, as well as, studies that investigate the intestinal transit time in post-bariatric subjects and the impact of this on the drugs absorption.

## 5. CONCLUSION

According to the results obtained from this study, AMX suspension presented a lower bioavailability in RYGB subjects than in healthy volunteers. This is unlikely to lead to a therapeutic failure by itself, since the dose of AMX indicated for the treatment of general infections is very high and, despite the difference observed, both reached the time period necessary to cover the MIC of most of the pathogens for which AMX is indicated. However, it is important to follow the clinical evolution and response to the treatment in RYGB patients through the symptoms they manifest.

## FINANCIAL SUPPORT

CAPES, CNPq and SETI.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dra. Silvia Maria Tintori for the technical assistance and the clinical analysis laboratory and medical outpatient staffs, as well as, the Center of Clinical Research and Bioequivalence staff, all from the University Hospital of Maringá where the entire clinical protocol was performed. Also, we would like to thank Gustavo Mendes and Therapeutic Equivalence Coordination (CETER) from the ANVISA who kindly assisted us in the study of bioequivalence.

## REFERENCES

1. Organization WH. Model List of Essential Medicines:20th list. Geneva, Switzerland, 2017.
2. Lennernäs H, Knutson L, Knutson T, Hussain A, Lesko L, Salmonson T, et al. The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15(3):271-7.
3. Ali B, Amin S, Ahmad J, Ali A, Mir SR, Ali M. Bioavailability enhancement studies of amoxicillin with Nigella. *Indian J Med Res.* 2012;135(4):555-9.
4. Spyker DA, Rugloski RJ, Vann RL, O'Brien WM. Pharmacokinetics of amoxicillin: dose dependence after intravenous, oral, and intramuscular administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977;11(1):132-41.
5. Thambavita D, Galappathy P, Mannapperuma U, Jayakody L, Cristofolletti R, Abrahamsson B, et al. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Amoxicillin Trihydrate. *J Pharm Sci.* 2017;106(10):2930-45.
6. Azran C, Wolk O, Zur M, Fine-Shamir N, Shaked G, Czeiger D, et al. Oral drug therapy following bariatric surgery: an overview of fundamentals, literature and clinical recommendations. *Obes Rev.* 2016;17(11):1050-66.
7. Elder KA, Wolfe BM. Bariatric surgery: a review of procedures and outcomes. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2253-71.
8. Padwal R, Brocks D, Sharma AM. A systematic review of drug absorption following bariatric surgery and its theoretical implications. *Obes Rev.* 2010;11(1):41-50.
9. Srinivas NR. Impact of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on Pharmacokinetics of Administered Drugs: Implications and Perspectives. *Am J Ther.* 2016;23(6):e1826-e38.
10. Yska JP, van der Meer DH, Dreijer AR, Eilander W, Apers JA, Emous M, et al. Influence of bariatric surgery on the use of medication. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016;72(2):203-9.
11. Hachon L, Declèves X, Faucher P, Carette C, Lloret-Linares C. RYGB and Drug Disposition: How to Do Better? Analysis of Pharmacokinetic Studies and Recommendations for Clinical Practice. *Obes Surg.* 2017;27(4):1076-90.
12. Magee SR, Shih G, Hume A. Malabsorption of oral antibiotics in pregnancy after gastric bypass surgery. *J Am Board Fam Med.* 2007;20(3):310-3.
13. ANVISA. Resolução-RE nº 27, de 17 de maio de 2012. Available at: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html)2012. Accessed September 04, 2018.
14. Drug and Food Administration. FDA guidance for industry: bioanalytical method validation. In: *US, Department of Health and Human Services FaDA, Center, for Drug Evaluation and Research: Rockville M*, editors. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>2001. Accessed September 04, 2018.
15. Dong X, Ding L, Cao X, Jiang L, Zhong S. A sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of amoxicillin and ambroxol in human plasma with segmental monitoring. *Biomed Chromatogr.* 2013;27(4):520-6.



16. Shargel L, Yu A, Wu-Pong S. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 6 ed, 2015.
17. Dirksen C, Damgaard M, Bojsen-Møller KN, Jørgensen NB, Kielgast U, Jacobsen SH, et al. Fast pouch emptying, delayed small intestinal transit, and exaggerated gut hormone responses after Roux-en-Y gastric bypass. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(4):346-e255.
18. Pellegrini CA, Deveney CW, Patti MG, Lewin M, Way LW. Intestinal transit of food after total gastrectomy and Roux-Y esophagojejunostomy. *Am J Surg*. 1986;151(1):117-25.
19. Suzuki S, Ramos EJ, Goncalves CG, Chen C, Meguid MM. Changes in GI hormones and their effect on gastric emptying and transit times after Roux-en-Y gastric bypass in rat model. *Surgery*. 2005;138(2):283-90.
20. Schulze JD, Ashiru DA, Khela MK, Evans DF, Patel R, Parsons GE, et al. Impact of formulation excipients on human intestinal transit. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(6):821-5.
21. Adkin DA, Davis SS, Sparrow RA, Huckle PD, Phillips AJ, Wilding IR. The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *Br J Clin Pharmacol*. 1995;39(4):381-7.
22. Medicines Evaluation Board (MEB). Public Assessment Report; AMXe/Clavulaanzuur Actavis 500/125 mg and 875/125 mg, film-coated tablets. NL/H/2782/001-002/MR (2015). Available at: <https://db.cbg-meb.nl/Pars/h103893.pdf>. Accessed October 18, 2018.
23. Medicines Evaluation Board (MEB). Public Assessment Report; Amoxiclav Aristo 500 mg/125 mg and 875 mg/125 mg film-coated tablets. NL/H/3468/001-002/DC (2016). Available at: <https://db.cbg-meb.nl/Pars/h116980.pdf>. Accessed October 18, 2018.
24. Baglie S, Rosalen PL, Franco LM, Ruenis AP, Baglie RC, Franco GC, et al. Comparative bioavailability of 875 mg amoxicillin tablets in healthy human volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2005;43(7):350-4.
25. Chulavatnatol S, Charles BG. Determination of dose-dependent absorption of amoxycillin from urinary excretion data in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 1994;38(3):274-7.
26. Sala-Rabanal M, Loo DD, Hirayama BA, Turk E, Wright EM. Molecular interactions between dipeptides, drugs and the human intestinal H<sup>+</sup>-oligopeptide cotransporter hPEPT1. *J Physiol*. 2006;574(Pt 1):149-66.
27. Bretschneider B, Brandsch M, Neubert R. Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H<sup>+</sup>/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm Res*. 1999;16(1):55-61.
28. Nakashima E, Tsuji A, Kagatani S, Yamana T. Intestinal absorption mechanism of amino-beta-lactam antibiotics. III. Kinetics of carrier-mediated transport across the rat small intestine in situ. *J Pharmacobiodyn*. 1984;7(7):452-64.
29. Tsuji A, Nakashima E, Hamano S, Yamana T. Physicochemical properties of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. *J Pharm Sci*. 1978;67(8):1059-66.
30. Kiffer CR, Pignatari AC. Pharmacodynamic evaluation of commonly prescribed oral antibiotics against respiratory bacterial pathogens. *BMC Infect Dis*. 2011;11:286.

**Keywords:** gastric bypass; amoxicillin; bioavailability.

## PHARMACODYNAMIC EVALUATION OF POLYMYXIN B COMBINATION TO PREVENT MUTANT SELECTION IN MULTIDRUG-RESISTANT *Acinetobacter baumannii*

Nayara Helisandra Fedrigo<sup>1</sup>; Danielle Rosani Shinohara<sup>2</sup>; Paulo Victor Batista Marini<sup>1</sup>; Silvia Maria dos Santos Saalfeld<sup>2</sup>; Nathalie Kira Tamura<sup>3</sup>; Josmar Mazucheli<sup>4</sup>; Sherwin Kenneth Sy<sup>5</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate students, Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, PR, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate students, Program of Health Sciences, State University of Maringá, PR, Brazil

<sup>3</sup>Biochemical Pharmacist, University Hospital of Maringá, PR, Brazil

<sup>4</sup>Professor, Department of Statistics, State University of Maringá, PR, Brazil

<sup>5</sup>Adjunct Professor, Department of Statistics, State University of Maringá, PR, Brazil

<sup>6</sup>Professor, Department of Health Sciences, State University of Maringá, PR, Brazil

e-mail: nayhfedrigo@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

The rapid increase in the antibiotic resistance has become a serious public health issue. Although there are new antimicrobial agents recently marketed for active against “difficult-to-treat” Gram-negative bacilli (BGN), few of those are available against carbapenem-resistant BGN (1). For this reason, old compounds such as polymyxins remains useful as a last-resort treatment to combat these multidrug-resistant (MDR) pathogens, particularly carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (2).

Polymyxin B (PMB) or E (colistin) exerts its antibacterial effect initially by acting on the outer membrane permeability, followed by destabilization of the cytoplasmic membrane (3). Both antibiotics received marketing approval in the 1950s but declined in use during the 1970s due to high rates of nephrotoxicity (4). However, they have been reintroduced in the last decade due to the lack of new antimicrobials do treat MDR-BGN (5).

Despite PMB has sustained *in vitro* activity against Gram-negative bacteria, its treatment in monotherapy frequently results in clinical failure, in part because the therapeutic concentrations used to kill the majority of the susceptible pathogens may be insufficient to prevent growth of resistant mutant subpopulation (6). Even though the advantages of polymyxins combination therapy over monotherapy is conflicting (7), combination therapy has been considered as an effective strategy to prevent or delay the emergence of resistant mutants (8), including those that can breakdown  $\beta$ -lactams (9).

Some investigators have shown that mutant selection window (MSW) and mutant prevention concentration (MPC) measurements can used to evaluate the degree of drug resistance and to achieve its therapeutic effect, respectively (10). Although MSW hypotheses (the range of drug concentrations between the minimum inhibitory concentration [MIC] and MPC) has proved to be relevant for fluoroquinolones (11), there is a lack of information on this phenomenon related to the Pharmacokinetic/Pharmacodynamics (PK/PD) index for both monotherapy and combination therapy with PMB. The aims of this study were (i) to determine how large the range of PMB concentrations fall within MSW ( $T_{MSW}$ ) or to remain above MPC ( $T > MPC$ ) against *A. baumannii* isolates (ii) to investigate whether PMB plus meropenem (MEM) therapy in different dosing regimens can prevent the emergence of PMB resistant mutants.

### 2. MATERIAL E METHODS

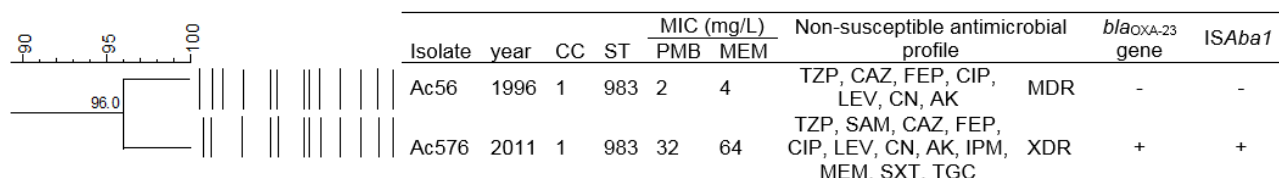
#### 2.1. Samples selection

Over the last twenty years the Medical Microbiology Laboratory (LMM) has been investigating bacterial resistance in three tertiary hospitals in southern Brazil. Species identification and characterization based on susceptibility profile to clinically available antimicrobials were performed by automated system (Phoenix™ BD or MicroScan™) according to the protocols established for each equipment. Epidemiological investigations were carried out in those health institutions. The isolates were genotypically characterized by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) followed an analysis of gels in Bionumerics® v.6,5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) (12).

In 2009, the incidence and mortality rate of patients with *A. baumannii* in Intensive Care Units (ICU) increased at hospital named “A”. From this observation, a detailed epidemiological investigation of the environment, colonized patients and hands of healthcare professionals in the ICU were started. Studies

revealed the existence of an endemic clone in this hospital (13,14). Further studies showed the presence of the same cluster in ICU of both hospitals “B” and “C”. However, the construction of a new ICU in the hospital “B” did not prevent that endemic cluster from being transferred to the new unit (15).

Molecular typing by ERIC-PCR showed that eight *A. baumannii* isolates proved to belong to the same cluster (Dice coefficient > 80%) and two of those isolates that represented the same sequence type (ST) according to Multilocus Sequence Typing (MLST) technique were selected in this study (16). *A. baumannii* isolate Ac56 is from 1996, classified as MDR and susceptible MEM and PMB. On the other hand, *A. baumannii* isolate Ac576 (belonging to the same cluster, ST and CC as Ac56 isolate) is from 2011 was extensively drug-resistant (XDR) and resistant to both MEM and PMB. Additionally, from that isolate the co-existence of *ISAbal1/bla<sub>OXA-23</sub>*-like genes was detected from that isolate using multiplex PCR reaction (17). Both isolates were collected from tracheal secretion of inpatients in the same institution. The susceptibility profile and molecular characteristics of isolates are described in the Figure 1.



**Figure 1. ERIC-PCR dendrogram, susceptibility profile and presence of resistance mechanisms in the selected *A. baumannii* isolates.** CC – Clonal Complex; ST - Sequence Typing; TZP – Piperacillin-tazobactam; SAM – Ampicillin-sulbactam; CAZ – Ceftazidime; FEP – Cefepime; IPM – Imipenem; MEM – Meropenem; CIP – Ciprofloxacin; LEV – Levofloxacin; AK – Amikacin; CN – Gentamicin; SXT – Trimethoprim-sulfamethoxazole; PMB – Polymyxin B; TGC – Tigecycline; MIC – Minimum inhibitory concentration; MDR – multidrug-resistant and XDR – extensively drug-resistant as defined by Magiorakos *et al.* (18); presence of the resistance mechanism (+); absence of the resistance mechanism (-). CLSI 2019 *A. baumannii* breakpoints: MEM: S, ≤2 mg/L; intermediate, 4 mg/L; R, ≥8 mg/L; and PMB: S, ≤2 mg/L; R, ≥4 mg/L.

This study was evaluated and approved by the Human Ethics Committee of the State University of Maringá (COPEP, parecer nº 621/2011).

## 2.2. MIC and MPC measurements of PMB alone and in combination with MEM by agar dilution

The MIC and MPC for PMB and MEM were based on the method reported by Zhao and Drlica (19) with slight modification. Briefly, the final inoculum of approximately  $10^4$  CFU/ml and  $10^7$  CFU/ml of each tested bacteria were delivered with a Steers replicator onto agar plates containing a two-fold serial dilution of antimicrobials, simultaneously. The PMB and MEM concentrations tested ranged from 0.25 to 256 mg/L and 2 to 512 mg/L, respectively. The MIC values were determined in 16-20h and the MPC values at 24 and 48h intervals. The interpretation of the sensitivity was performed using the breakpoint values for *A. baumannii* according to the CLSI (20).

MPC was defined as the lowest antibiotic concentration that prevented the visible growth of mutant colonies (21).

## 2.3. MSW interpretation criteria

Bacterial growth that occurs at antimicrobial concentrations greater than MIC for that same isolate when tested with an increased inoculum, i.e. inoculum used in the MPC method. This is a generally mutant population that grows in the drug concentration range between MIC and MPC. MPC/MIC ratio lower values express the better ability of antibiotic to restrict selection of resistant mutants (19).

## 2.4. Population pharmacokinetics

The steady state concentration-time profiles of PMB were simulated from population pharmacokinetic (PK) data in 10.000 virtual critically ill patients with demographical characteristics including renal function as previously described by Menegucci *et al.* (22). The population PK model for PMB was a 2-compartment model and the level of protein binding was 58% (23). All PK parameters were assumed to have a log-normal distribution. The simulation of free drug concentration-time profiles were performed using NONMEM 7.3 (ICON, Ellicott Maryland, USA).

## 2.5. PK/PD target indices and Monte Carlo simulation

PK/PD analyses for PMB were carried out for the 10.000 concentration-time profiles and attainment of target PD index were determined using a function in the R language v.3.3.1. The percentage of each dosage interval that free plasma concentration was within the MSW (%T<sub>MSW</sub>) and the percentage of each dosage interval that plasma concentration exceeds the MPC (%T>MPC) were estimated from concentration–time profiles of PMB in various dosing regimens. The PK/PD relationship for PMB as it relates to suppression of resistance has not yet been established.

The dosages tested for PMB were 0.5, 1 or 2 mg/kg given every 12 h [q12h] and 3 mg/kg first dose followed by 0.5 and 1 mg/kg q12h, as 1-h infusion. These dosages are in accordance with those described in package insert or literature.

### 3. RESULTS

Initial MPC values for PMB alone were two- or four-fold higher than the MIC values (Table 2). After the addition of MEM at a concentration of 16 mg/L (data not shown) the MPC decreased from 8 to 0.25 mg/L (five two-fold decrease) for MDR-Ac56 isolate. XDR-Ac576 isolate showed a greater reduction of MPC from 64 to 1 mg/L (six two-fold decrease) with MEM at concentration of 32 mg/L (data not shown). MPC/MIC ratio of PMB plus MEM was lower than one for both isolates.

**Table 2. MICs, MPCs, MPC/MIC ratio and relationships between MPC-based parameters for PMB alone and in combination with MEM against *A. baumannii* isolates.**

Isolates	PMB concentrations in mg/L by agar dilution						Dosage regimens	Monotherapy			Combination		
	Alone			Combination				%T <sub>MSW</sub> <sup>†</sup>	%T <sub>MSW</sub>	%T > MPC <sup>†</sup>			
	MIC	MPC	ratio <sup>a</sup>	MIC	MPC	ratio <sup>a</sup>							
MDR-Ac56	2	8	4	0.25	0.25	0.12	0.5 mg/kg q12h	1.3 ± 4.2	0	77.8 ± 30.3			
							1 mg/kg q12h	11.7 ± 16.2	0	94.4 ± 16.5			
							1.5 mg/kg q12h	26.6 ± 26.2	0	97.6 ± 12.6			
							LD + 0.5 mg/kg q12h	37.6 ± 30.2	0	98.2 ± 9.7			
							LD + 1 mg/kg q12h	44.7 ± 33.1	0	98.9 ± 6.8			
XDR-Ac576	32	64	2	0.5	1	0.03	0.5 mg/kg q12h	NC	28.5 ± 21.5	11.9 ± 15.7			
							1 mg/kg q12h	NC	37.0 ± 22.4	41.7 ± 31.2			
							1.5 mg/kg q12h	NC	25.5 ± 21.0	64.9 ± 31.5			
							LD + 0.5 mg/kg q12h	NC	15.9 ± 22.0	78.3 ± 29.7			
							LD + 1 mg/kg q12h	NC	12.9 ± 23.7	83.1 ± 29.3			

Values reported as mean ± SD.

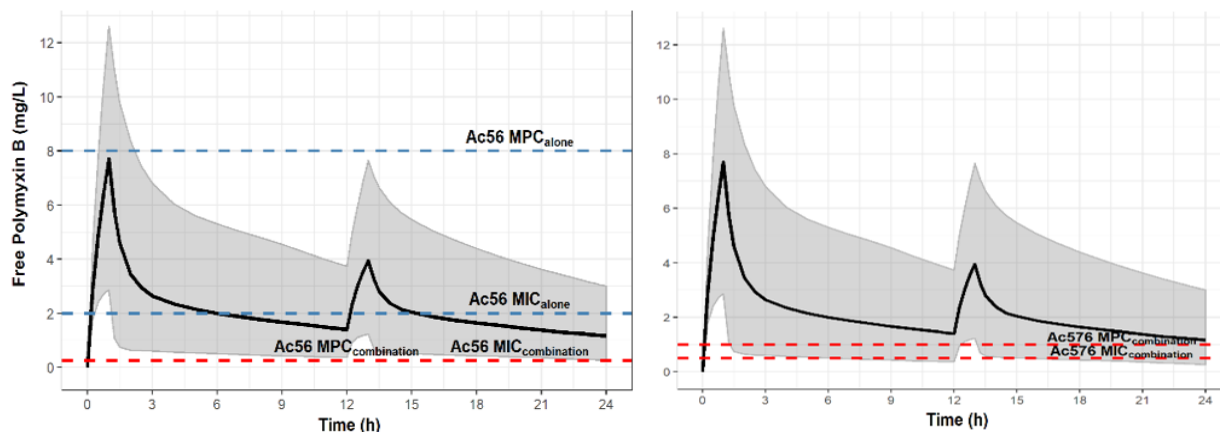
MSW, mutant selection window; MPC, mutant prevention concentration; LD, loading dose of 3.0mg/kg; NC, not computable because PMB MIC is higher than maximum free drug concentration; %T<sub>MSW</sub> is the percentage of each dosage interval that free plasma concentration was within the MSW; %T >MPC is the percentage of each dosage interval that plasma concentration exceeds the MPC. CLSI 2019 *A. baumannii* breakpoints of PMB: S, ≤2 mg/L; R, ≥4 mg/L. Combination is related PMB plus MEM.

<sup>a</sup>MPC/MIC ratio defined as is the ratio of the MPC obtained to the original MIC and express the ability of an antibacterial agent to select resistant mutants.

<sup>†</sup>T<sub>MSW</sub> or T>MPC was calculated as the percentage of the first 24 h.

PK/PD analysis showed that none of the PMB dosage regimens in monotherapy provided plasma concentrations sufficient to inhibit XDR-Ac576 growth (Table 2). While at the same PMB plasma levels, a T<sub>MSW</sub> less than 45% was also observed for MDR-Ac56 isolate (Figure 2). On the other hand, PMB in combination were able to achieve plasma concentrations above the MPC for both isolates in all dosing regimens of PMB.

A loading dose followed by maintenance dose of 0.5 or 1mg/kg q12h resulted in PMB concentrations above the MPC for more than 78% and 83% of the time for XDR-Ac576 isolate, reducing T<sub>MSW</sub> to 15.9% and 12.9%, respectively. T<sub>MSW</sub> equal to 0% of the dosing interval was achieved in all dosage regimens for MDR-Ac56 and T>MPC of 98.2% from loading dose plus 1 mg/kg q12h, as 1-h infusion (Figure 2).



**Figure 2. Simulated median and 95% prediction interval of free drug concentrations in virtual patients against MDR-Ac56 (right) and XDR-Ac576 (left). Dosing regimens of PMB 3.0mg/kg at first dose followed by 1 mg/kg q12h**



with 1-h infusion were simulated. Dashed lines, MIC and MPC of PMB alone in blue and MIC and MPC of PMB in combination with MEM in red.

#### 4. DISCUSSION

Despite recent efforts of pharmaceutical companies in the launch of new antimicrobials in response to World Health Organization (WHO) appeals for treating the most problematic pathogens, 'old' polymyxins continue to be used as last line of defense in treating carbapenem-resistant *A. baumannii* (2). However, polymyxins resistance has also increased over the time (24,25).

The present study demonstrated that the emergence of resistance may occur in both PMB sensitive and resistant *A. baumannii* isolates which have the same clonal origin. The MSW was present in the PMB-sensitive isolate from 1996, in which resistant mutants were selected, generating reduced drug susceptibility. This data is extremely important as it clearly demonstrates that even in isolates sensitive to PMB, it should not be used alone as there is a clear possibility of mutant emergence. Fifteen years later at same institution, a new *A. baumannii* isolate with the same clonal origin, i.e. sequence typing (ST983) and clonal complex (CC1), was collected, but now presenting polymyxins resistance and even carrying carbapenemase genes associated with strong promoter (*ISAb<sub>1</sub> / bla<sub>OXA-23-like</sub>*). The two resistance mechanism resulted in high MICs for carbapenems and polymyxins.

To our knowledge, this is the first report to demonstrate the MSW of PMB in sensitive and resistant isolates with same clonal origin, belonging to an endemic clone (13) and is also the first study to propose PMB dosing regimens based on PK/PD analysis to reduce or even eliminate MSW by combining with MEM.

According to MSW hypothesis, antimicrobial treatment failure and emergence of drug-resistant isolates can be related to the drug concentrations falling inside the window selecting resistant mutants (19). In our study, plasma concentrations of PMB in monotherapy fell within the MSW at least 45% of the dosing interval for MDR-Ac56 isolate (Table 2 and Figure 2), which facilitated the emergence of resistant mutants, though it has shown sensitivity to PMB by agar dilution tests. A recent randomized controlled trial suggested that colistin combined with MEM is not superior to colistin alone for the treatment of *A. baumannii* infections (7). However, our findings demonstrated that the use of PMB in monotherapy may not be appropriate even for isolate sensible to this drug.

Combination therapy has been considered a potential strategy to prevent the emergence of resistant mutants (8, 26). There was a remarkable decrease in the MSW and MPC/MIC ratio of PMB plus MEM, where the ratio was less than one for both isolates (Table 2). Five dosage regimens of PMB were simulated based on MIC and MPC values in combination with MEM obtained from agar dilution method, and the results showed that combination therapy eliminated the MSW (both MIC and MPC values of 0.25 mg/L and  $T_{MSW}$  equal 0%) and with a loading dose followed by maintenance dose was able to achieve 94%  $T > MPC$  preventing mutant subpopulations of MDR-Ac56 isolate. On the other hand, the MSW of PMB was kept even in combination therapy for XDR-Ac576 isolate with  $T_{MSW} > 13\%$  and at least 78%  $T > MPC$  in high doses of PMB (Figure 2). Recent studies have encouraged the use of triple combination of the antibiotics in severe infections caused by extremely- and pan-resistant *A. baumannii* (9, 22), of which has even been cited by Sanford guide to antimicrobial therapy 2019 (27). Our study emphasizes the importance of combination therapy, mainly in clinical isolates PMB and MEM resistant.

Further studies are needed to evaluated the effect of triple-antimicrobial combination on the resistant mutant subpopulations using less toxic drugs as fosfomicin, or even ampicillin-sulbactam. In addition, the predictive ability of PK/PD index correlated with selection of resistance to PMB needs to be investigated.

#### 5. CONCLUSION

For the first time we report the action of PMB alone and in combination against two isolates of *A. baumannii* of the same clonal origin (CC1-ST983): MDR (1996, MEM and PMB susceptible) and XDR (2011, MEM and PMB resistant). The MSW was prevented using PMB plus MEM only for MDR and not for XDR isolate. Thus triple drug-combination could be tested to prevent MSW during therapy against PMB resistant isolates. PK/PD analysis showed that the use of PMB loading dose was more appropriate for MSW inhibition in both MDR and XDR *A. baumannii*.

#### FUNDING

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### REFERENCES

1. Sader HS, Rhomberg PR, Fuhrmeister AS, Mendes RE, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial Resistance Surveillance and New Drug Development. Open forum infectious diseases. 2019 Mar;6(Suppl 1):S5-S13.



2. Lenhard JR, Bulman ZP, Tsuji BT, Kaye KS. Shifting Gears: The Future of Polymyxin Antibiotics. *Antibiotics*. 2019 Apr 12;8(2).
3. Wiese A, Gutschmann T, Seydel U. Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. *Journal of endotoxin research*. 2003;9(2):67-84.
4. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews*. 2008 Jul;21(3):449-65.
5. Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015 May 1;60(9):1295-303.
6. Tsuji BT, Landersdorfer CB, Lenhard JR, Cheah SE, Thamlikitkul V, Rao GG, et al. Paradoxical Effect of Polymyxin B: High Drug Exposure Amplifies Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016 Jul;60(7):3913-20.
7. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious diseases*. 2018 Apr;18(4):391-400.
8. Xu X, Xu L, Yuan G, Wang Y, Qu Y, Zhou M. Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance. *Scientific reports*. 2018 May 8;8(1):7237.
9. Lenhard JR, Smith NM, Bulman ZP, Tao X, Thamlikitkul V, Shin BS, et al. High-Dose Ampicillin-Sulbactam Combinations Combat Polymyxin-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017 Mar;61(3).
10. Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clinical infectious diseases*. 2007 Mar 1;44(5):681-8.
11. Firsov AA, Vostrov SN, Lubenko IY, Drlica K, Portnoy YA, Zinner SH. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003 May;47(5):1604-13.
12. Silbert S, Pfaller M, Hollis R, Barth A, Sader H. Evaluation of Three Molecular Typing Techniques for Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(10):847-851.
13. dos Santos Saalfeld SM, Fukita Viana G, Dias Siqueira VL, Cardoso CL, Botelho Garcia L, Bronharo Tognim MC. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. *The Journal of hospital infection*. 2009 Aug;72(4):365-8.
14. 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. *Letters in applied Microbiology*. 2011 Sep;53(3):374-8.
15. Brondani Moreira RR, Viana GF, de Moraes ACC, de Souza Bastos M, Nishiyama SAB, Dos Anjos Szczerepa MM, et al. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* OXA-23 in old and new intensive care units without transfer of colonized patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2018 Sep;39(9):1135-7.
16. Marini, PVB. Caracterização molecular por Multilocus Sequence Typing (MLST) dos principais clusters de *Acinetobacter baumannii* recuperados nos últimos 20 anos na região norte do Paraná [Licenciatura]. Universidade Estadual de Maringá; 2018.
17. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*. 2006 May;258(1):72-7.
18. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012 Mar;18(3):268-81.
19. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002 Feb 15;185(4):561-5.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. Document M100-S29. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. Document M7-A10. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

22. Menegucci TC, Fedrigo NH, Lodi FG, Albiero J, Nishiyama SAB, Mazucheli J, et al. Pharmacodynamic Effects of Sulbactam/Meropenem/Polymyxin-B Combination Against Extremely Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Using Checkerboard Information. *Microbial drug resistance*. 2019 Jun 19, *in press*.
23. Sandri AM, Landersdorfer CB, Jacob J, Boniatti MM, Dalarosa MG, Falci DR, et al. Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013 Aug;57(4):524-31.
24. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011 Sep;66(9):2070-4.
25. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical microbiology reviews*. 2017 Apr;30(2):557-96.
26. Park KS, Lee JH, Park M, Kim JH, Kim TY, Lee SH. Potential Strategies to Combat Antimicrobial Resistance. *Research Journal of Microbiology*. 2016 11: 153-156.
27. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* 2019. 49<sup>th</sup> edition. Sperryville, VA, USA: Antimicrobial Therapy, Inc., 2019.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; polymyxin B; bacterial resistance.

# DETERMINAÇÃO DE ANFETAMÍNICOS EM CABELO: VALIDAÇÃO ANALÍTICA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (HF-LPME) E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

**Mariana Aparecida Oliveira Madia<sup>1</sup>; Deborah Thais Palma Scanferla<sup>1</sup>; Paula Pessoa Moreira e Souza<sup>1</sup>; Jessica Yuri Sakurada<sup>2</sup>; Erika Bando<sup>3</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4</sup>**

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: mari.madia@hotmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

O Escritório das Nações Unidas para Drogas e Crimes (UNODC) em sua última publicação, relatou que um bilhão de pessoas fizeram uso de algum tipo de substância psicoativa ilícita no ano de 2015. Há forte relação entre o consumo de drogas e a redução do desenvolvimento econômico e social, ocasionando situações de miséria e favorecendo a ocorrência de crimes e disseminação de doenças infecciosas. Segundo UNODC, na América do Sul, álcool e *cannabis* são as drogas de abuso mais utilizadas seguida de anfetaminas e cocaína (1).

Anfetamina é um termo referente a um grupo de estimulantes, que possuem estruturas e propriedades biológicas semelhantes, onde estão inclusos a anfetamina (ANF), metanfetamina (MET) e metilenodioximetanfetamina (MDMA), entre outras. No Brasil a mais conhecida e utilizada é o MDMA, conhecido popularmente como ecstasy (2). Os compostos são derivados simpatomiméticos, possuem atividade tanto no sistema nervoso periférico como no central, entre seus efeitos podem ser citados: supressão de apetite, estimulação do sistema cardiovascular, estimulação locomotora, insônia, euforia e excitação, aumento da disposição, anorexia e em doses elevadas paranóia e pânico (3).

A utilização de drogas de abuso atinge diversos segmentos da sociedade e as análises toxicológicas (ATs) são de extrema relevância para o controle e prevenção do seu uso. Dentro desse contexto sangue e urina são as matrizes biológicas mais utilizadas nas ATs. Entretanto, com o passar dos anos as matrizes alternativas têm apresentado relevância, como o cabelo, devido as suas características para fixação e a capacidade de incorporar analitos, fazendo com que seja possível detectar o consumo durante um grande intervalo de tempo. A análise do cabelo faz parte do cotidiano de laboratórios de toxicologia para a análise forense, monitoramento do consumo, prova de abstinência, ratificação de abuso de substâncias crônicas, abuso sexual com associação de drogas facilitadoras de crime e análise *post mortem* (4-7).

Assim como o cabelo, outras matrizes complexas necessitam de tratamentos prévios, para a eliminação de parte dos seus componentes como, por exemplo, proteínas para que não haja adsorção nas colunas cromatográficas (8). Com o passar dos anos várias técnicas de tratamento prévio foram empregadas para ATs, dentre elas as mais utilizadas são a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS) (9, 10). Há uma nova tendência para busca de técnicas que tenham redução do volume de solvente orgânico, rapidez e praticidade. A microextração em fase líquida (HF-LPME) é amplamente utilizada devido ao seu baixo custo, facilidade de automação e a característica de permitir o contato próximo entre o solvente e amostra, sem perdas dos analitos e sem extração de interferentes da matriz biológica levando a técnicas mais seletivas, sensíveis e precisas (10).

A validação dos métodos analíticos é um importante processo para assegurar a qualidade de ATs em laboratórios analíticos, e é essencial para que os parâmetros do processo estejam de acordo com as especificações exigidas, a fim de demonstrar que a técnica reproduz resultados confiáveis (11). Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como proposta o desenvolvimento de validação para a detecção de anfetaminas e seus derivados em cabelo, por extração em LPME e análise em Cromatógrafo Gasoso, acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM) para implantação no Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, para fins de análise diagnóstica e pesquisa.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, sob o parecer 3.466.244.

### 2.1. Amostras biológicas

Para a realização do estudo, foi utilizado o cabelo como matriz biológica. Amostras de voluntários, que não utilizaram drogas de abuso, foram obtidas para o processo de validação. Todos os voluntários participantes do projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O procedimento de coleta seguiu o guia “Diretrizes sobre o Exame de Drogas em Cabelos e Pelos: Coleta e Análise (v.3)”, publicado pela Sociedade Brasileira de Toxicologia (12).

### 2.2. Modificações na técnica proposta

A técnica utilizada foi proposta por Pantaleão (2012) com modificações. A descontaminação da amostra foi realizada com 2 mL de diclorometano (Panreac ITW Companies, Barcelona, Espanha) em banho de água (Evlab, Londrina – Paraná) a 37 °C por quinze minutos. Os padrões adicionados nas amostras negativas foram: ANF, MET e MDMA. Como padrões internos foram utilizados ANF-d6 e MET-d9, ambos na concentração de 10 ng/mg. Todos os padrões foram obtidos da Cerilliant a Sigma-Aldrich Company, Round Rock, Texas, EUA. Fibras ocas de polipropileno para LPME modelo Q3/2 Accurel® KM (600 µm diâmetro interno, 200 µm parede da fibra e 0.2 µm tamanho de poro) foram obtidas da Membrana (Wuppertal, Germany). Na fase da LPME foi utilizado ultrassom por cinquenta e cinco minutos. A derivatização dos analitos foi realizada na temperatura 90 °C, com o agente derivatizador anidrido trifluoracético, obtido pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) (13).

### 2.3. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás TRACE 1300 GC System acoplado ao detector seletivo de massa quadrupolo (MSD) Thermo Scientific® ISQ Series (Thermo Fisher Scientific, Milão, Itália), com o auxílio do analisador automático AI 1310. A separação dos analitos foi realizada utilizando uma coluna capilar (30 m x 0,25 µm x 0,25 µm) com 5% de fenilpolisilfenilenosiloxano (TR-5MS), fornecido pela Thermo Scientific (Milão, Itália).

Modo de injeção: splitless

Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,7 mL/min.

Temperatura do injetor: 270°C.

Temperatura do detector: 280°C.

Programação da temperatura do forno: 70°C (1 min), 10°C/min até 250°C (8 min).

Tempo total de corrida: 21 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado nas seguintes condições:

Modo de ionização: ionização eletrônica (EI).

Modo de operação: SIM.

Temperatura da fonte de ionização: 220°C

### 2.4. Validação

Os parâmetros contemplados são recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contidos na resolução nº 27, de 17 de maio de 2012, bem como as orientações do UNDOC no “*Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*” e “*Scientific Working Group for Forensic Toxicology*” (12, 14, 15).

#### 2.4.1. Limite de detecção (LOD)

Três amostras diferentes foram analisadas em triplicata contendo concentrações decrescentes dos analitos. O LOD foi estabelecido quando a concentração testada apresentou três vezes o sinal ruído em seu cromatograma.

#### 2.4.2. Limite de quantificação (LOQ)

Três amostras diferentes foram analisadas em triplicata com concentrações dos analitos menores ou iguais ao *cut-off* (16). O LOQ foi determinado quando a concentração analisada demonstrou dez vezes a relação sinal/ruído em seu cromatograma.

#### 2.4.3. Seletividade

Foram analisadas seis amostras sem adição de padrões (branco) e as mesmas amostras com adição de padrões (ANF, MET e MDMA) e padrões internos (ANF-d6 e MET-d9) na concentração do LOQ. A avaliação da seletividade foi realizada, observando-se os tempos de retenção. Quando o cromatograma apresentou o mesmo tempo de retenção dos analitos, foi comparado com as amostras adicionadas com o LOQ. A técnica foi considerada seletiva, quando as amostras branco não apresentavam picos no mesmo tempo

de retenção ou quando tinham, mas estes não apresentavam 20% da área do limite de quantificação e 5% da resposta padrão interno.

#### 2.4.4. Linearidade

Para a verificação do parâmetro linearidade foi construída uma curva de calibração com seis pontos dos analitos ANF, MET e MDMA na faixa de concentração de 0,2 ng/mg a 20 ng/mg, respeitando o valor de *cut-off* (12). As análises foram realizadas em sextuplicata para cada curva de calibração.

#### 2.4.5. Carry over

Para verificar se entre duas análises houve efeito residual, foi analisada uma amostra branco antes do controle alto e três injeções depois do mesmo.

#### 2.4.6. Precisão

O parâmetro precisão foi determinado usando três concentrações (baixa, média e alta) de cada analito. Foram avaliadas a precisão intraensaio, na qual três replicatas foram analisadas no mesmo dia, e interensaio que foi determinada analisando ensaios em três dias diferentes. A precisão é calculada por meio do coeficiente de variação. Valores menores que 15% para controles baixo e 20% para controles alto foram considerados satisfatórios.

#### 2.4.7. Exatidão

A exatidão foi avaliada dentro dos ensaios de precisão com as concentrações baixa, média e alta de cada analito. A exatidão é calculada com base na concentração teórica por meio do erro padrão relativo, onde os valores foram aceitos quando os controles baixo foram menores que  $\pm 15\%$  e os controles altos menores que  $\pm 20\%$ .

### 3. RESULTADOS

O parâmetro limite de detecção foi analisado em concentrações decrescentes dos analitos ANF, MET e MDMA. A concentração que atendeu os pré-requisitos do LOD foi de 0,05 ng/mg, onde foi observado três vezes a relação sinal/ruído. A concentração que atendeu os pré-requisitos do LOQ foi de 0,2 ng/mg, onde foi observado dez vezes a relação sinal/ruído.

No estudo de seletividade, metade das amostras não apresentaram nenhum pico no tempo de retenção do analitos em estudo, o restante foi comparado com amostras adicionadas com a concentração de 0,2 ng/mg e padrão interno. As amostras que foram analisadas por comparação apresentaram pico do tempo de retenção com área menor que 5% da amostra quantificada, sendo assim a técnica foi considerada seletiva.

O estudo da linearidade foi realizado com seis concentrações dos analitos ANF, MET e MDMA (0,2 ng/mg, 0,6 ng/mg, 5, 10, 16 e 20 ng/mg). As concentrações foram adicionadas em amostras negativas. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram maiores que 0,99, apresentando as seguintes equações: ANF:  $r = 0,9969$  ( $y=0,0995x-0,0104$ ); MET:  $r = 0,9987$  ( $y=0,1012x+0,0193$ ); MDMA:  $r = 0,9958$  ( $y=0,1385x-0,0533$ ).

As injeções de amostra branco antes do último ponto da curva e após, demonstraram que a técnica estudada não possui efeitos residuais entre as análises.

Na Figura 1, pode-se observar o cromatograma das amostras negativas com os padrões ANF, MET e MDMA adicionados.

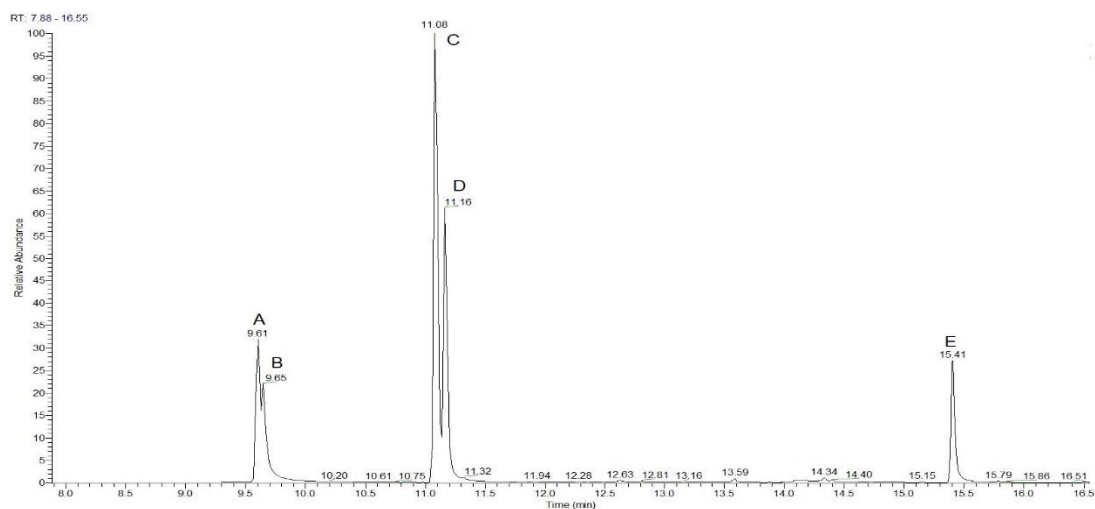


Figura 1. Cromatograma obtido pela análise de cabelo por HF-LPME/CG-EM com adição de padrões na concentração de 5 ng/mg. A: Anfetamina-D6; B: Anfetamina; C: Metanfetamina-D9; D: Metanfetamina; E MDMA.



Os parâmetros precisão e exatidão, obtidos no processo de validação, estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Parâmetros analíticos do método de detecção de derivados anfetamínicos avaliados por LPME/CG-EM\***

	<b>ANF</b>	<b>MET</b>	<b>MDMA</b>
<b>Exatidão (%)</b>			
CB	-13,0	-13,8	-0,05
CM	1,0	-5,7	0,08
CA	3,3	-1,0	-0,04
<b>Precisão Intraensaio (CV%)</b>			
CB	3,4	5,9	4,42
CM	5,0	1,0	6,0
CA	1,1	3,6	2,0
<b>Precisão Interensaio (CV%)</b>			
CB	3,4	5,9	7,6
CM	5,7	4,8	5,7
CA	3,1	3,5	1,9

\*LPME/CG-EM: Microextração em Fase Líquida/Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas.

CV: coeficiente de variação.

ANF: Anfetamina - CB: Controle Baixo: 0,6 ng/mg, CM: Controle Médio: 10 ng/mg, CA: Controle Alto:16 ng/mg.

MET: Metanfetamina - CB: Controle Baixo: 0,6 ng/mg, CM: Controle Médio: 10 ng/mg, CA: Controle Alto:16 ng/mg.

MDMA: Metilenodioximetanfetamina - CB: Controle Baixo: 0,6 ng/mg; CM: Controle Médio: 10 ng/mg; CA: Controle Alto:16 ng/mg.

#### 4. DISCUSSÃO

Limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito em uma matriz que não se pode quantificar, mas sim detectar em um ensaio. Por outro lado, o limite de quantificação (LOQ) é representado pela menor concentração quantificada (14). Orfanidis et al. (2016), em suas análises para determinação de drogas de abuso em cabelo encontrou resultados para o LOD para anfetaminas e seus derivados semelhantes ao do nosso estudo (16). Paulo (2017), em seu estudo para determinação de anfetaminas em cabelo encontrou o mesmo LOQ que o nosso estudo (2). LOD e LOQ obtidos foram satisfatórios, visto que o *cutt-off* estabelecido pelas agências reguladoras é de 0,2 ng/mg (12).

A seletividade permite que o método diferencie e quantifique o analito e padrão interno na presença de outros componentes da amostra, dessa forma as respostas devem ser menores que 20% dos padrões na concentração do LOQ e 5% inferiores a resposta do padrão interno. Os resultados foram inferiores a 5% tanto para os padrões como para padrões internos (11). As análises demonstram que o método proposto reduz interferentes da matriz e da coluna no tempo de retenção dos analitos.

O ensaio da linearidade permite avaliar a capacidade da técnica em fornecer resultados proporcionais à concentração dos padrões nas amostras (14). No presente estudo o coeficiente de correlação foi maior que 0,99, o que permite concluir que o resultado é satisfatório.

O efeito residual ou *carry over* também foi um parâmetro satisfatório, já que nenhum pico foi observado nas análises abaixo e acima da injeção do ponto de 20 ng/mg, indicando que não há interferência entre as análises de amostras diferentes.

A precisão demonstra a capacidade do método em obter proximidade dos resultados obtidos por análises em replicatas, já a exatidão leva em consideração as concentrações teóricas e experimentais. A precisão intraensaio, interensaio e exatidão tiveram resultados dentro da faixa aceitável, dados que corroboram com o estudo de Kwon et al. (2019) que determinaram anfetaminas em cabelo por extração em fase sólida (17).

#### 5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a técnica desenvolvida para a determinação de derivados anfetamínicos em cabelo é eficaz e reprodutível. O método desenvolvido apresentou resultados satisfatórios para todos parâmetros recomendados pelos guias utilizados, trazendo confiabilidade para o uso em rotina e para fins de pesquisa.

#### FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Maurício Yonamine, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela doação de fibras oca de polipropileno, tornando possível a execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. United Nations Office on Drugs and Crime [Internet]. World drug report 2018. Analysis of drug market: opiates, cocaine, cannabis, synthetic drugs; 2018 [Acesso em 5 Ago 2019]. Disponível em: <https://www.unodc.org/wdr2018/>.
2. Paulo BFP. Anfetaminas e bezoilecgnonina em amostras de cabelo por LC-MS/MS. [Dissertação]. Belo Horizonte (BH): Universidade Federal de Minas Gerais; 2017.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale Farmacologia. 7 ed. Brasil: Elsevier; 2011.
4. Silva OA, Yonamine M. Drug abuse among workers in Brazilian regions. Rev Saude Publica. 2004;38(4):552–6.
5. Oliveira CRD. Determinação de canabinóides em cabelo por microextração em fase sólida por headspace e análise por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa. [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade Estadual de São Paulo; 2005.
6. Follador MJD, Yonamine M, Moreau RLDM, Silva OA. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;5;811(1):37-40.
7. Matey JM, Moreno de Simon MD, García-Ruiz C, Montalvo G. A validated GC–MS method for ketamine and norketamine in hair and its use in authentic cases. Forensic Sci Int. 2019;301:447–54.
8. Bordin DCM, Monedeiro FFSS, Campos EG, Alves MNR, Bueno LHP, Martinis BS. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. Scientia Chromatographica. 2015;7(2):125-143.
9. Kim E, Lee J, Choi S, Lim M, Chung H. Analysis of ketamine and norketamine in urine by automatic solid-phase extraction (SPE) and positive ion chemical ionization-gas chromatography-mass spectrometry (PCI–GC–MS). Forensic Sci Int. 2008;174:197–202.
10. Barroso M, Gallardo E, Queiroz JA. The role of liquid-phase microextraction techniques in bioanalysis. Bioanalysis. 2015;7(17):2195-201.
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet]. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos: resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012; 2012 [Acesso em 04 Ago 2019]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012).
12. Sociedade Brasileira de Toxicologia [Internet]. Diretrizes sobre o exame de drogas em cabelos e pêlos: coleta e análise; 2015 [Acesso em 04 Ago 2019]. Disponível em: <https://www.sbtox.org/single-post/2015/1/1/Diretrizes-para-an%C3%A1lise-de-cabelo-Consulta-P%C3%ABblica>.
13. Pantaleão, LN. Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade Estadual de São Paulo; 2012.
14. United Nations Office on Drugs and Crime [Internet]. Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens; 2016 [Acesso em 3 Ago 2019]. Disponível em: [https://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf).
15. Scientific Working Group for Forensic Toxicology [Internet]. Scientific working group for forensic toxicology: standard practices for method validation in forensic toxicology. J Anal Toxicol. 2013;37(7):452–474.
16. Orfanidis A, Mastrogianni O, Koukou A, Psarros G, Gika H, Theodoridis G, et al. A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2017;1047:141–50.
17. Kwon NH, Lee YR, Kim HS, Cheong JC, Kim JY. Hybrid solid-phase extraction for selective determination of methamphetamine and amphetamine in dyed hair by using gas. Molecules. 2019;9;24(13).

**Palavras-chave:** drogas de abuso; anfetaminas; validação analítica.



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Estudos na biologia tecidual cardíaca, intestinal e da reparação óssea

# ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO PLEXO CARDÍACO E DO TECIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO DE CAMUNDONGOS C57BL6 TRANSGÊNICOS PARA A APOLIPOPROTEÍNA CIII HUMANA: RESULTADOS PARCIAIS

Diogo Rodrigues Jimenes<sup>1</sup>; Nilton Rodrigues Teixeira Junior<sup>2</sup>; Jairo Augusto Berti<sup>3</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Educação Física, Laboratório de Fisiologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: diogojimenes@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

A hipertrigliceridemia é uma dislipidemia resultante da elevação dos níveis séricos de lipoproteínas transportadoras de triglicerídeos (TG) que pode ser causada por fatores genéticos e/ou metabólicos. Embora se relacione à obesidade, resistência à insulina e intolerância à glicose, fatores como etilismo, diabetes não controlada, consumo exagerado de carboidratos e sedentarismo também contribuem para esta dislipidemia. Além disso, como associa-se à aterosclerose, é considerada um fator de risco à saúde do coração, predispondo doenças cardiovasculares graves como, por exemplo, doença arterial coronariana (1,2).

Considerando os múltiplos fatores desencadeadores da hipertrigliceridemia e a complexidade de estudos com seres humanos, camundongos geneticamente modificados vêm sendo utilizados em seu estudo. Assim, modelos animais em que os genes relacionados ao perfil das lipoproteínas sanguíneas (LP) são inseridos (transgênicos) ou retirados (*knockout*) são úteis na compreensão do metabolismo lipídico e suas alterações. Dentre tais modelos estão os camundongos transgênicos que superexpressam o gene da apolipoproteína CIII humana (apoCIII) (3).

A glicoproteína apoCIII é uma importante moduladora da produção hepática e remoção periférica de TG pela lipoproteína lipase (LPL). Sua superexpressão pode causar hipertrigliceridemia, principalmente por retardar a remoção dos TG das LP e por diminuir a afinidade das LP ricas em TG, como as LPL ligadas aos glicosaminoglicanos. Além disso, pode diminuir a captação das LP de muito baixa densidade (VLDL) e quilomícrons remanescentes via receptor, prejudicando seu catabolismo e impedindo a recaptção das LP ricas em TG. Por isso, os camundongos tornam-se hipertrigliceridêmicos e com altas concentrações de ácido graxo livre (4,5).

Apesar deste modelo de hipertrigliceridemia estar sendo estudado desde a década de 90 (3), ainda existe muito o que se constatar acerca das alterações morfológicas a ele associadas. Dentre os aspectos morfológicos que merecem ser estudados, o plexo cardíaco e o tecido adiposo epicárdico destacam-se, pois evidências indicam que as dislipidemias podem alterar o sistema vascular cardíaco comprometendo não só sua morfologia e função, mas também sua inervação (6,7).

O plexo cardíaco é um conjunto de estruturas neuronais intrínsecas da musculatura cardíaca localizadas principalmente na região atrial, na emergência dos grandes vasos da base (8). Ele processa informações advindas do sistema nervoso autônomo retransmitindo-as às fibras miocárdicas e sendo, por tanto, nominado sistema nervoso cardíaco intrínseco (SNCI) (9). Estudos têm demonstrado que seus neurônios podem sofrer alterações em função de fatores como idade (10) e doenças como infarto do miocárdio (11) e diabetes (12).

O tecido adiposo epicárdico é de igual modo relevante ao funcionamento cardíaco, pois protege gânglios e nervos autônomos do coração, e regula a vasomotricidade. Além disso, este tecido secreta adiponectinas e adrenomodulinas com importantes efeitos anti-inflamatórios e anti-aterogênicos. Todavia, sua expressão exacerbada (aumento de depósitos de gordura) pode desencadear arritmias cardíacas, doença arterial coronariana e resistência à insulina, podendo ser considerado um fator de risco às doenças cardiovasculares (13,14). Inclusive, em doenças como diabetes, síndrome metabólica e hipertensão arterial, os efeitos de proteção do tecido adiposo epicárdico são superados por sua capacidade de promover disfunção vascular e aterogênese, sendo comum a expansão desta gordura acompanhada de hipóxia tecidual e

infiltração de macrófagos e células T. Tal fato reduz a produção de adipocinas protetoras e aumenta a de citocinas prejudiciais como leptina, resistina, interleucina-6 e TNF- $\alpha$ , gerando um ambiente altamente inflamatório (15).

Diante do exposto, hipotetiza-se que o plexo cardíaco e o tecido adiposo epicárdico possam ser modificados em animais transgênicos neste modelo experimental. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil morfológico, morfométrico e quantitativo do plexo cardíaco, bem como os aspectos morfométricos e histopatológicos do tecido adiposo epicárdico de camundongos transgênicos para a apoCIII humana.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Delineamento experimental**

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; registro nº 6558180517) e pela Comissão Interna de Biossegurança (CTNBio; registro nº 819/2013) da Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizados 24 camundongos machos da linhagem C57BL6 os quais foram distribuídos em 4 grupos (n=6): Animais não transgênicos de 8 e 12 meses de idade como controle (NTG8 e NTG12) e animais das mesmas idades que superexpressavam a apoCIII humana (CIII8 e CIII12), conforme o modelo de hipertrigliceridemia primária.

Após o cruzamento entre animais transgênicos e não transgênicos, a prole heterozigota de machos e fêmeas foi obtida e os animais separados aos 30 dias. Aos 60 dias de vida, sangue caudal foi coletado para genotipagem, a qual consiste na dosagem de triglicerídeos plasmáticos após jejum noturno de 12 horas. Foram considerados transgênicos os animais que apresentarem trigliceridemia maior do que 200 mg/dL e não transgênicos os animais que apresentaram trigliceridemia abaixo de 100 mg/dL (24). A dosagem dos triglicerídeos plasmáticos utilizou Kits colorimétricos (Labtest®) de acordo com as especificações dos fabricantes. Previamente à eutanásia os animais foram pesados em balança de precisão (MICHELETTI®) e anestesiados em câmara apropriada preenchida com fluxo de 100% de isoflurano (Isoforine®), o qual foi mantido por cerca de um minuto, garantindo assim um estado de sedação profunda/inconsciência e não percepção dolorosa.

### **2.2. Processamento histológico do coração**

O coração foi removido, pesado em balança analítica (SHIMADZU®), lavado com solução de PBS (0,1 M; pH 7,4) e fixado em paraformaldeído 4% por 48 horas. Posteriormente, foi submetido à rotina de processamento histológico para emblocamento e corte. O órgão foi infiltrado e incluído em parafina com o ápice voltado para baixo e todos os cortes foram realizados acima do septo atrioventricular, local com maior concentração de gânglios (8).

Cortes transversais semi-seriados de 5  $\mu$ m foram realizados no sentido ápice-base do coração com a ajuda de um micrótomo (Leica RM 2255®) e foram distribuídos em 12 lâminas contendo 5 cortes/lâmina, totalizando assim 60 cortes/camundongo. O intervalo entre os cortes foi de 60 $\mu$ m, tais lâminas foram coradas por meio de três técnicas de coloração: Hematoxilina/Eosina, Giemsa e Picrossirus red.

### **2.3. Análise morfológica, morfométrica e quantitativa do plexo cardíaco**

A análise morfológica considerou as características estruturais das células formadoras do plexo cardíaco. Assim, além de sua localização, aspectos celulares básicos dos neurônios e das células da glia foram descritos em cortes corados em Hematoxilina/Eosina. Também foram descritas as principais características do tecido conjuntivo associado ao plexo por meio da análise dos cortes corados com Picrossírius red em microscópio de luz comum e polarizada (MOTIC®). Assim, foram diferenciadas a birrefringência e a organização das fibras colágenas do tipo I (grossas e mais birrefringentes, predominado nas cores amarela e vermelha) e do tipo III (finas e menos birrefringentes, na coloração esverdeada) (28).

A análise morfométrica considerou a mensuração da área do corpo celular de 100 neurônios do plexo cardíaco por animal. Para tanto, cortes corados pela técnica de Giemsa foram capturados na objetiva de 20x em um microscópio óptico (MOTIC®) equipado com uma câmera associada a um sistema computadorizado de análise de imagem (*Image Pró-Plus 4.0*). A análise quantitativa foi realizada por meio da contagem dos neurônios do plexo cardíaco, por amostragem em 40 campos microscópios por animal, utilizando um microscópio fotônico (MOTIC®) na objetiva de 40X.

### **2.4. Análise morfométrica do tecido adiposo epicárdico**

A análise morfométrica deste tecido considerou a área de 50 adipócitos de 5 imagens não consecutivas (10 adipócitos aleatórios por imagem), totalizando 300 adipócitos/grupo. Foi utilizado microscópio óptico equipado com câmera de vídeo associada a um sistema computadorizado de análise de imagem (*Image Pró-Plus 4.0*).

### **2.5. Análise estatística**

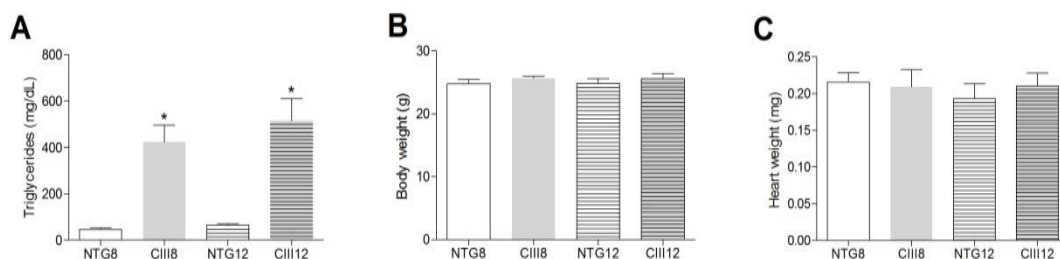
Os dados foram comparados usando o *software* BioEstat 5.4 (Mamirauá®). O teste de D'Agostino Pearson ou Shapiro-Wilk foi realizado para determinar a normalidade dos dados. Variáveis que apresentaram



distribuição aleatória foram avaliadas por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. E variáveis que apresentaram distribuição normal foram avaliadas por meio do teste one-way ANOVA com pós teste de Tukey (*GraphPad Prism 5*®). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

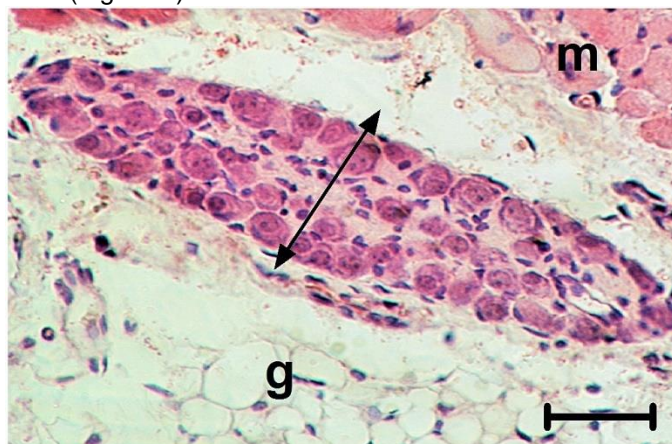
### 3. RESULTADOS

A trigliceridemia aos 60 dias confirmou a subdivisão dos grupos em CIII e NTG, nas diferentes idades analisadas (8 e 12 meses). Os animais transgênicos de 8 meses (CIII8) tiveram os níveis de triglicérides 91,01% maiores em relação aos não transgênicos de mesma idade (NTG8). De igual modo, animais transgênicos de 12 meses (CIII12) tiveram os níveis de triglicérides 92% maiores em relação aos não transgênicos de mesma idade (NTG12) (Figura 1A). As massas corporais e dos corações não foram significativamente diferentes quando os grupos foram comparados (Figura 1B e C).



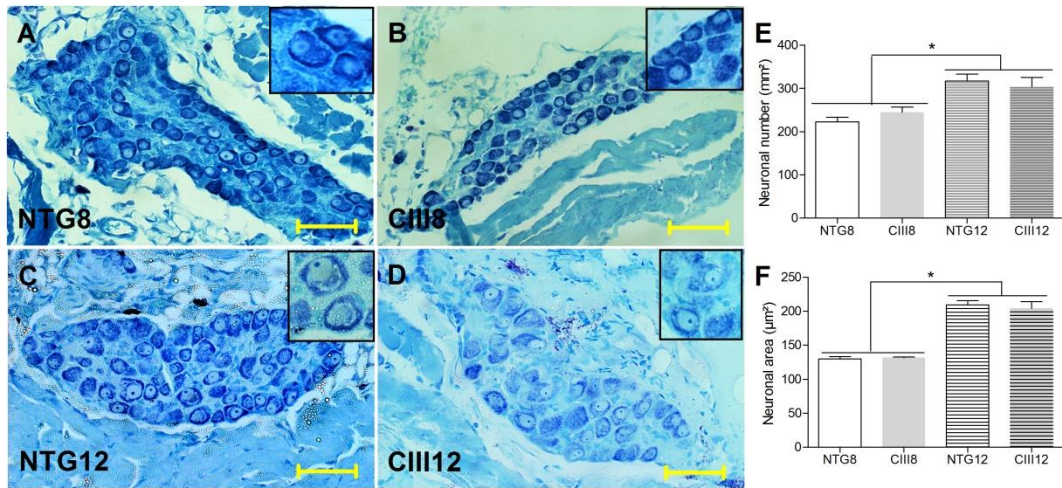
**Figura 1.** Média  $\pm$  desvio padrão de: A. Trigliceridemia (mg/dL). B. Massa corporal. C. Massa do coração. ANOVA *One-way*, seguido pelo pós-teste de Dunn. \* $p < 0,05$  em relação aos respectivos controles.

A coloração com Hematoxilina/Eosina mostrou que os gânglios do plexo cardíaco de todos os grupos analisados localizavam-se adjacentes aos vasos da base do coração, entre o miocárdio e a gordura unilocular com tamanhos e formatos variados. Os corpos neuronais apresentavam formato globular com núcleos descentralizados (inclusive alguns aparentemente binucleados) e as células da glia posicionadas periféricamente aos neurônios (Figura 2).



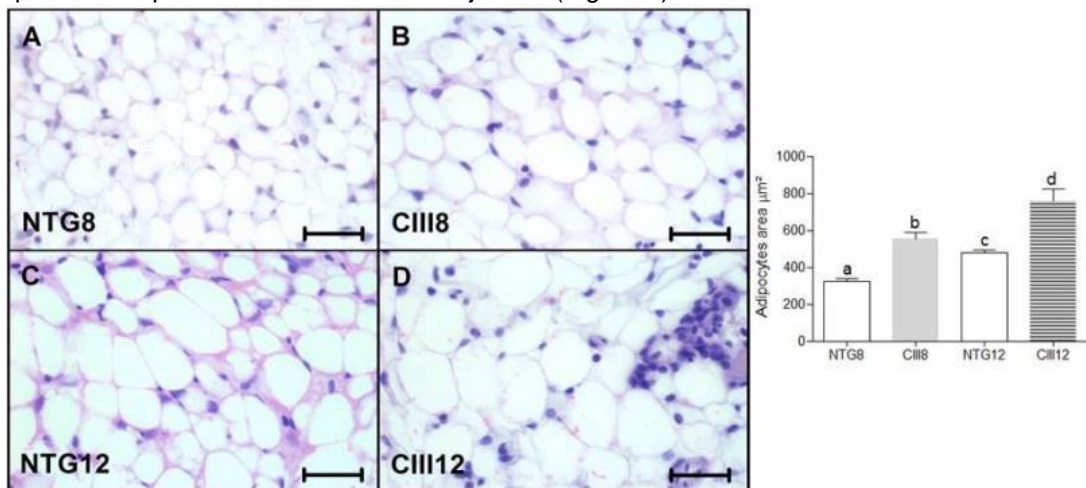
**Figura 2.** Fotomicrografia obtida por meio de lente objetiva de 20x. Corte transversal do coração ao nível da emergência dos vasos da base corado pela técnica de Hematoxilina/Eosina evidenciando gânglio do plexo cardíaco. Seta dupla (gânglio cardíaco); g (tecido adiposo unilocular); m (miocárdio). Barra de calibração: 20 $\mu$ m.

Nossos achados revelaram que a hipertrigliceridemia não modificou a área neuronal e o número de neurônios do plexo cardíaco. Todavia, diferença significativa foi vista quando os grupos foram comparados por idade, uma vez animais mais velhos apresentaram neurônios com maior área e em maior número quando comparados aos animais mais jovens (Figura 3).



**Figura 3.** Fotomicrografias obtidas por meio de lente objetiva de 20x. Corte transversal do coração corado pela técnica de Giemsa evidenciando os gânglios e os neurônios do plexo cardíaco dos grupos NTG8 (A), CIII8 (B), NTG12 (C) e CIII12 (D). E: Gráfico de colunas do número de neurônios. F: Áreas do corpo celular de neurônios. Destaque: tamanho neuronal. Os valores referem-se à média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA *One-way*, seguido pelo pós-teste de Dunn\* $p < 0,05$ . Barra de calibração: 20µm.

Nossos achados revelaram que a hipertrigliceridemia modificou a área dos adipócitos entre os grupos não transgênicos e transgênicos nas diferentes idades. Adicionalmente, diferença significativa foi vista quando os grupos foram comparados por idade, uma vez que os adipócitos de animais mais velhos apresentaram área maior quando comparados aos animais mais jovens (Figura 6).



**Figura 4.** Fotomicrografias obtidas por meio de lente objetiva de 40X de cortes transversais do coração corados por Hematoxilina/Eosina mostrando os adipócitos do tecido adiposo epicárdico dos grupos NTG8 (A), CIII8 (B), NTG12 (C) e CIII12 (D). E: Porcentagem de infiltrados inflamatórios. Os valores referem-se à média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA *One-way*, seguido pelo pós-teste de Dunn. a, b, c, e d:  $p < 0,05$ .

#### 4. DISCUSSÃO

As análises bioquímicas mostraram diferença significativa quanto aos níveis plasmáticos de triglicerídeos dos animais transgênicos em comparação aos não transgênicos. Resultados semelhantes foram observados por Paiva et al. (16) ao estudarem a superexpressão da apoCIII em camundongos. A trigliceridemia dos animais transgênicos deste estudo não levou a variações de massa corporal nem cardíaca evidenciando adaptação orgânica a esta condição. Alberici et al. (17) com o mesmo modelo experimental, também não encontraram diferença.

A análise morfológica mostrou-se em concordância com a literatura atual uma vez que os neurônios apresentaram formato circular ou ovalado, e os gânglios do plexo cardíaco foram localizados predominantes no tecido atrial em meio ao acúmulo de tecido adiposo da região dos grandes vasos da base em todos os grupos. A maioria dos gânglios cardíacos de camundongos encontra-se na base do coração, na emergência das veias pulmonares e, de maneira independente da espécie, sempre localizados em maior abundância no tecido atrial próximos aos vasos (18).

O presente estudo mostrou que a hipertrigliceridemia não alterou quantitativamente a população dos neurônios do plexo cardíaco e sua área do corpo celular, embora tenha havido variação em relação aos mesmos fatores quando a idade foi considerada. Semelhante ao nosso achado, (19) foi identificada que a quantidade de neurônios cardíacos aumenta consideravelmente em animais mais velhos, para estes autores, a diferenciação de células precursoras imaturas em neurônios poderia ser uma possível explicação para o aumento de sua quantidade, pois estudos mostram neurogênese na medula espinal de ratos. Todavia, quando tais autores estudaram posteriormente a influência de doenças sobre esta quantificação, viram que há diminuição significativa no número destas células em animais diabéticos e hiperglicêmicos (20). Ademais, vários estudos corroboram ao nosso no sentido de explicar a influência da idade sobre a área neuronal (21,22). A análise morfométrica dos adipócitos revelou que tanto a hipertrigliceridemia quanto a idade aumentaram significativamente a área destas células, os mesmos resultados foram obtidos nos modelos experimentais de Salerno et al. (2007) e Raposo et al. (2015), que correlacionaram tais achados ao fato da superexpressão da apoCIII aumentar a massa de tecido adiposo e diminuir a lipólise basal dos adipócitos favorecendo o aumento da adiposidade (23,24).

Embora não tenham sido encontrados estudos específicos correlacionando idade à área dos adipócitos do tecido epicárdico, em outras regiões (inguinal, perigonadal e retro peritoneal) houve aumento da área destas células em animais mais velhos (25). No entanto, foi constatada diminuição da área dos adipócitos das regiões retro peritoneal, mesentérica e epididimal com a idade (26).

## 5. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados mostraram que a superexpressão da apoCIII não exerceu influência morfológica e quantitativa nos neurônios do plexo cardíaco, porém a idade foi capaz de aumentar a área dos mesmos bem como em sua quantidade. A superexpressão da apoCIII causou aumento dos adipócitos, favorecendo o recrutamento de células inflamatórias nesse tecido.

## FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## REFERÊNCIAS

1. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(20):2292-2333.
2. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Soc Bras de Cardiol*. 2017;109(2):1-92.
3. Ito Y, Arzolan N, O'connel A, Walsh A, Breslow JL. Hypertriglyceridemia as a result of human apolipoprotein C-III gene expression in transgenic mice. *Science*. 1990;249(4970):790-3.
4. Sacks FM. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apolipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(1):56-63.
5. Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS. Chylomicronemia due to apolipoprotein C-III overexpression in apolipoprotein E-null mice: apolipoprotein C- III-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apoE. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2672-81.
6. Olivieri O, Martinelli N, Girelli D, Pizzolo F, Friso S, Beltrame F, et al. Apolipoprotein C-III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced plasma thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2016;8(3):463-71.
7. Yingchun H, Yahong M, Jiangping W, Xiaokui H, Xiaohong Z. Increased inflammation, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in endothelial and macrophage cells exacerbate atherosclerosis in ApoCIII transgenic mice. *Lipids in health and disease*. 2018. doi:10.1186/s12944-018-0867-5. PubMed PMID: 30223835; PubMed Central PMCID: PMC6142424.
8. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart Rhythm*. 2011;8(3):448-54.
9. Zarzoso M, Ryseivate K, Milsten ML, Calvo, CJ, Kean AC, Atienza, et al. Nerves projecting from the intrinsic cardiac ganglia of the pulmonary veins modulate sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovascular research*. 2013;99(3):566-75.
10. Jurgaitiene R, Pauziene N, Vidmantas A, Zurauskas E. Morphometry study of age-related changes in the human intracardiac ganglia. *Medicina (kaunas)*. 2004;40(6):574-81.
11. Hardwick JC, Beamont E, Ardell JL, Southerland M. Dynamic remodeling of the guinea pig intrinsic cardiac plexus induced by chronic myocardial infarction. *Auton Neurosc*. 2013;181:4-12.
12. Menard CE, Durston M, Zhrebetskaya E, Freed D, Glazner GW, Gangohang T, et al. Temporal dystrophic remodeling within the intrinsic cardiac nervous system of the streptozotocin-induced diabetic rat model.



- Acta Neuropathol Commun. 2014. doi:10.1186/2051-5960-2-60. PubMed PMID: 24894521; PubMed Central PMCID: PMC4229951.
13. Sacks HS, Fain JN. Human epicardial fat: what is new and what is missing? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38(12):879–87.
  14. Narumi T, Watanabe T, Iwayama T, Kadowaki S, Otaki Y, Honda Y, et al. Increased epicardial adipose tissue volume predicts insulin resistance and coronary artery disease in non-obese subjects without metabolic syndrome. *IJC Metab Endocr.* 2014;3:14-9.
  15. Rajani R. Epicardial adipose tissue: A simple marker of obesity or a complex mediator of cardiovascular disease? *Heart Metab.* 2014;63(13):13-7.
  16. Paiva AA, Raposo HF, Wanschel AC, Nardelli TR, Oliveira HC. Apolipoprotein CIII overexpression-induced hypertriglyceridemia increases nonalcoholic fatty liver disease in association with inflammation and cell death. *Oxid Med Cell Longev.* 2017. doi:10.1155/2017/1838679. PubMed PMID: 28163820; PubMed Central PMCID: PMC5259655.
  17. Alberici LC, Oliveira HCF, Patricio PR, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Hyperlipidemic mice present enhanced catabolism and higher mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Gastroenterology.* 2006;131(4):1228-34.
  18. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart Rhythm.* 2011;8(3):448–54.
  19. Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH. Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. *Annals of Anatomy.* 2003;185(5):449-59.
  20. Batulevicius D, Frese T, Peschke E, Pauza DH, Batuleviciene V. Remodelling of the intracardiac ganglia in diabetic Goto-Kakizaki rats: an anatomical study. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12(1):450-9.
  21. Pauza DH, Pauziene N, Pakeltyte G, Stropus R. Comparative quantitative study of the intrinsic cardiac ganglia and neurons in the rat, guinea pig, dog and human as revealed by histochemical staining for acetylcholinesterase. *Ann Anat.* 2002;184(2):125-36.
  22. Jurgaitiene R, Pauziene N, Vidmantas A, Zurauskas E. Morphometry study of age-related changes in the human intracardiac ganglia. *Medicina (Kaunas).* 2004;40(6):574-81.
  23. Salerno AG, Silva TR, Amaral MEC, Alberici LC, Bonfleur ML, Patrício PR, et al. Overexpression of apolipoprotein CIII increases and CETP reverses diet-induced obesity in transgenic mice. *Int J Obes.* 2007;31(10):1586–95.
  24. Raposo HF, Adriene A, Paiva LS. Apolipoprotein CIII overexpression exacerbates diet-induced obesity due to adipose tissue higher exogenous lipid uptake and retention and lower lipolysis rates. *Nutr Metab.* 2015;12(61):8-10.
  25. Gonçalves LF, Machado QT, Castro-Pinheiro C, Souza NG, Oliveira JK, Santos CF. Ageing is associated with brown adipose tissue remodelling and loss of white fat browning in female C57BL/6 mice. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(2):100-8.
  26. Sackman-Sala L, Berryman ED, Lubbers ER, Zangh H, Vesel CB, Troike KM, et al. Age-related and depot-specific changes in white adipose tissue of growth hormone receptor-null mice. *J Gerontol A Biol Sc Med Sci.* 2014;69(1):34–43.

**Palavras-chave:** triglicerídeos; coração; gordura.

# PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS COM DEFEITO CRÍTICO UTILIZANDO SCAFFOLDS DE HIDROXIAPATITA- $\beta$ -TRICÁLCICO FOSFATO ( $\beta$ CP) COM CURCUMINA.

Jéssica Naiara Gimenez Noronha<sup>1</sup>; Gabriela de Castro Prado<sup>2</sup>; Cecília Valente Rodrigues Truite<sup>2</sup>; Luzmarina Hernandez<sup>3</sup>.

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

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós Graduação (Doutorado), Programa de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: jessicangnoronha@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais não vivos, tradicionais, estão enfrentando desafios: desde o simples reparo da forma física até a regeneração de um tecido ou órgão vivo, de feridas cirúrgicas em grande escala a reparos minimamente invasivos. Uma fronteira promissora nesta área de desenvolvimento envolve o aproveitamento da capacidade natural do corpo para se regenerar, especialmente para dotar os biomateriais com a função de induzir a regeneração de tecidos ou órgãos (1).

Os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta regenerativa adequada dos mesmos (2). As cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas constituídas de hidroxiapatita (HAp)  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  e  $\beta$  fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$  melhor tem mostrado bioperformance no corpo vivo do que a hidroxiapatita pura (3). Individualmente estas duas substâncias apresentam boas propriedades: a HAp proporciona um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação dos osteoblastos e o  $\beta$ TCP fornece íons cálcio e fósforo, úteis para a diferenciação e maturação dos osteoblastos; ambos são capazes de estimular a formação de osso novo. Quando estas duas substâncias são associadas, formam uma cerâmica bifásica denominada fosfato de cálcio bifásico (BCP), e podem formar osso novo em menos tempo (3). A cerâmica bifásica é biologicamente mais ativa que a HAp pura. A principal desvantagem dos BCPs é que quando são empregadas como arcações, são muito frágeis e são reabsorvidos muito lentamente, entretanto podem ser associados com outros materiais mais resistentes (4).

As cerâmicas de fosfato de cálcio também apresentam a vantagem de se associarem substâncias naturais, usadas como agentes estimuladores de regeneração óssea (5). Estes autores demonstraram que a curcumina, de forma similar ao fator de crescimento BMP (*proteína morfogenética óssea*), tem a capacidade de induzir a diferenciação dos osteoblastos via expressão do ATF6 (fator de transcrição ativado 6) e aumentar a expressão de osteocalcina. A curcumina, o principal componente ativo derivado de raízes do açafrão (*Curcuma longa* L.) é um dos componentes naturais mais estudados devido à sua multiplicidade de atividades terapêuticas e propriedades medicinais (6). É um polifenol hidrofóbico de cor amarela, composto por uma mistura de três curcuminoídeos: curcumina, demethoxycurcumin e bisdemetoxicurcumin (7,8). Vários estudos clínicos e pré clínicos mostram que a curcumina possui atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anti-artrítica, cicatrizante e anti-carcinogênica (6,9,10,11). Em nível celular, a curcumina regula muitos alvos moleculares, incluindo vários fatores de transcrição, tais como o fator nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), fatores de crescimento como TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento tumoral - $\beta$ 1), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e citocinas como IL1, IL2 (interleucinas) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) (10).

O NF- $\kappa\beta$  está envolvido no processo de remodelação óssea, o que sugere que a curcumina exerce algum efeito sobre o sistema esquelético (9). A administração oral de curcumina inibe a degradação da matriz óssea induzida por osteoclastos em modelo de rato diabético dependente de insulina (12). Também preveniu a osteoclastogênese ao inibir o NF- $\kappa\beta$  em células RAW 264.7 (13). Outro estudo mostrou 50% de diminuição da proliferação de células de osteossarcoma MG-63, mas aumentou em 80% a viabilidade de células osteoblásticas saudáveis após o tratamento com 10 $\mu$ M de curcumina (14).



Considerando as propriedades individuais do BCP e da curcumina, e a necessidade de desenvolvimento de novos materiais para uma melhor reparação óssea, o objetivo deste trabalho foi promover o desenvolvimento de um arcabouço a base de fosfato de cálcio e curcumina para avaliar o potencial osteogênico deste biomaterial *in vivo*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Preparação e produção dos *Scaffolds*

Para a obtenção do BCP foram utilizados ossos de peixe do gênero *Tilapia* subfamília *Pseudocrenilabrinae*.

Os ossos foram limpos para remoção dos tecidos moles, secos ao ar e então calcinados por 8h a 900°C. O material resultante desse processo é a biocerâmica, composta pelas fases hidroxiapatita (HAp) e beta-fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Após a calcinação, o material foi moído por 8h a 300 r.p.m. em moinho planetário (Retsch® PM 100, Haan, Alemanha) (15). A produção dos suportes macroporosos (*scaffolds*) foi realizada utilizando aglomerados esféricos de lactose monohidratada *SuperTab® SD* (DFE pharma, Goch, Alemanha), como elemento espaçador, com diâmetro entre 150 e 250µm.

O pó de BCP (com lactose) foi conformado uniaxialmente em uma matriz rígida de aço-ferramenta a 450MPa em uma prensa hidráulica (PHP, Metal PEM, Maringá, Brasil). As amostras conformadas em disco com dimensões de 8mm de diâmetro e 2 a 3mm de espessura, foram sinterizadas em um forno tubular com temperatura entre 900 a 1300°C por 2h, em atmosfera livre. Após a sinterização, as amostras foram lixadas com lixa de grão 400 até a espessura de 1,0mm e, em seguida, foram limpas em ultrassom por 10 minutos em banhos sucessivos de acetona, álcool e água deionizada para eliminar os resíduos resultantes da sinterização e do lixamento. Os *scaffolds* foram secos em uma mufla à temperatura de 80°C por 24 horas.

A solução de curcumina para impregnação no *scaffold* foi obtida por meio da solubilização do pó de curcumina (Sigma) com álcool 70%, na concentração de 1mg/ml. Cada pastilha foi mergulhada em um volume de 50µL de solução de curcumina. A embebição se deu por capilaridade.

### 2.2. Estudo *in vivo*

Foram utilizados 10 ratos *Wistar*, machos adultos, com peso variando entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Durante todo o período experimental os animais receberam ração (Nuvilab®/Nuvital®, Sogorb®, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá protocolada sob o CEUA nº 3379090218.

Após injeção intramuscular, com uma associação de cloridrato de xilazina 2% (1ml/kg) e cetamina 10% (1ml/kg) na proporção de 1:1, foi realizada a depilação com lâmina da região da cabeça, seguida por antisepsia com iodo tópico. A seguir, foi realizada uma incisão na região da calota craniana, se estendendo da base de uma orelha a outra, transcorrendo transversalmente a calota, e se aprofundando até o periósteo. Para promover a exposição óssea, os tecidos foram descolados com uma espátula *molt*. O defeito ósseo (defeito de tamanho crítico - DTC) foi produzido na calvária utilizando uma broca trefina (Neodent®, Curitiba, Brasil) de 8mm, montada em peça reta (Kavo®, Joinville, Brasil), acoplada a um motor cirúrgico (Branemarck System®) com rotação de 1500 r.p.m. e irrigação abundante com solução fisiológica estéril. O defeito teve 0,8mm de profundidade e 8mm de diâmetro. A seguir os *scaffolds* foram encaixados nos defeitos e os tecidos moles foram reposicionados e suturados. A região recebeu aplicação tópica de iodo, como medida antisséptica local.

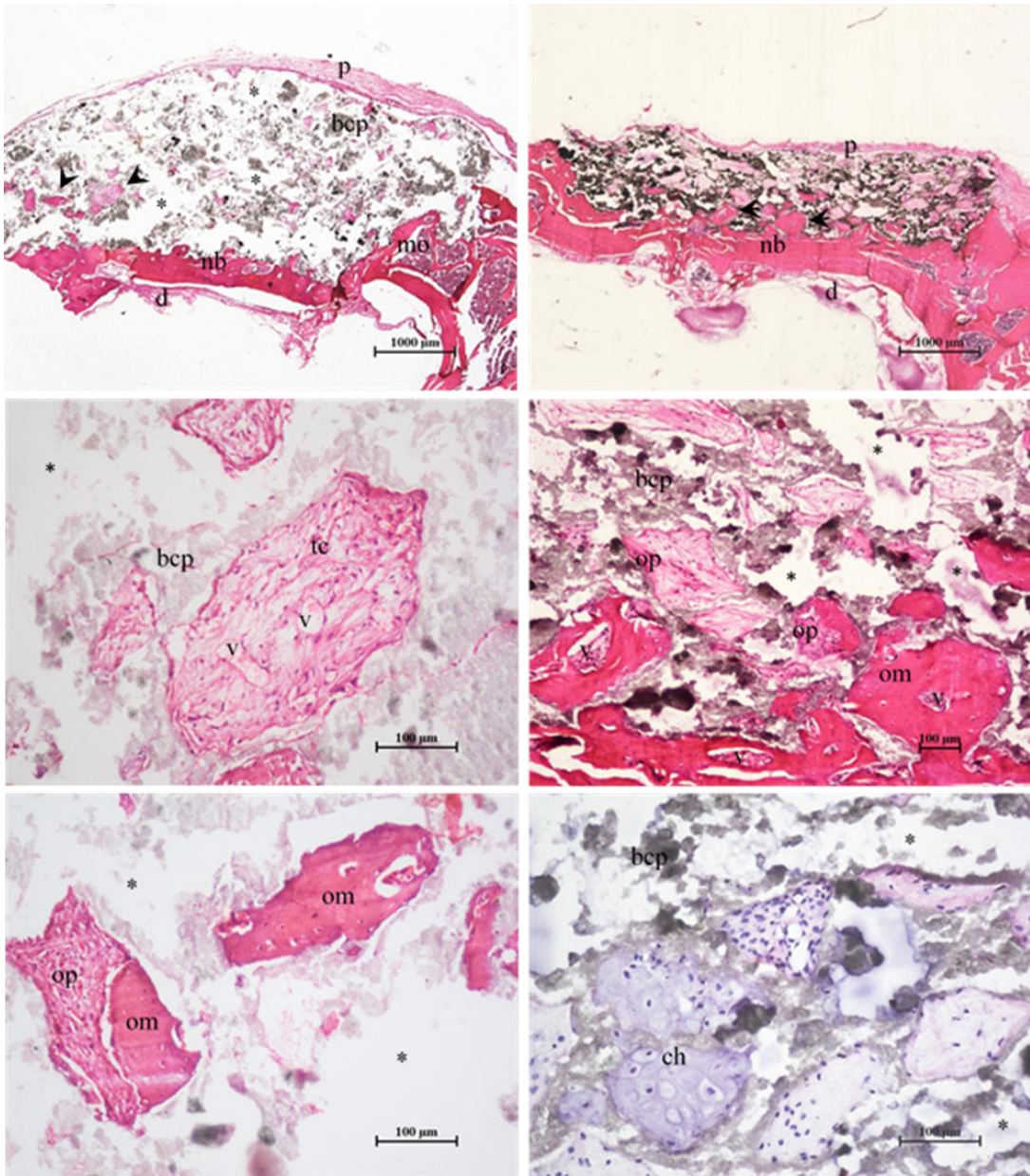
Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de *scaffold*: (1) Controle, disco de BCP e (2) BCP/curcumina. Após um período de observação de 45 dias, os animais (5 animais/grupo) foram mortos por *overdose* de tiopental (120mg/kg).

As amostras da calvária foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% para estudo histológico. Após a fixação foi realizada a descalcificação em EDTA 10% utilizando micro-ondas. Após a desmineralização cada amostra foi dividida ao meio e processada para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semisseriados de 7µm, corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram usadas para o estudo histológico.

## 3. RESULTADOS

Os resultados da avaliação histológica estão ilustrados na Figura 1 que está descrita na legenda. O estudo morfológico dos implantes após 45 dias de observação mostrou que ambos os materiais favoreceram a proliferação e migração de células e vasos para o interior do *scaffold*.

Houve o desenvolvimento de tecido ósseo lamelar no interior dos poros. O período de 45 dias não foi suficiente para promover o preenchimento de todos os poros.



**Figura 1. Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico (DTC) na calvária de ratos *Wistar* 45 dias após implante com discos porosos (*scaffolds*) de BCP (fosfato de cálcio bifásico) (A, C e E) e BCP impregnado com curcumina (B, D e F).**

Em A e B, nas imagens panorâmicas de cortes histológicos obtidos em áreas mais próximas às margens dos defeitos, nota-se que houve crescimento da tábua óssea (nb) ao longo de toda a base do disco. Esta é a face em contato com a dura-máter (d). As cabeças de seta indicam poros preenchidos com osso. Em (C), destaque para um poro preenchido com tecido conjuntivo (tc) celularizado e vascularizado (v). Em (D e E), observa-se poros preenchidos por tecido ósseo primário (op) e tecido ósseo maduro (om) nos *scaffolds*. Em (F) destacam-se poros com cartilagem hialina (ch). Coloração H&E. Legenda: cabeça de seta: poros com osso; p= periosteio; d= dura-máter; nb= osso novo; bcp= fosfato de cálcio bifásico; mo= medula óssea; \* =poro; tc= tecido conjuntivo; v= vaso sanguíneo; op=tecido ósseo primário; om= osso maduro (lamelar); ch= cartilagem hialina.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a regeneração óssea de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos após implante de *scaffolds* de BCP impregnados com curcumina.

Os DTCs são defeitos que só regeneram por completo com o auxílio de biomateriais (16,17). A regeneração de defeitos ósseos circulares na calvária, ocorre em maior frequência a partir das margens ósseas intactas, entretanto, pode haver formação óssea a partir da diferenciação em osteoblastos, de células indiferenciadas localizadas na dura-máter, dando origem a ilhotas ósseas (18). O periosteio também representa uma fonte de células osteogênicas e estudos anteriores mostraram o desenvolvimento de blastemas ósseos imunorreativos para osteocalcina em DTCs preenchidos com implantes não porosos de BCP/Nb2O5 (19). Portanto, a calvária representa um bom modelo para o estudo da regeneração óssea

porque o perióstio e a dura-máter representam uma fonte de células osteogênicas.

A HAp é conhecida por ser um biomaterial cujas propriedades favorecem a formação óssea, por ter uma composição muito parecida com o osso natural. *In vivo*, a HAp sofre absorção lenta – 1 a 2% ao ano (3,20), por sua vez, o  $\beta$ -TCP é reabsorvido rapidamente, de modo que a combinação desses dois materiais proporciona melhor bioperformance, com produção óssea mais rápida e em menor tempo (3,21).

Neste estudo, após 45 dias houve a migração de células e vasos para o *scaffold* e a formação de uma matriz frouxa no interior dos poros. Em alguns poros observou-se a formação de osso maduro, porém, a maioria dos poros ou era preenchido por tecido conjuntivo ou osteóide. Neste estudo, os poros dos implantes de ambos os grupos foram habitados por células e matriz vascularizada semelhante àquela descrita por Pasquinelli (22). Não houve a regeneração completa do defeito após 45 dias.

A impregnação do BCP com curcumina aparentemente não estimulou a regeneração óssea, em comparação com os implantes de BCP puro. Neste período, a característica que se destacou foi a maior frequência de poros preenchidos com cartilagem hialina, caracterizando a formação óssea do tipo endocondral, que não é típica na calota craniana, cujos ossos se desenvolvem por ossificação intramembranosa (23).

Mesmo sendo um regulador natural da osteogênese a curcumina atua como um inibidor da angiogênese (24,25), por meio de vários mecanismos, entre eles, mediando os níveis de metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) (26), regulando negativamente a expressão de VEGF e bloqueando a angiogênese induzida por hipóxia (27). A ossificação endocondral em locais onde naturalmente ocorreria ossificação intramembranosa pode ser consequência de baixos níveis de oxigênio, portanto, é possível que a formação de cartilagem hialina em alguns poros tenha sido estimulada por uma inibição da angiogênese pela curcumina.

## 5. CONCLUSÃO

O arcabouço de BCP e BCP impregnado com curcumina desenvolvido favoreceu a proliferação e migração de células osteogênicas e vasos sanguíneos, e permitiu o desenvolvimento de tecido ósseo maduro em seus poros.

O período de tempo avaliado (45 dias) não foi suficiente para promover o total preenchimento do defeito ósseo.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

1. Tang Z, Li X, Tan Y, Fan H, Zhang X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regen Biomater*. 2018;5(1):43–59.
2. Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR AO. S 1,7 S 1,7 S. *Quim Nova*. 2000;23(4):518–22.
3. Liu B, Lun D. Current application of  $\beta$ -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. *Orthop Surg*. 2012;4(3):139–44.
4. Arifin A, Sulong AB, Muhamad N, Syarif J, Ramli MI. Material processing of hydroxyapatite and titanium alloy (HA/Ti) composite as implant materials using powder metallurgy: A review. *Mater Des*. 2014;55:165–75.
5. Song G, Habibovic P, Bao C, Hu J, van Blitterswijk CA, Yuan H, et al. The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials*. 2013;34(9):2167–76.
6. Parize AL, Stulzer HK, Laranjeira MCM, Da Costa Brighente IM, De Souza TCR. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. *Quim Nova*. 2012;35(6):1127–32.
7. Shehzad A, Park JW, Lee J, Lee YS. Curcumin induces radiosensitivity of in vitro and in vivo cancer models by modulating pre-mRNA processing factor 4 (Prp4). *Chem Biol Interact*. 2013;206(2):394–402.
8. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci*. 2006;78(18):2081–7.
9. Rohanzadeh R, Deng Y, Verron E. Therapeutic actions of curcumin in bone disorders. *Bonekey Rep*. 2016;5(March):1–7.
10. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases.



Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(1):40–59.

11. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. J Photochem Photobiol C Photochem Rev. 2009;10(2):81–95.
12. French DL, Muir JM, Webber CE. The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: An assessment of the bone sparing effects of curcumin. Phytomedicine. 2008;15(12):1069–78.
13. Kim SJ. Curcumin suppresses the production of interleukin-6 in Prevotella intermedia lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. J Periodontal Implant Sci. 2011;41(3):157–63.
14. Yu D, An F, He X, Cao X. Curcumin inhibits the proliferation and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by regulating miR-138. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(11):14946–52.
15. Weinand WR. Wilson Ricardo Weinand. 2009;211.
16. Harvey EJ, Martineau PA, Lansdowne JL, Moriarty TF, Richards RG, Giannoudis P V., et al. Preclinical animal models in trauma research. J Orthop Trauma. 2011;25(8):488–93.
17. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. Lab Anim. 2011;45(1):14–24.
18. Kyiochi Jr H. Estudo Ex Vivo da cerâmica bifásica composta de hidroxiapatita-beta fosfato tricálcico (HA -  $\beta$ -TCP) e pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) como biomaterial empregado para o reparo ósseo em defeitos de calvária. 2013.
19. Candido AG. Compósito baseado em HA- $\beta$ TCP-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. Dissertação. 2014;1–57.
20. Costantino PD. Synthetic biomaterials for soft-tissue augmentation and replacement in the head and neck. Otolaryngol Clin North Am. 1994.
21. Koepp HE, Schorlemmer S, Kessler S, Brenner RE, Claes L, Günther K-P, et al. Biocompatibility and osseointegration of  $\beta$ -TCP: Histomorphological and biomechanical studies in a weight-bearing sheep model. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. 2004;70B(2):209–17.
22. Pasquinelli HBA. Compósito de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio  $\beta$ HAp-PNB na forma de arcaço induz regeneração óssea em defeito de tamanho crítico em calvária de ratos. Dissertação. 2015;1:64.
23. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica Texto Atlas. Histologia Básica. 2004.
24. Bose S, Sarkar N, Banerjee D. Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. Mater Today Chem. 2018;8:110–20.
25. Folkman J, Italiano JE. Angiogenesis. Oncol Infancy Child. 2009;27–40.
26. Crețu E, Trifan A, Miron A. Plant-derived anticancer agents - curcumin in cancer prevention and treatment. Rev medico-chirurgicală a Soc Medici șj Nat din Iași. 2012;116(4):1223–9.
27. Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. Oncol Rep. 2006;

**Palavras-chave:** curcumina; calvária; *scaffolds*.



## EFEITO DO 5-FLUOROURACIL SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS *WISTAR*

**Karile Cristina da Costa<sup>1</sup>; Lilian Catarim Fabiano<sup>1</sup>; Pedro Luiz Zonta de Freitas<sup>1</sup>;  
Mariana Conceição da Silva<sup>2</sup>; Camila Quaglio Neves<sup>3</sup>; Stephanie Carvalho Borges<sup>4</sup>;  
Ana Cristina Breithaupt Faloppa<sup>5</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>6</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Pesquisadora científica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

<sup>6</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença globalizada que causa milhares de mortes. Em 2012 foram registrados 8,2 milhões de óbitos no mundo e estima-se que entre 2018 e 2019 ocorrerão cerca de 600 mil novos casos por ano no Brasil (1). Para o tratamento dessa doença diversos quimioterápicos são utilizados, dentre eles o 5-Fluorouracil (5-FU), introduzido no mercado terapêutico em 1957 e desde então este é amplamente utilizado no tratamento de cânceres sólidos como colorretal, mama, cabeça, pescoço, estômago e pâncreas (2,3). Esse fármaco com ação antimetabólica é considerado um agente específico do ciclo celular, pois interrompe a síntese de DNA e bloqueia a formação de RNA, de forma que sua atividade antineoplásica limita o crescimento e a disseminação de tumores (3,4).

Apesar de seu amplo uso o 5-FU causa grande citotoxicidade promovendo efeitos diversos como diarreia, mucosite, mielossupressão e tromboflebite (3). Além destes, outro importante efeito colateral é a cardiotoxicidade que predispõe sinais e sintomas como angina, arritmia, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, choque cardiogênico, hipotensão arterial, diaforese, dispneia, confusão e morte súbita (5,6). Todavia, pouco se sabe sobre quais as alterações bioquímicas e inflamatórias são responsáveis por gerar estes efeitos colaterais promovidas pelo 5-FU no coração.

Nesse contexto, tendo em vista o amplo uso desse quimioterápico no tratamento de cânceres e a cardiotoxicidade a ele relacionada, este estudo buscou avaliar parâmetros de inflamação e de estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratos *Wistar* tratados com 5-FU. Para tanto, adotou-se a dose clínica utilizada na terapia oncológica.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1. Animais

Os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o parecer nº 4422140918. Foram utilizados 12 ratos machos albinos da linhagem *Wistar* divididos em dois grupos: Controle (n=6; tratados com o veículo - soro fisiológico 0,9%); Tratado (n=6; tratados com 5-FU). Todos os grupos foram tratados por 14 dias por meio de injeção intraperitoneal do fármaco, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1. Esquema de dosagem de 5-FU**

Dia	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	8 <sup>o</sup>	9 <sup>o</sup>	10 <sup>o</sup>	11 <sup>o</sup>	12 <sup>o</sup>	13 <sup>o</sup>	14 <sup>o</sup>	15 <sup>o</sup>
Dose	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	*	6mg/kg	*	6mg/kg	*	6mg/kg	*	6mg/kg	*	15 mg/kg	Eutanásia

O tratamento com 5-FU realizado conforme doses indicadas na bula Flusan® para humanos. \*Dias sem tratamento.

#### 2.2. Coleta do coração

Após a eutanásia por dose letal de Tiopental Sódico® (120 mg/kg de peso corporal) via intraperitoneal, os animais foram submetidos à toracotomia para retirada do coração o qual foi imediatamente pesado em

balança analítica (Shimadzu®) e perfundido com solução de Tampão Fosfato de Sódio (PBS; 0,1 M; pH 7,4) para remoção do sangue em suas câmaras.

Na sequência, os corações foram cortados abaixo do septo atrioventricular e os átrios foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 8 horas, posteriormente armazenados em álcool a 70% para utilização em técnicas histológicas. O restante do miocárdio foi dividido em três porções (direita, central e esquerda). A porção direita destinou-se à dosagem de citocinas, a porção central para a dosagem de nitrito e a porção esquerda para a avaliação de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG) e parâmetros de estresse oxidativo. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos.

### **2.3. Análise de parâmetros inflamatórios**

#### **2.3.1 Dosagem de citocinas**

A dosagem de interleucinas (IL-1 e IL-6), da citocina quimiotática indutora de neutrófilos-1 (CINC-1) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram determinadas pelo kit de ELISA (R&D Systems, Inc., Min. neapolis, MN), conforme especificações do fabricante.

#### **2.3.2. Dosagem dos níveis de nitrito**

Os níveis de nitrito foram mensurados por meio da Reação de Greiss. Para tanto, o tecido cardíaco foi homogeneizado em solução de tampão fosfato de sódio (PBS 0,1M; pH 7,4) e centrifugado por 10 minutos a 3000g. O sobrenadante foi adicionado ao reagente de Greiss e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm, em placas de 96 poços. O cálculo considerou a curva padrão no intervalo de 100µM a 1,56 µM de nitrito de sódio.

#### **2.3.3. Mensuração da atividade das enzimas MPO e NAG**

A amostra foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5) e centrifugada. O precipitado da amostra foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 80mM contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio. Cada amostra foi homogeneizada e centrifugada a 4°C, por 20 minutos a 11.000g. Para MPO, foram adicionados ao sobrenadante uma solução contendo tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,4) e peróxido de hidrogênio a 0,017%, em placa de 96 poços. A reação foi iniciada com tetrametilbenzidina e após 3 minutos de incubação a 37° C foi interrompida com acetato de sódio (1,46 M; pH 3,0). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm. Para NAG, o sobrenadante foi incubado com tampão citrato (5 mM; pH 4,5) na presença do p-nitrofenil-N-acetil-fl-D-glucosaminida (2,24 mM). As microplacas foram incubadas por 60 minutos a 37° C e a reação foi interrompida com tampão glicina (200 mM; pH 10,4). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

### **2.4. Análise dos parâmetros de estresse oxidativo**

#### **2.4.1. Mensuração da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)**

Para ambas as enzimas, o sobrenadante da amostra foi utilizado. Para a SOD, o sobrenadante foi homogeneizado em tampão TRIS\_HCL (200 mM), EDTA (2 mM; pH 6,5) e pirogalol 1 mM foi adicionado. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos e a reação foi interrompida com HCL 1 N. A solução foi centrifugada por 4 minutos a 14.000g e o sobrenadante foi pipetado em microplacas para leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Para a CAT, o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de potássio (0,2 M; pH 6,5) na proporção de 1:10. Em placa de 96 poços, a amostra foi homogeneizada em solução contendo tampão TRIS\_HCL-EDTA (0,1M; pH 8,5), água destilada e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A leitura foi feita a 240 nm.

#### **2.4.2. Quantificação dos grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH)**

Foi adicionado ácido tricloroacético a 12% ao homogenato, sendo homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 9.700g. Tampão Tris (0,4 M; pH 8,9) foi acrescentado à microplaca de 96 poços e a reação teve início com a adição de 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB; 1 mM). Em espectrofotômetro (415 nm) foi realizada a leitura, em até 5 minutos, e os valores obtidos interpolados numa curva padrão de GSH.

#### **2.4.3. Mensuração do nível de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)**

O sobrenadante foi homogeneizado em metanol P.A (1:4) e centrifugado por 20 minutos em 10.000g (4°C). O sobrenadante e o meio reativo contendo xilenol laranja, ácido sulfúrico (25 mM), hidroxitoluenobutilado (BHT; 4 mM) e FeSO<sub>4</sub>NH<sub>4</sub> (250 mM) foram adicionados em placas de 96 poços e incubados no escuro por 30 minutos, à temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 560 nm. A concentração de LOOH foi determinada pelo coeficiente de extinção molar de 4,3 mM 1.cm<sup>-1</sup>.

#### **2.4.4. Ensaio para determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteína foi determinada em placa de 96 poços utilizando o kit "BCA TM *protein assay kit*" ® (PIERCE, BCA *protein*), que adota a albumina bovina como padrão e realizado segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

## 2.5. Análise estatística

Foram realizadas o Test *t* Student em casos de dados paramétricos e teste de Mann Whitney para dados não paramétricos. Para ambas as análises o valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prisma v. 7.00.

## 3. RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta a dosagem de citocinas, das enzimas MPO e NAG, e de nitrito. Os níveis de IL-1 (*p*= 0,0239), IL-6 (*p*= 0,0001) e CINC-1 (*p*= 0,0141) aumentaram em animais tratados com 5-FU. Já as dosagens de VEGF (*p*=0,0182) e nitrito (*p*<0,0001) foram significativamente menores nos animais tratados com o fármaco. Além disso, as atividades das enzimas MPO (*p*=0,0026) e NAG (*p*=0,0052) no tecido cardíaco apresentaram níveis significativamente maiores com o uso de 5-FU se comparado ao grupo controle.

**Tabela 2. Parâmetros inflamatórios**

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO
<b>IL-1</b> (pg/mg proteína)	86,5 ± 21,73,	404,9 ± 87,21*
<b>IL-6</b> (pg/mg proteína)	227,5 ± 47,31	905,1 ± 103,6***
<b>CINC-1</b> (pg/mg proteína)	2,254 ± 0,6115	6,236 ± 1,194*
<b>VEGF</b> (pg/mL)	2765 ± 290,8	1802 ± 146,3*
<b>Nitrito</b> (µM/µL)	145,1 ± 9,702	44,71 ± 9,24***
<b>MPO</b> (mD.O./mg proteína)	0,1481 ± 0,01344	0,2352 ± 0,01736**
<b>NAG</b> (mD.O./mg proteína)	0,7627 ± 0,06811	1,065 ± 0,05078**

Os resultados representam a média ± erro padrão. \*=*p* < 0,05; \*\*=*p* < 0,01; \*\*\*=*p* < 0,001. pg: picogramas; mD.O: Densidade óptica.

As atividades das enzimas SOD (*p*= 0,0175) e CAT (*p*=0,0308) foram significativamente menores no grupo tratado com o quimioterápico, assim como a dosagem de GSH (*p*=0,0392) e de proteína no tecido cardíaco (*p*=0,0357). Por outro lado, a dosagem de LOOH (*p*=0,0129) foi significativamente maior no grupo tratado com 5-FU em comparação com o grupo C (Tabela 3).

**Tabela 3. Parâmetros de estresse oxidativo**

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO
<b>SOD</b> (U SOD/mg proteína)	1,519 ± 0,06432	1,31 ± 0,03826*
<b>CAT</b> (mmol/min/mg proteína)	0,0224 ± 0,002771	0,01359 ± 0,002148*
<b>GSH</b> (µg GSH/g tecido)	336,2 ± 10,23	291,3 ± 15,97*
<b>LOOH</b> (mmol/mg tecido)	44,5 ± 0,9213	50,04 ± 1,587*
<b>Proteína</b> (µg/µL)	4,876 ± 0,35	3,887 ± 0,2095*

Os resultados representam a média ± erro padrão. \*=*p* < 0,05.

## 4. DISCUSSÃO

O estudo das alterações promovidas pelo uso de antineoplásicos tem se tornado relevante tendo em vista a cardiotoxicidade de alguns deles. O conhecimento dos danos ocorridos com o tratamento oncológico pode servir de subsídio para a busca de substâncias capazes de amenizar sua cardiotoxicidade. Nossos estudos mostraram que o uso do 5-FU na dose clínica altera parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no tecido cardíaco.

Dentre os parâmetros inflamatórios algumas interleucinas têm mostrado papel importante na cardiotoxicidade. A inflamação pode ser constatada pelo aumento das interleucinas pró-inflamatórias dentre elas a IL-1 e IL-6 que atuam na regulação da morte celular, recrutam células sanguíneas em tecidos inflamados e alteram a permeabilidade endotelial vascular (7). O aumento dessas citocinas estão relacionadas a danos cardíacos, como na doença arterial coronariana (8) e no infarto agudo do miocárdio (9) pela IL-1β e na progressão da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (10) e na insuficiência cardíaca pela ampliação do níveis de IL-6 (11). Nossos resultados mostraram um aumento destas duas interleucinas. Outro fator pró-inflamatório importante é a CINC-1 que participa da ativação de neutrófilos e apresentou aumento em nosso estudo. A CINC-1 é um polipeptídeo presente em ratos e camundongos, com grande homologia com a IL-8 (12). O tratamento com 5-FU também aumentou a atividade enzimática da NAG e MPO, enzimas produzidas por macrófagos e neutrófilos, respectivamente (13). O aumento da MPO e da CINC-1 podem estar relacionados, uma vez que a CINC-1 é responsável pela ativação dos neutrófilos. Segundo O'Brien (14) o aumento de MPO está relacionado com a doença cardiovascular, grandes quantidades dessa enzima são encontradas em lesões ateroscleróticas, na estenose coronariana, na insuficiência e disfunção cardíaca (15).

Outra molécula analisada e importante para o tratamento do câncer foi o VEGF. Segundo Irie e colaboradores (16) o 5-FU tem caráter antiangiogênico além de seus efeitos antitumorais. Nossos resultados demonstraram uma redução significativa dessa molécula no tecido cardíaco. Esta redução pode estar ligada

a diminuição do NO. O VEGF reduz a mobilização de células progenitoras endoteliais (CEPs) e de acordo com Aicher et al. (17) a diminuição de NO retarda a mobilização de CEPs, podendo prejudicar o reparo vascular, a redução da neovascularização e regeneração cardíaca em pacientes com cardiopatia isquêmica. Apesar de não termos realizado uma medida direta da atividade da óxido nítrico sintase endotelial, a redução do NO pode ter sido um dos fatores responsáveis pela redução do VEGF. Segundo os estudos de Arimura et al. (18) a inativação do NO está envolvido na disfunção endotelial coronariana em casos de insuficiência cardíaca, de acordo com os mesmos autores a inativação dessa molécula está relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tecido cardiovascular.

O estresse oxidativo também está relacionado com doenças cardiovasculares (19). E em nosso estudo ele foi confirmado pelo aumento de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no grupo tratado com 5-FU. O organismo apresenta um sistema antioxidante endógeno que visa protegê-lo contra a peroxidação lipídica e contra a produção de ROS. Dentre as enzimas antioxidantes temos a SOD e a CAT. Em nosso estudo houve redução da atividade destas enzimas além da diminuição da concentração de proteínas. O 5-FU atua diretamente na síntese de DNA e RNA (2,3) o que pode explicar em partes a redução da concentração de proteínas. A atividade da CAT e SOD podem ter reduzido ou pela ação direta do 5-FU ou pela redução na síntese destas proteínas. A SOD é responsável pela eliminação de radicais superóxido através da sua catalisação a peróxido de hidrogênio. E a CAT catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Por terem estas funções dentro da célula, a redução de sua atividade pode ter sido um dos fatores responsáveis pela peroxidação lipídica observada em nosso trabalho. Além disso também encontramos diminuição nos níveis de GSH. Este tripeptídeo possui a função de doar elétrons para enzimas do sistema antioxidante endógeno. E sua redução está relacionado com dano oxidativo. Estudos realizados com o antineoplásico doxorrubicina também encontraram redução da atividade do sistema antioxidante endógeno e peroxidação lipídica no coração (20).

## 5. CONCLUSÃO

O quimioterápico 5-FU utilizado na dose clínica é capaz de alterar parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no tecido cardíaco. Estas alterações podem comprometer o funcionamento normal do coração e a busca de novas substâncias a serem utilizadas durante o tratamento oncológico poderão auxiliar a amenizar a cardiotoxicidade promovida por este agente antineoplásico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço as oportunidades oferecidas pelo Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá. Assim como o apoio e orientação das professoras Dr<sup>a</sup>. Nilza Cristina Buttow e Dr<sup>a</sup>. Carmem Patrícia Barbosa e as contribuições dos demais colaboradores que tornaram possível a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Instituto Nacional de Câncer-INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. [Internet]. Ministério da Saúde. 2018. 128 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>
2. Malet-Martino M, Martino R. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist*. 2002;7(4):288–323.
3. Jatto J, Oboh E, Ntekim A. 5-fluorouracil induced cardiotoxicity in a young patient with colon cancer: An unusual finding. *J Oncol Res Ther: JONT-135*. 2017; doi: 10.29011/2574-710X. 000035.
4. de Forni M, Malet-Martino MC, Jaillais P, Shubinski RE, Bachaud JM, Lemaire L, et al. Cardiotoxicity of high-dose continuous infusion fluorouracil: a prospective clinical study. *J Clin Oncol*. 1992;10(11):1795–801.
5. Eskilsson J, Albertsson M, Mercke C. Adverse cardiac effects during induction chemotherapy treatment with cis-platin and 5-fluorouracil. *Radiother Oncol*. 1988;13:41-6.
6. Jeremic B, Jevremovic S, Djuric L, Mijatovic L. Cardiotoxicity during chemotherapy treatment with 5-fluorouracil and cisplatin. *Oncology*. 1990;65:108–12.
7. Francisco G, Hernández C, Simó R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta*. 2006;369(1):1–16.
8. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 beta in patients with coronary artery disease. *Heart*. 1996;76(1):24–8.
9. Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell J V. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2017;269(2):R229–35.
10. Raymond RJ, Dehmer GJ, Theoharides TC, Deliargyris EN. Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J*. 2001;141(3):435–8.
11. MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM, Murali S. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol*. 1997;79(8):1128–31.
12. Ramosa CDL, Heluy-Netoa NE, Ribeiro RA, Ferreira SH, CUNHA FQ. Neutrophil migration induced by



- IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. 2003. p. 21; 214–23.
13. Coelho B. A., Belo A. V., Andrade S. P., Amorim W. C., Uemura G. & da SFAL. N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014;68(2),185–9.
  14. O'Brien PJ. Peroxidases. *Chemico-biological interactions*. 2000;129(1-2):113–39.
  15. Brevetti G, Schiano V, Laurenzano E, Giugliano G, PetrettabM, Scopacasa F, Chiariello ME. Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. *Heart Journal*. 2008;29:224–30.
  16. Irie T, Tsujii M, Tsuji S, Yoshio T, Ishii S, Shinzaki S, et al. Synergistic antitumor effects of celecoxib with 5-fluorouracil depend on IFN- $\gamma$ . *Int J Cancer*. 2007;121(4):878–83.
  17. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9(11):1370–6.
  18. Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Egashira K, Arimura K, Machida Y, et al. Increased inactivation of nitric oxide is involved in impaired coronary flow reserve in heart failure. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2001;280(6):H68–75.
  19. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):212–29.
  20. Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Allah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FMA. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacol Res*. 2003;48(5):461–5.

**Palavras-chave:** interleucinas; óxido nítrico; quimioterapia.

## **EFEITOS DA ABORDAGEM TERAPÊUTICA COM 5-FLUOROURACIL NO INTESTINO GROSSO DE RATOS *Wistar***

**Pedro Luiz Zonta de Freitas<sup>1</sup>; Lilian Catarim Fabiano<sup>2</sup>; Karile Cristina da Costa<sup>2</sup>; Mariana Conceição da Silva<sup>3</sup>; Camila Quaglio Neves<sup>4</sup>; Stephanie Carvalho Borges<sup>5</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup> Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Pós Doutoranda do Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: pedrolzf@hotmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O câncer é uma das causas dominantes de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento. É esperado que as estatísticas aumentem devido ao crescimento e envelhecimento populacional, principalmente nos países menos desenvolvidos, lugar em que cerca de 82% da população mundial reside (1). Dentre os diversos tipos de câncer que mais registra-se acometimento, encontra-se o câncer colorretal, que é um problema de saúde globalizado. Em homens é a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer e a terceira principal causa de mortalidade em mulheres no mundo todo (2). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), até o ano de 2030 são esperados 27 milhões de novos casos de câncer, sendo que esses pacientes serão submetidos a tratamentos e inúmeros deles sofrerão vários efeitos colaterais devido a quimioterapia antineoplásica, que é uma das abordagens terapêuticas que mais apresenta chances de cura (3).

Uma das complicações que mais acomete o paciente em tratamento quimioterápico é a toxicidade gastrointestinal, que ocasiona o desenvolvimento de vários efeitos colaterais, entre eles: perda de peso, dor, quadros de infecções, e, também promove sérias manifestações clínicas associadas a dismotilidade gastrointestinal tais como: diarreia, saciedade precoce, anorexia, náuseas, vômitos, e outros desconfortos que podem estar relacionados ao retardo do tempo de esvaziamento gastrointestinal. Esses efeitos adversos são sérias complicações que podem afetar diretamente a qualidade do tratamento, desencadeando a possibilidade de suspensão da terapia oncológica (4, 5). Estudos demonstram que o tratamento com quimioterápico promove inflamação na mucosa intestinal, e que os distúrbios relacionados a motilidade não se restringem apenas em regiões inflamadas do intestino (6, 14, 22). Outro fenômeno comum em pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos é a constipação, em que a prevalência é de 70% a 100% dos casos e sua etiologia pode estar relacionada a vários fatores, entre eles possíveis danos ao sistema nervoso entérico (7, 8). Efeitos colaterais crônicos relacionados ao trato gastrointestinal podem persistir por mais de 10 anos após o tratamento, afetando diretamente a qualidade de vida dos pacientes (9, 10).

Dentre os agentes quimioterápicos aplicados no tratamento de câncer colorretal, encontra-se o 5-fluorouracil (5-FU). Esse medicamento é uma droga antimetabólica padrão em quimioterapia antineoplásica, principalmente em câncer gastrointestinal. Atualmente, é o fármaco mais efetivo para o tratamento quimioterápico no câncer colorretal em estágio avançado (11). O 5-FU é uma pirimidina fluorada, no qual o átomo de hidrogênio na posição 5 do uracilo é substituído pelo átomo de flúor, obtendo a função de bloquear o metabolismo celular, impedindo a formação de novas células cancerígenas (12). Mesmo o 5-FU sendo uma das drogas mais utilizadas no tratamento quimioterápico contra câncer colorretal devido sua efetiva atividade antitumoral, e por ser uma droga de associação, sendo adjuvante em outros tratamentos antineoplásicos, seus efeitos citotóxicos podem retardar o tratamento ou até mesmo impedir sua continuidade (13, 14). No entanto, através de estudos com doses elevadas de 5-FU sabe-se que os principais contribuintes no desenvolvimento de inflamação intestinal induzida por este quimioterápico estão relacionados com um conjunto de agentes causadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e apoptose (10). Contudo poucos estudos avaliaram as alterações ocasionadas com a administração de dose clínica de 5-FU.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações ocasionadas pela abordagem terapêutica utilizando a dose padrão de 5-FU em tratamentos oncológicos, através da análise de parâmetros oxidativos e inflamatórios no intestino grosso e alterações na motilidade gastrointestinal de ratos *Wistar*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Animais

No estudo foram utilizados doze ratos albinos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*, machos, com peso médio de  $272 \pm 7,3g$ . Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas durante o período de experimentação, em temperatura ( $22 \pm 2^\circ C$ ) e iluminação controlada (ciclo claro/escuro de 12 h). Todos os animais receberam ração padronizada para roedores NUVILAB® (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute - USA) e água *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá sob o parecer N° 4422140918.

### 2.2. Protocolo experimental

Os animais foram divididos em dois grupos (n=6) e foram tratados com veículo ou quimioterápico 5-FU via intraperitoneal. O grupo controle (C) foi tratado com 0.3 mL de soro fisiológico 0,9% (veículo). Já no grupo que foi induzido o quimioterápico (grupo 5-FU), recebeu doses alternadas de 15mg/kg e 6 mg/kg de peso corporal conforme a Tabela 1. O protocolo que foi empregado nesse experimento é equivalente ao utilizado em humanos.

**Tabela 1. Doses do quimioterápico 5-FU de acordo com o dia de tratamento**

Dia	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º	15º
Dose de 5-FU (mg/Kg)	15	15	15	15	*	6	*	6	*	6	*	6	*	15	Eutanásia

\* Não houve tratamento

Durante o período experimental, os animais foram pesados diariamente.

### 2.3. Eutanásia e coleta dos órgãos

A eutanásia foi realizada com dose letal de 120 mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico (Cristália® - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) via intraperitoneal. O cólon proximal e distal foram coletados e distribuídos para realização das técnicas de parâmetros bioquímicos e inflamatórios. Após a coleta, os segmentos de cada órgão foram lavados em PBS, e armazenados em freezer  $-80^\circ C$  até que as análises fossem realizadas.

### 2.4. Determinação da atividade enzimática de Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione-S-transferase

Os seguimentos de cólon proximal e distal foram triturados e homogeneizados com tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5) e o sobrenadante foi utilizado. A SOD foi medida baseando-se na capacidade em inibir a auto-oxidação do pirogalol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405 nm) e os resultados expressos em U SOD/mg de proteína. A atividade da CAT foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como substrato. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (240nm) e os resultados expressos em mmol/min/mg de proteína. A atividade da GST foi avaliada utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutathione reduzida (GSH) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (340nm), usando o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar  $1.cm^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

### 2.5. Análise dos níveis de Glutathione Reduzida e Hidroperóxidos Lipídicos

Os níveis de glutathione reduzida (GSH) foram determinados através da reação do homogenato obtido com 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico (DTNB) e a leitura foi feita em espectrofotômetro (412 nm). Os valores foram expressos em  $\mu g/g$  de tecido. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para mensurar o total de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) através do ensaio de oxidação de ferro II na presença de xilenol laranja. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (560 nm) e a concentração de LOOH foi determinada utilizando o coeficiente de extinção 4,3 mmolar  $1/cm$  e expressa em mmol/mg de tecido.

### 2.6. Avaliação da atividade enzimática da Mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase

Os pellets obtidos após a centrifugação dos homogenatos foram ressuspendidos com tampão fosfato de potássio com hexadeciltrimetilamônio (HTAB). As amostras foram homogeneizadas e novamente centrifugadas. A reação da mieloperoxidase (MPO) ocorreu na presença de tetrametilbenzidina (TMB). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro (620 nm). A atividade enzimática da n-acetilglucosaminidase (NAG) foi realizada na presença da solução de n-nitrofenil-N-acetil-B-D-glucosamina e tampão citrato de sódio. Após ser incubado por 1 hora na temperatura de  $37^\circ C$ , a reação foi interrompida com

tampão glicina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405nm). Tanto os resultados da MPO como de NAG foram expressos em unidade de densidade óptica (D.O) /mg de proteína.

## 2.7. Caracterização da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada utilizando o kit o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotecnology, Rockford, EUA), que adota a albumina bovina como padrão. A leitura foi realizada em placa de 96 poços utilizando espectrofotômetro (462 nm).

## 2.8. Análise da motilidade gastrointestinal

Essa análise foi obtida através da determinação do tempo de esvaziamento gastrointestinal. No décimo terceiro dia de tratamento, os ratos receberam via gavagem uma solução contendo 0,1 mL de um marcador não absorvível que consiste em 3% de vermelho carmin e de metilcelulose (Corantec®, São Paulo, Brasil) diluídos em água. Os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água. O resultado foi expresso como intervalo de tempo em minutos do aparecimento do primeiro pellet fecal, marcado com o corante administrado.

## 2.9. Avaliação da massa corporal

Os animais do grupo controle e do grupo 5-FU foram pesados diariamente desde o primeiro dia de tratamento até o dia da eutanásia, construiu-se um registro da massa corporal dos animais e a partir desse registro, os dados foram submetidos a análise estatística.

## 2.10. Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas no programa GraphPad Prism v.7.00. Para dados com distribuição normal foi realizado Teste *t* de Student. O teste de Mann Whitney foi aplicado quando os dados apresentaram distribuição não paramétrica. Para ambas as análises o valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Análises dos parâmetros oxidativos e inflamatórios

Diante das análises dos seguimentos de cólon proximal e distal, os resultados dos parâmetros oxidativos foram mais relevantes no cólon distal do grupo 5-FU, diferentemente dos padrões inflamatórios, que foram mais relevantes no cólon proximal do grupo 5-FU conforme demonstra a Tabela 2.

**Tabela 2. Ensaio bioquímicos**

	Cólon Proximal		Cólon Distal	
	C	5-FU	C	5-FU
<b>SOD</b> (U SOD/mg de proteína)	1.111 ± 0.1234	0,9961 ± 0,1234	1,555 ± 0.1293	1,098 ± 0,0461**
<b>CAT</b> (mmol/min/mg de proteína)	0,0210 ± 0,0027	0,0199 ± 0,0012	0,0253 ± 0,0042	0,0162 ± 0,0007*
<b>GSH</b> (µg GSH/g de tecido)	771,8 ± 44,7	683,8 ± 19,91	1262 ± 55,05	1085 ± 19,17*
<b>LOOH</b> (mmol/mg de tecido)	74,99 ± 2,266	76,18 ± 1,147	67,33 ± 2,226	73,54 ± 1,578*
<b>GST</b> (mmol/min/mg de proteína)	0,0160 ± 0,0014	0,0190 ± 0,0005	0,0169 ± 0,0007	0,0203 ± 0,0012*
<b>MPO</b> (mD.O./mg de proteína)	0,2392 ± 0,0420	0,3833 ± 0,0312*	0,2096 ± 0,0338	0,2131 ± 0,0247
<b>NAG</b> (mD.O./mg de proteína)	4,203 ± 0,6699	7,262 ± 0,3319**	4,787 ± 0,4091	6,844 ± 0,5373*
<b>Proteína</b> (µg/µL)	7,14 ± 0,8762	5,926 ± 0,1985	5,335 ± 0,2015	4,026 ± 0,2998**

\*=*p* <0,05; \*\*=*p* <0,01. C= animais tratados com salina; 5-FU= animais tratados com 5-Fluorouracil.

A atividade da enzima SOD sofreu diminuição significativa no cólon distal do grupo 5-FU quando comparada ao grupo controle (*p* <0,007), enquanto que no cólon proximal nenhuma alteração da enzima SOD foi encontrada. A enzima CAT também teve seu comportamento alterado apenas no cólon distal do grupo 5-FU, na qual encontra-se reduzida (*p* <0,041) ao ser comparada com o grupo controle. Da mesma maneira, os níveis de GSH apresentaram diminuição significativa apenas no cólon distal do grupo 5-FU quando comparado com o controle (*p* <0,012).

Os níveis de LOOH encontraram-se alterados apenas no cólon distal do grupo 5-FU, sua concentração está aumentada (*p* <0,046) quando comparada com o grupo controle. Da mesma forma encontrou-se alterada a atividade da enzima GST, que quando comparou-se o grupo 5-FU com o controle, a concentração também foi aumentada (*p* <0,05).

A atividade da enzima MPO sofreu alteração, apenas no cólon proximal e no distal nenhuma alteração foi significativa, quando comparou-se o nível de MPO do cólon proximal com o grupo controle sua atividade estava aumentada (*p* <0,020).



A atividade da enzima NAG, foi a única que mostrou alteração nos dois seguimentos de cólon analisados. Quando se compara os níveis da enzima no cólon proximal e distal do grupo 5-FU estes encontraram-se aumentados ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Todos esses parâmetros analisados, encontram-se detalhados na Tabela 2.

### 3.2. Trânsito gastrintestinal

Ao estudar o trânsito gastrintestinal percebe-se que o tempo de trânsito gastrintestinal foi mais lento no grupo 5-FU quando comparado ao grupo controle, conforme exibe a Figura 1.

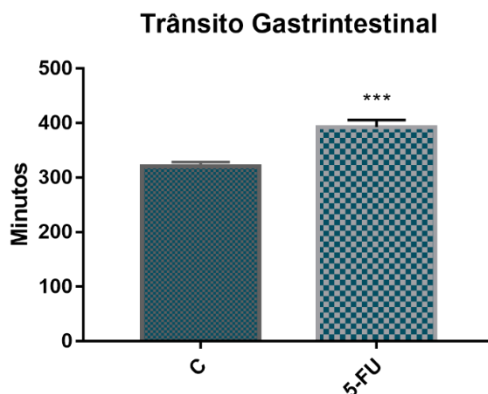


Figura 1. Esvaziamento gastrintestinal em animais do grupo controle, tratado com salina (C) e do grupo tratado com 5-Fluorouracil (5-FU). \*\*\*= $p < 0,001$

### 3.3. Massa corporal

A Figura 2 mostra as alterações de massa corporal de cada grupo. Pode-se observar que os animais do grupo controle ganharam em média 35 gramas a mais que o grupo 5-FU no período de 15 dias (período experimental) (Figura 2A). Ao observar a Figura 2B, é possível verificar que o grupo 5-FU apresentou um significativo menor ganho de massa corporal nos primeiros 5 dias de tratamento, o qual é equivalente à maior dose utilizada nesse estudo (15 mg/Kg). A Figura 2C demonstra que nesse período inicial de tratamento (5 dias) o grupo controle ganhou em média 21 gramas, enquanto o grupo 5-FU perdeu aproximadamente 18 gramas. Pode-se verificar ainda, ao observar a Figura 2B, que ao utilizar doses menores e alternadas (dias 6 ao 14) os animais foram capazes de ganhar massa corporal, e ao ser retomada a dose maior no último dia de tratamento (15º dia) os animais voltaram a perder massa corporal (Figura 2B).

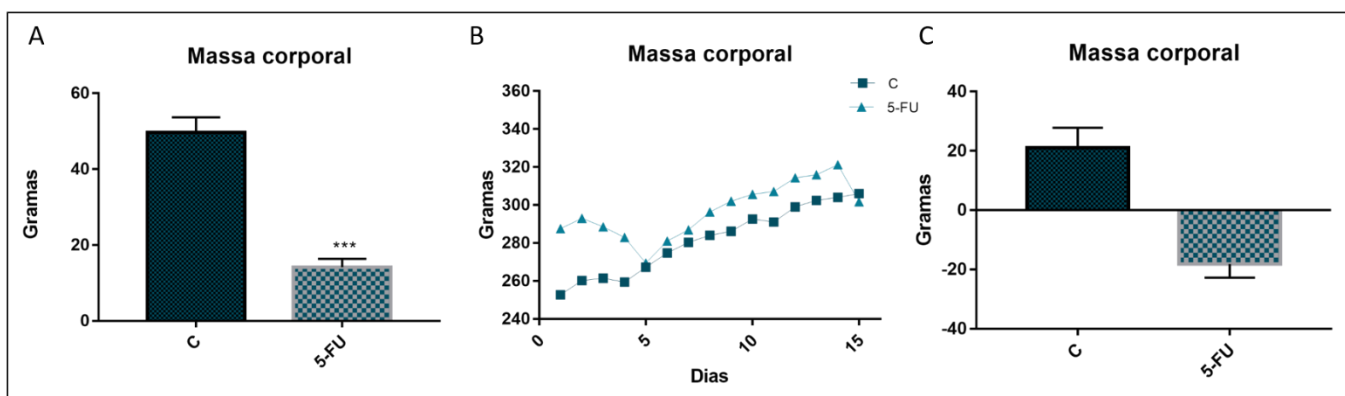


Figura 2. Efeitos do 5-FU no peso dos animais. A= média de ganho de massa corporal no período experimental (15 dias). B= acompanhamento da massa corporal dos animais do 1º ao 15º. C= média da alteração de massa corporal nos 5 primeiros dias de tratamento (maior dose). \*\*\* $p < 0,001$ .

## 4. DISCUSSÃO

A toxicidade por trás da abordagem terapêutica utilizando 5-FU, pode estar relacionada ao estresse oxidativo demonstrado pela peroxidação lipídica e danos a membrana celular (15). Em nosso trabalho observamos estresse oxidativo no cólon distal e inflamação no cólon proximal e distal.

Na análise dos parâmetros oxidativos no cólon distal observamos um aumento significativo de hidroperóxidos lipídicos. Entre os componentes celulares, a membrana é a mais susceptível à ação oxidante das espécies reativas de oxigênio, devido a peroxidação lipídica que promove alterações na estrutura e permeabilidade da membrana celular, com consequente perda de seletividade nas trocas iônicas (16). Na tentativa de neutralizar os efeitos e evitar danos causados pela produção de agentes oxidantes, o organismo apresenta mecanismos de defesa que inclui antioxidantes endógenos, sendo os principais: as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa-s-transferase (GST) e a catalase (CAT) (17, 18). Em nosso estudo, observamos redução significativa na atividade das enzimas SOD e CAT. A SOD é uma enzima antioxidante e atua na eliminação de radicais superóxido ( $O_2^-$ ) por meio da catalisação à peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). E a CAT é uma enzima capaz de catalisar a degradação de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Além da redução da atividade destas enzimas observada em nosso trabalho houve redução significativa na concentração de proteínas (19). A redução da atividade enzimática pode ser consequência da redução da síntese destas enzimas e/ou da redução da sua atividade ocasionadas pela ação do 5-FU. Esta redução pode também ter contribuído para o aumento da peroxidação lipídica observada em nosso estudo. Segundo Tas e colaboradores (20), a redução nos níveis da catalase pode proporcionar um aumento de peróxido de hidrogênio. No entanto, a GST apresentou um aumento de sua atividade. Esta enzima pertence a uma família multifatorial de proteínas envolvidas no processo de eliminação de agentes causadores de oxidação celular, e seu aumento pode ser analisado como a necessidade de combater o estresse oxidativo (21). Essa enzima catalisa a conjugação da glutationa reduzida (GSH) com compostos endógenos ou exógenos, afim de torna-los menos tóxicos, e então serem degradados mais facilmente. Em nosso estudo observamos uma redução de GSH. O GSH é um tripeptídeo que na sua forma reduzida é capaz de doar elétrons para enzimas como a GST. Sua diminuição provavelmente está relacionada ao aumento da atividade desta enzima indicando uma tentativa em reduzir os danos causados pelo 5-FU. Estes dados demonstram que o 5-FU causa estresse oxidativo no cólon distal.

O 5-FU desencadeia a geração de estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS) que vão atuar danificando diretamente células e tecidos, outro elemento estimulado é o fator nuclear kappa B (NFkB) o qual promove a quimiotaxia de neutrófilos (15). Os resultados de MPO demonstram um aumento significativo da atividade desta enzima somente no cólon proximal no grupo tratado com 5-FU. Outro parâmetro inflamatório é a NAG, enzima presente nos lisossomos de macrófagos ativados e é utilizada como marcador indireto de inflamação (22). Neste estudo verificamos um aumento desta enzima no cólon proximal e distal. Estes dados caracterizam um processo inflamatório principalmente no cólon proximal.

As alterações de estresse oxidativo e de inflamação encontradas podem estar relacionadas com resultados de trânsito gastrointestinal, onde observamos um retardo significativo no grupo 5-FU. Estudos mostraram notoriamente que os déficits nos padrões de motilidade colônica podem ser analisados em cólon inteiro isolado *in vitro*, após administração prévia de 5-FU *in vivo*. Provavelmente a dismotilidade pode estar relacionada com alterações neuronais entéricas como observado em estudos que utilizaram doses elevadas de 5-FU (14).

Além das alterações de estresse oxidativo, inflamação e dismotilidade a utilização de 5-FU pode desencadear quadros graves de redução de massa corporal, podendo comprometer a continuidade do tratamento (23). Nossos resultados de análise de massa corporal mostraram que os animais do grupo 5-FU reduziram acentuadamente a massa corporal, e essa perda foi mais intensa nos 5 primeiros dias, período esse que de acordo com a literatura é quando o medicamento desencadeia o processo inflamatório. A quimioterapia pode desencadear quadros graves de diarreia, má absorção, perda de peso e infecção grave, efeitos esses que podem comprometer a qualidade de vida do paciente (23).

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho fornece evidências de que o esquema terapêutico do tratamento oncológico utilizando 5-FU, promove a ocorrência de estresse oxidativo e inflamação no intestino grosso, dismotilidade gastrointestinal e redução de massa corpórea. O conhecimento dos efeitos do fármaco antineoplásico sobre o intestino grosso poderá contribuir para uma intervenção terapêutica visando amenizar os efeitos colaterais do tratamento com 5-FU.

## REFERÊNCIAS

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. 2015 Mar;65(2):87–108.
2. Siegel, RL, Miller, KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67:7–30.

3. Pereira VB, Melo AT, Assis-Junior EM, Wong DV, Brito GA, Almeida PR, et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77(2):323–32. doi: 10.1007/s00280-015-2938-x.
4. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer.* 2004;100(9 Supl):2026–46.
5. Malet-Martino M, Martino R. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist.* 2002;7(4):288–323.
6. Moreels TG, De Man JG, De Winter BY, Timmermans JP, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)-induced ileitis on the motor function of non-inflamed rat gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 Sept 4;13(4).
7. Kris MG, Gralla RJ, Clark RA, Tyson LB, Groshen S. Control of chemotherapy-induced diarrhea with synthetic enkephalin BW942C syntax: A randomized trial with placebo in patients receiving cisplatin. *J Clin Oncol.* 1988;6(4):663–8.
8. Kawashima R, Kawakami F, Maekawa T, Yamamoto H, Koizumi W, Ichikawa T. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis through mucus barrier alteration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Aug;76(2):269–77.
9. Denlinger CS, Barsevick AM. The challenges of colorectal cancer survivorship. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7:883–93.
10. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Qasim AM, Al-Yousef Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. *Toxicol Reports.* 2015;2:908–16.
11. Wöhrer SS, Raderer M, Hejna M. Palliative chemotherapy for advanced gastric cancer. *Ann Oncol.* 2004; 15(11):1585–95.
12. Rolston KV. The burden of cancer therapy: clinical and economic results of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer.* 2004;100(6):1324-5; author reply 1325–6.
13. McQuade RM, Stojanovska V, Donald E, Abalo R, Bornstein J, Nurgali K. Gastrointestinal dysfunction and enteric neurotoxicity after treatment with anticancer chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(12):1861–75. doi: 10.1111/nmo.12890.
14. Costa DVS, Bon-Frauches AC, Silva AMHP, Lima-Júnior RCP, Martins CS, Leitão RFC, et al. 5-fluorouracil induces enteric neuron death and glial activation during intestinal mucositis via a S100B-RAGE-NFκB-dependent pathway. *Sci Rep.* 2019 Jan 24;9(1):665.
15. Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Hasan SK, Sultana S. Abrogation of 5-fluorouracil induced renal toxicity by bee propolis via targeting oxidative stress and inflammation in Wistar rats. *J Pharm Res.* 2013;7(2):189–94. doi:10.1016/j.jopr.2013.03.003.
16. Tas F, Hansel H, Belse A, Ilvan S, Argon A, Camlica H, et al. Oxidative stress in breast cancer. *Med Oncol.* 2005;22(1):11–5.
17. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição.* 1999;12:123–30.
18. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine.* 3 ed. Oxford: Oxford University Press; 1999.
19. Muthu R, Thangavel P, Selvaraj N, Ramalingam R, Vaiyapuri M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Biomedicine & Preventive Nutrition.* 2013;3(1):74–82.
20. Davila M, Bresalier RS. Gastrointestinal complications of oncologic therapy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5(12):682–96.
21. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids.* 2012;47(7):669–78.
22. Benson AB 3rd, Ajani JA, Catalano RB, Engelking C, Kornblau SM, Martenson JA Jr, et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2918-26.
23. Cogo AJD, Siqueira AF, Ramos AC, Cruz ZM, Silva AG. (2009). Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. *Natureza on line.* 2009;7(1):37–42.

**Palavras-chave:** 5-fluorouracil; estresse oxidativo; dismotilidade gastrintestinal.

## BONE REGENERATION IN CRITICAL-SIZE DEFECTS IN RAT'S CALVARIA AFTER CALCIUM PHOSPHATE CERAMIC IMPLANTATION

**Gabriela de Castro Prado<sup>1</sup>; Jéssica Naiara Gimenez Noronha<sup>2</sup>; Cecília Valente Rodrigues Truite<sup>3</sup>; Luzmarina Hernandez<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Biosciences and Physiopathology, Sate University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Postgraduate student (Master's degree), Program of Biosciences and Physiopathology, Sate University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Food Sciences, Sate University of Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Morphological Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: gacprado@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Bones are specialized form of connectives tissues containing extracellular mineralized matrix which is able to produce a high level of hardness for such tissue (1). Nerves, blood and lymphatic vessels are also parts constitutive of bones (1). Besides to be capable to grow, the bones also can cicatrize themselves (1). They promote physical protection to the several organs present into the body, are important levers to muscles, thereby contributing to locomotion and amplification of force generated during muscular contraction (1, 2).

The mechanisms responsible for the genesis of bone tissues are not yet fully known, but it is well established that local, such as hormones, and systemic (growth factors, cytokines) factors play important roles in maintaining bone homeostasis (synthesis and reabsorption processes (2, 3). Therefore, any external (accident) or internal (malformation) changes in the bone homeostasis might be able to trigger metabolic and hormonal events in the body to generate an adequate repair of bone structures (2, 3).

The researches focusing new materials capable of replacing bones are clinically useful in orthopedics, orthodontics and other several medical areas (4, 5, 6, 7, 8). These materials, generically called biomaterials, must be capable to stimulate regenerative responses in the bone structure, beside to retain physical and biological properties compatible with desired clinical effect (5, 7, 8). Between such properties should be highlighted: i) osteoconduction (apposition of bone tissue on its surface as a mold that facilitates its neoformation), ii) bioactivity (property of forming tissue on the surface of a biomaterial and establishing an interface capable of withstanding functional loads), iii) biocompatibility (ability of a material to be compatible with living tissue), and iiiii) osteointegration (anchoring direct of an implant by formation of surrounding bone tissue without the presence of fibrous tissue at the bone-implant interface) (9).

The porosity of a material generally varies with temperature and sintering time. Higher porosity materials (scaffolds) are known to facilitate the osseointegration step, generating a composite with better biomechanical properties (framework) (10).

Requirements for a good framework are: i) high porosity, ii) surface that allows adhesion, iii) cell differentiation and, iiiii) cell proliferation. Mechanical metalwork and absence of toxicity are also desirable properties requirements (11, 12). Until the present moment, it has not been create a metallic structure expressing the necessary requirements for a good framework. Since an ideal framework must provide a good support for an injured site, beside to stimulate the osteogenic differentiation (13, 14).

Scaffolds de calcium phosphate (Ca-P) ceramics are extensively regarded as excellent bone substitutes due to their good biocompatibility, osteoconductivity (15, 16).

Hydroxyapatite (HAp) is one substance that retains in their molecules a high biocompatibility and bioactivity. However, such element is not resistant to pressure (17, 18). Thus, it is possible to suppose that their enrichment with others metallic materials, such as niobium (Nb) in its niobium pentoxide (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) form is a biocompatible, corrosion-resistant oxide capable of nuclear up with apatite, making it bioactive (19). The association of both elements generates the HA/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Our research group has been dedicated to developing calcium phosphate-based materials obtained from fish bones and evaluating the biological potential of these materials for bone regeneration.

Previous works of our group have shown that a biphasic base calcium phosphate (BCP) ceramic, composed of hydroxyapatite (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) and β tricalcium phosphate (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), when associated with niobium, resulted in a biocompatible, bioactive, osteoconductive (20, 21, 22) and osteoinductive (22) three-phase composite (BCP/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and with 60% more resistant than pure BCP (20). No studies have been



performed with niobium-associated pure hydroxyapatite. In the current work we carried out a morphological study to evaluate rat calvary regeneration, after the implantation of a scaffold composed by HAp/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, in disk form, in critical size defects, in rats.

## 2. MATERIAL AND METHODS

HAp was obtained from painted fish bones (*Pseudoplatystoma corruscans*), which was provided by the Ichthyology and Aquaculture Limnology Research Center of the Maringá State University (NUPELIA-UEM).

The preparation and confection of scaffolds (implants in the form of porous disc) with 0.88 and 8 mm depth and diameter, respectively, was performed at the Department of Physics of UEM.

### 2.1. Experimental procedure

Male Wistar rats (200 and 250g), from the Central Biotério of the State University of Maringá, were used in the present work. All experimental procedures used (see below) in current work were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Maringá State University (proc. 9595200717).

The animals were anesthetized by intramuscular administration of 2% xylazine hydrochloride (1ml/ kg) (Rompun®, Bayer, São Paulo, Brazil) and 10% ketamine (1ml/ kg) (Agener, São Paulo, Brazil) 1: 1 ratio. The animals had their heads manually shaved to expose the skull region and such place received iodine treatment. An incision in the skullcap region was performed. Such incision, extending from one base of one ear to the other, was performed transversely to the skullcap, and the periosteum was limited to deepening. Connectives tissues were detached with a molt spatula to promote bone exposure, the desired bone defect was produced in the calvary using a 8 mm (3 mm) straight-mounted trephine drill (Neodent®, Curitiba, Brazil) coupled to a surgical motor (Branemarck System). ®,) rotating at 1500 rpm. All theses former procedures were followed by continuous sterile saline solution washing. The defect produced was of 0.8 and 8 mm deeper and diameter, respectively. The scaffolds were embedded in the bone defects place and the soft tissues were repositioned and sutured. The region received topical application of iodine as a local antiseptic.

The animals were divided into two groups (n = 10 rats/ group), an experimental group (I) was designed as the group formed by combination HAp and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, while a other group (II) was considered as a control (Hap).

The animals were observed for a period of 45 days, and at the end of this period the euthanasia using thiopental overdose was performed.

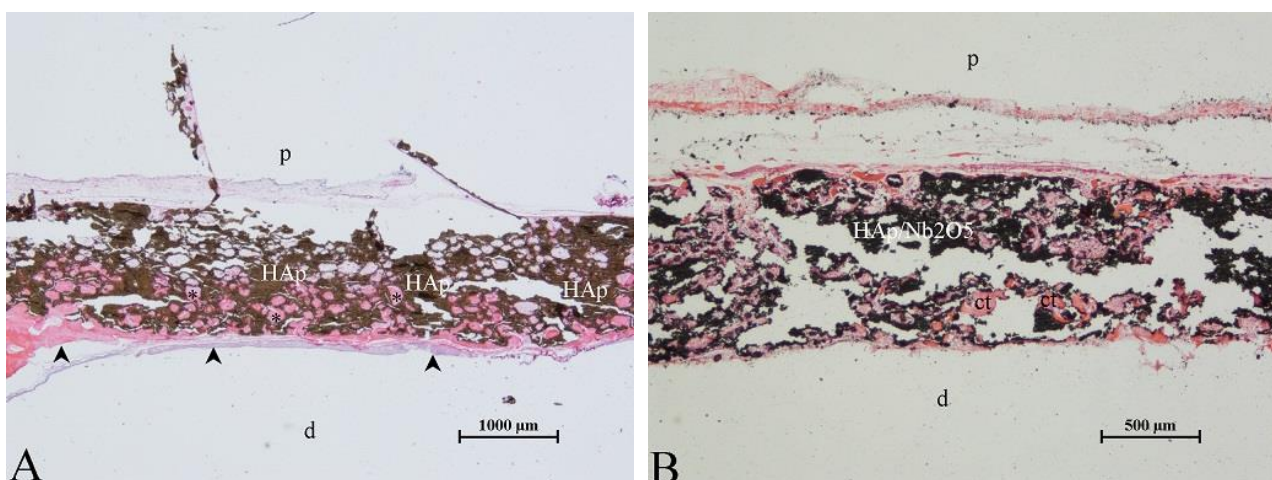
### 2.2. Studies using optical microscopy

After euthanasia, the calvary samples containing the implants were removed and fixed in 4% paraformaldehyde solution and decalcified in Morse solution (50% formic acid and 20% sodium citrate) for 15 days. After demineralization, each sample was split in half and processed for paraffin embedding.

Semi-serial 7 µm sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and slides were used for the histological study.

## 3. RESULTS

There was a bone growth from the margins of the defects in all animals studied (groups I and II), but bone formations with osteointegrations were observed on dura mater facing the scaffold (groups I and II). In both groups were also observed the invasion of the pores by blood vessels and cells, forming connective tissues, at first loose, but later becoming denser, thus giving rise to an immature (primary) bone tissue which it was accompanied by the production of lamellar bone matrix, thus characterizing a mature bone tissue that was gradually deposited in layers from the surface of the pores and, thus, leading to their obstruction. The highest frequency of multinucleated cells was detected in the margins of group II implants.





**Figure 1. Photomicrograph of bone defect produced in rat calvaria 45 days after implantation of a HAp (A, C, E, and G) or HAp/ Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (B, D, F, and H) scaffold.** In (A) in the panoramic view of the bone defect with the scaffold, observe the bone growth from the defect margin (arrowhead), in the region facing duramater (d) and the pores filled with mature bone tissue (\*). In (C) notice filled pores with vascularized (v) connective tissue and increased bone matrix formation. In (E) it is observed the filled pores with mature bone tissue (\*). In (G) we highlight the presence of multinucleated giant cells located at the margin (m) of defect. In defects filled with HAp/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in (B), the panoramic view shows all filled pores, most of them occupied by connective tissue (ct). In (D), detail of some pores with connective loose tissue (ct) with vascularized pores (v). In the image (F) there are pores containing mature bone tissue (\*). In (H) highlight the presence of multinucleated giant cell on the material.

**4. DISCUSSION**

Studies using critical size defects (CSD's) are performed to assess the ability of the biomaterial to modulate the bone regeneration process while promoting mechanical support (23, 24). A CSD is defined as "the smallest intraosseous defect that does not regenerate completely and spontaneously during the animal's life cycle" (25). Thus, the repair is only achieved through therapies or materials that stimulate bone regeneration (26). The size of CSDs varies by species, location and age of the animal. In calvary, the defects of 5 (27) and 8 mm (28) are the most commonly used.



In this study, HAp or HAp/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> discs were implanted in 8mm CSD's, without the use of any artifact for their stabilization. This ensures that bone regeneration occurs under the sole influence of the framework. The fitting of the inserts was maintained by the repositioning of the periosteum and skin, ensuring the material stability and reducing the degree of mobility (29). The dura mater, which covers the floor of the defect, was an important supplier of cells to the regenerative process (29). It is possible to observe a greater migration of tissues into the pores of the framework. Within the pores, the regeneration occurred sequentially and with some maturation phase overlap in the analyzed periods.

Regeneration over 45 days was evaluated for tissues morphology that developed in the pores after the ceramic implantation. In both cases, the regeneration proceeded normally, following the regeneration phases: i) cell proliferation, ii) connective tissue development, iii) connective tissue maturation and bone differentiation iiiii) mineralization (30, 31), presenting some particulars.

Through microscopic evaluation, bone regeneration was observed from the sectioned bone margins, towards the center of the defect, forming a bone tongue running along the dural surface of the pellet. The pores were invaded by a regenerate bone tissue, but mainly by connective tissue from duramater and periosteum (32).

It was possible to observe proliferation and migration of blood vessels and osteogenic cells, with bone matrix production directly on its surface, supporting the osteointegration occurrence, with no development of fibrous capsule or phagocyte granule involvement. Over the 45 days, the CSD's presented lamellar organization, typical of a mature bone tissue

Our results are similar to those described by Pasquinelli, 2015. The materials used by this author contained in their composition besides HAp and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, the  $\beta$ TCP, which is attributed an osteogenic potential. Our results showed that even in the absence of  $\beta$ TCP, the framework demonstrated relevant osteogenic potential.

## 5. CONCLUSION

Through the morphological changes in the calvary it was possible to conclude that the composition phase of the HAp and  $\beta$ HAp/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ceramics, in their scaffold form, acts as a framework that favors osteogenesis and osteointegration in critical size defects.

## REFERENCES

1. Titorencu I, Pruna V, Jiga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res.* 2014 Jan;355(1):23-33.
2. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop.* 1998;355S:S7-S21.
3. Simmons DJ. Fracture Healing Perspectives. *Clin. Orthop.* 1985;200:100-113.
4. Mohan S, Baylinj DJ. Bone Growth Factors. *Clin. Orthop.* 1991;263:30-48.
5. Dornbusch PTD, Araujo IGR, Tasquetti UY, Pimpão CT, Prado AMB & Hussni CA. Avaliação radiográfica da aplicação do polímero de mamona em falhas ósseas induzidas em equinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2010;15:1-8.
6. Marcondes GM. Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2014;175p.
7. Barroso B, Didraga M, Bischoff R. Analysis of proteoglycans derived sulphated disaccharides by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005 Jul;1;1080(1):43-8.
8. Milori FP, Quitzan J, Souza RS, Cirio SM, Dornbusch PT & Prado AMRB. Placas ósseas confeccionadas a partir de diáfise cortical equina na osteossíntese femoral em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 2013;33:1201-1207.
9. Nóbrega FS. Avaliação da interação biológica entre o polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2014; São Paulo, SP.156p.
10. Leite GS, Sandim HRZ, Cintho OM. Sinterização do nióbio: Efeito da Granulometria dos pós. *Tecnol. Metal. Mater. Miner. São Paulo.* 2011 Abr.-Jun;8(2):132-137.
11. Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.* 1966; 21(6):805–813.
12. Carvalho A, Okamoto T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. *Ver Odont. UNESP, São Paulo.* 1985;14(1/2):27-33.
13. Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. Time-dependent Changes of Collagen Crosslinks in the Socket after Tooth Extraction in Rabbits. *J of Dent Res.* 1988;67(6), 944–948.
14. Pagni G, Pellegrini G, Giannobile WV, Rasperini J. Postextraction Alveolar Ridge Preservation: Biological Basis and Treatments. *Int J Dent.* 2012; 2012:151030.
15. Yuan H, Yang Z, de Bruijn JD. et al. Material-dependent bone induction by calcium phosphate ceramics: A 2.5-year study in dog. *Biomaterials.* 2001 Oct;2219:2617-23.

16. Yuan H, De Bruijn J, Li Y. et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: A comparative study between porous  $\alpha$ -TCP and  $\beta$ -TCP. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12:7–13.
17. Nóbrega FS. Avaliação da interação biológica entre o polímero de poliuretano de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2014. São Paulo, SP. 156p.
18. Almeida LES. Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em ovinos. Defesa de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2015. São Paulo, SP.
19. Bonadio TGM. Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidróxiapatita, B- fosfato tricálcico: produção, caracterização e estudos *in vivo* como suportes ósseos denso e poroso. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2014.
20. Kiyoshi Júnior HJ. Estudo ex-vivo da ceramic bifásica composta de hidróxiapatita beta fosfato tricálcio (HA- $\beta$ -TCP) e pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) como biomaterial empregado para o reparo ósseo em defeitos de calvária. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2013.
21. Candido AG. Compósito baseado em HA- $\beta$ TCP-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. Dissertação de mestrado. Maringá, PR 2014; p100.
22. Pasquinelli HBA. Compósito de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio  $\beta$ Hap-Nb na forma de arcabouço induz regeneração óssea em defeito de tamanho crítico em calvária de ratos. Dissertação de mestrado. Maringá, PR 2015; p100.
23. Cestari TM, Granjero JM, de Assis, GF, Garlet, GP, Taga, R. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. *Clinic. Oral Implants Research*. 2009;340-350.
24. Taga R. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Rev. Bras. Implan*. 1997;3(1):13-20.
25. Scmitz, J, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986;205: 299-08.
26. Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2013;367:113-32.
27. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J.Craniofacial Surgery*. 1998;310-316.
28. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J.Neurosurg*. 1991;74:487-491.
29. Gomes PS, Fernandes, MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*. 2011;(45):14-24.
30. Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1966; 21(6):805–813.
31. Carvalho A, Okamoto T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. *Ver Odont*. UNESP, São Paulo. 1985; 14(1/2):27-33.
32. Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. Time-dependent Changes of Collagen Crosslinks in the Socket after Tooth Extraction in Rabbits. *J of Dent Res*. 1988;67(6):944–948.

**Keyword:** biomaterial; hydroxyapatite; histology.





International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Epidemiologia aplicada à Biociências e Fisiopatologia

## **PREDISPOSIÇÃO DO HOSPEDEIRO DIABÉTICO NO DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS AGENTES DE DERMATOMICOSSES**

**Waylla Albuquerque de Jesus<sup>1</sup>; Camila Barros Galinari<sup>1</sup>; Valéria Mosca<sup>2</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>2</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>3</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmicas de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmicas de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: w.albuquerque11@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença comum e em ascensão nas últimas décadas, considerada como um sério problema de saúde pública, ainda representa um grande desafio para os sistemas de saúde. Em 2017, estimava-se uma população de 451 milhões de diabéticos no mundo, com projeção de aumentar para 693 milhões até 2045 (1). No Brasil, uma estimativa feita em 2013 sugeriu uma prevalência da doença de 6,2%, aproximadamente 9 milhões de pessoas com diabetes no país, cerca de 3,5 milhões delas com 65 anos ou mais de idade (2).

É conhecida a associação de DM com distúrbios cutâneos, como dermatopatias diabéticas como prurido, lesões bolhosas, necróticas, granulomatosas, além de vitiligo, líquens planos (3,4,5). É reconhecido que a maioria dos pacientes com DM, em algum momento da evolução da doença apresentará alguma manifestação cutânea decorrente dos efeitos diretos ou indiretos da hiperglicemia crônica (6).

Infecções também são frequentes e, uma das mais frequentes é conhecida como pé diabético, desde que a úlcera se desenvolve, em decorrência da insuficiência venosa, o risco de infecção aumenta.

Estima-se que até 60% dos pacientes desenvolverão infecção (7), incluindo as de origem fúngica que ocorrem em torno de 40%.

Além disso, recentemente foi comprovada a participação do pé diabético como porta de entrada para infecções fúngicas invasivas, com comprometimento de tecidos profundos (8). Independentemente do pé diabético, é consenso geral que DM é fator de risco para as dermatomicoses. Diversas infecções tegumentares causadas por fungos que acometem a população com DM mais frequentemente do que a população em geral. Entre estas se destacam, o intertrigo e as onicomicoses (9,10). Contudo, há poucos relatos associando as razões para essa predisposição. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de dermatomicoses em diabéticos, residentes na Cidade de Ivatuba- Paraná.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.1. Dados clínicos**

Dos 139 diabéticos cadastrados pelo serviço público de saúde brasileiro, os quais são acompanhados na Unidade Básica de Saúde (UBS) do município de Ivatuba, localizado no interior do Paraná e participam do programa de saúde HiperDia, que visa acompanhar os portadores de hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus, aprovado pela Portaria/GM nº 16, de 03/01/2002. Destes, foram incluídos no projeto 45, os demais foram excluídos por uma das seguintes razões: faleceram, mudaram de residência durante o período, os acamados, os ausentes por qualquer razão, os que estavam em uso de antifúngico tópico ou sistêmico e os que não deram consentimento para o estudo.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP/UEM) em 04/07/2018 (protocolo nº CAAE: 87404517.8.0000.0104). Cada um dos 45 participantes recebeu uma visita domiciliar dos pesquisadores no período entre setembro de 2018 e fevereiro 2019. Após a assinatura do Termo de Consentimento livre e Esclarecido, os indivíduos responderam a uma entrevista com questionário que incluía história clínica pessoal e familiar. Amostras biológicas de sangue foram coletadas para exames laboratoriais para definir as taxas de glicemia, hemoglobina glicada (HG), do perfil lipídico pela dosagem sérica de colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), e função renal pela dosagem sérica de creatinina e uréia.

## 2.2. Investigação de fungos em lesões tegumentares de pacientes diabéticos

Dos 45 participantes, 37 tinham lesões tegumentares e, destes foram coletadas escamas de pele e unhas, por meio de raspagem após antissepsia com álcool 70%. Foram realizados o exame micológico direto à fresco e a cultura para fungos, em tubos contendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), com antibiótico cloranfenicol e também Ágar seletivo para dermatófitos Ágar Micosel.

## 2.3. Relação fungos e fagócitos

Fungos isolados de uma paciente escolhida aleatoriamente foram usados para uma avaliação sobre sua interação frente a fagócitos isolados de hospedeiro diabético. Para isso, foram empregados fagócitos peritoneais de camundongos fêmeas da linhagem Balb/c submetidos ao protocolo de diabetes mellitus aprovado no Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) nº 3624120717.

Leveduras e fagócitos foram co-incubados *in vitro* e avaliados, nos tempos (0, 60, e 120) minutos, por esfregaços visando determinar o índice de fagocitose e por cultivo em placas e posterior contagem do número de UFC/mL, evidenciando os níveis de *killing*.

## 2.4. Análise estatística

Para análise bivariada o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo, dados de morte (*Killing*) e de fagocitose foram utilizados os testes do *software* "Graphpad Prism 7 Installer".

## 3. RESULTADOS

Dentre os 45 pacientes diabéticos, sendo oito insulino dependentes, 37 apresentavam lesões tegumentares (pele, couro cabeludo ou unhas) e foram o objeto deste estudo.

Fungos foram detectados em 17 deles, em 18 sítios anatômicos, com maior frequência para as unhas: dos pés em 13 casos e das mãos em dois. Conforme a Tabela 1, no grupo de pacientes com diabetes e, com micose comprovada, o valor da glicemia foi mais elevado, muito próximo da significância estatística ( $p=0,050$ ). Porém, em relação ao controle da doença, os resultados de HG mostram a manutenção crônica da glicose sérica em níveis elevados (7,2), sem diferença significativa para a presença ou não de micose ( $p=0,079$ ). Apesar da creatinina ter fornecido valores estatisticamente significativo ( $p=0,026$ ), os resultados estão dentro dos limites de normalidade. Além disso, não foi detectada diferença significativa nos parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico.

**Tabela 1. Informações antropométricas e bioquímicas dos 37 pacientes com diabetes que tinham lesões tegumentares, conforme a presença ou ausência de fungos nas lesões**

Características	Total*	Fungos detectados**	Ausência de fungos	P
Geral	37	17	20	
Homens	7	4	3	
Mulheres	30	13	17	
Idade (anos)	66,6 (±9,6)	64,1 (±9,5)	68,7 (±9,2)	0,889
Glicemia em jejum	147,1 (±58,2)	168,9 (±66,7)	128,5 (±41,7)	0,050
Hemoglobina Glicada	7,2 (±1,5)	7,3 (± 1,1)	7,1 (±1,7)	0,079
Colesterol total	141,9 (±52,4)	136,0 (±55,6)	147,0 (±49,1)	0,584
Triglicérides	189,4 (±108,1)	201,1 (±91,2)	179,6 (±119,8)	0,283
HDL	45,3 (±16,0)	47,2 (±17,0)	43,8 (±15,0)	0,585
LDL	66,1 (± 45,1)	52,6 (± 48,1)	77,6 (±38,9)	0,366
VLDL	36,8 (±21,3)	37,9 (± 17,7)	35,9 (±24,0)	0,235
Ureia	45 (±17,3)	42,5 (±14,6)	47,1 (±19,1)	0,297
Creatinina	1,0 (±0,3)	0,9 (±0,2)	1,1 (± 0,4)	0,026

\* Número total ou média (Desvio Padrão ±).

\*\*Fungos detectados: pelo Exame Micológico Direto e/ou cultura para fungos.

A Tabela 2, mostra, que o grupo de dermatófitos foi predominante (52,3%), seguido pelas leveduras (31,6 %) e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) (15,7%). Quanto a espécie *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum* foram as mais frequentes em cada grupo de fungos, respectivamente.

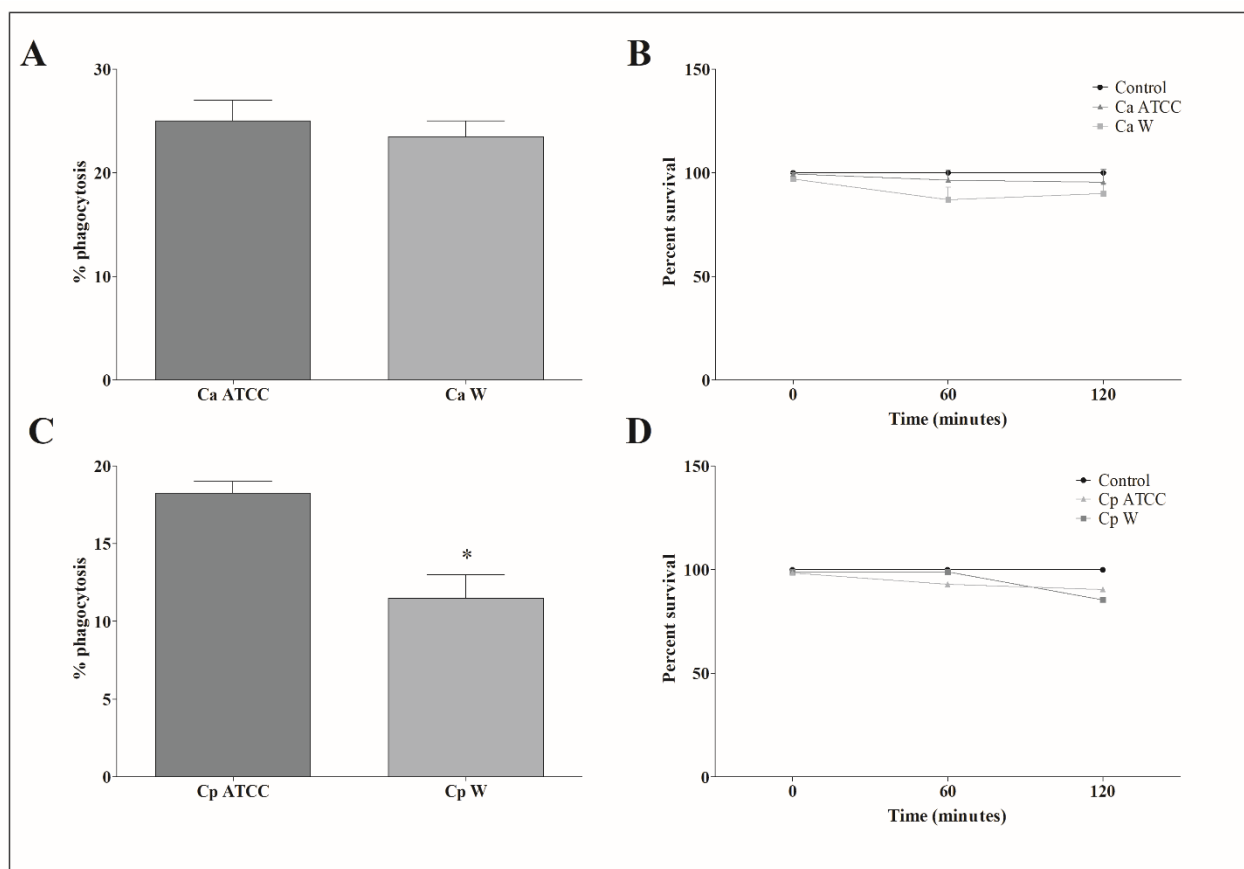
**Tabela 2. Distribuição dos 17 pacientes diabéticos com resultados positivos para micoses cutâneas em suas lesões tegumentares**

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Insulina	Hemogloblina glicada (%)	Sítio Acometido	EMD	Cultura
1	M	61	Não	7,4	unhas do pé	FM	<i>Trichophyton rubrum</i>
2	F	63	Não	6,9	unha do pé	FM	<i>Fusarium oxysporum</i>
3	F	72	Não	4,9	unha do pé	AEF	<i>Trichophyton rubrum</i>
4	F	59	Sim	9,3	pele (interdigital)	AEF	<i>Candida albicans</i>
5	M	55	Não	6,7	unha do pé	FM	<i>Trichophyton rubrum</i>
6	F	62	Não	5,6	unha do pé	AEF	<i>Fusarium solani</i>
7	F	52	Não	7,1	pele	LEV	<i>Malassezia sp</i>
8	F	64	Não	7,04	unha do pé	FM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
9	F	53	Não	8,8	unha do pé	FM	<i>Trichophyton rubrum</i>
10	F	66	Sim	7,8	unha da mão	LEV	<i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i>
11	F	68	Não	7,2	unha do pé	FM	<i>Trichophyton rubrum</i>
12	M	70	Não	8,9	unha do pé	AEF	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
13	F	57	Não	7,4	unha do pé	FNV	<i>Fusarium oxysporum</i>
14	F	66	Sim	7,27	unha do pé	FM	<i>Trichophyton rubrum</i>
15	F	64	Sim	8,1	unha da mão	LEV	<i>Candida albicans</i>
16	F	95	Não	6,8	unha do pé couro cabeludo	FM LEV	<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Malassezia sp</i>
17	M	64	Sim	7,04	unha do pé	FNV	<i>Trichophyton rubrum</i>

FM= filamentos micelianos; LEV = leveduras; FNV = fungos não visualizados; AEF = Abundantes estruturas fungicas;

Para relação fungo hospedeiro foi escolhido aleatoriamente fungos isolados da paciente n= 10, a qual apresentava uma lesão típica de onicomicose, com paroníquia, em dedo da mão. Nesse caso foram isoladas duas espécies de leveduras (*C. albicans* e *C. parapsilosis*). Essas leveduras foram usadas em testes *in vitro* frente a células fagocíticas animais, avaliando a resistência à fagocitose e à consequente morte celular (*killing*). Foi possível observar que *C. albicans* foi reconhecida pelos fagócitos da mesma forma que a cepa ATCC, houve a internalização, porém esses fagócitos falharam em relação aos eventos de *killing* (Figura 1 B), pois não houve diferença significativa entre as leveduras expostas e o controle não exposto aos fagócitos. Já em relação a *C. parapsilosis*, apesar de menor internalização (Figura 1 C), observou-se o mesmo mecanismo de resistência à morte.





**Figura 1 - Resistência de leveduras isoladas de paciente diabético (Ca W = *Candida albicans* e Cp W = *Candida parapsilosis*) à fagocitose (A e C) e atividade microbicida (B e D).**

Avaliação *in vitro* à ação de fagócitos peritoneais de camundongos Balb/C diabéticos, em comparação com as respectivas cepas de referência ATCC. Diferença estatística ao nível de significância 0,05 detectada apenas em relação à fagocitose por *C. parapsilosis* isolada de paciente diabético.

#### 4. DISCUSSÃO

A frequência de dermatomicose nos pacientes com DM e idade superior a 50 anos, foi de 45,9 %. De fato, esse dado é superior ao encontrado na população geral (13), e também superior ao encontrado em pacientes com DM na Tailândia, com taxas de 31,9% (6). Porém, está na mesma faixa dos 46% encontrados em diabéticos, em estudo semelhante também realizado no sul do Brasil (11) bem, como em Camarões que foi de 50,7% (12). Ressaltamos que esses estudos foram realizados em serviços de saúde, com pacientes triados clinicamente, essa constatação torna nossos achados ainda mais relevantes, uma vez que em nosso estudo, os voluntários não passaram por triagem clínica prévia sobre micose. No presente estudo todos os diabéticos foram convidados a participar da pesquisa e o aceite ou não foi espontâneo.

Nossa casuística teve o predomínio de mulheres, representando 81,1% da amostra (30/37) e, foi confirmada laboratorialmente a dermatomicose em 43,3% (13/30). Apesar dos homens serem o grupo minoritário (18,9%), houve confirmação de dermatomicose em 57,1% (4/7).

Esses dados são concordantes com dados publicados pela Pesquisa Nacional de Saúde (2), onde micoses foram mais frequentes nas mulheres. Porém não é consenso na literatura, pois outros autores têm encontrado maior comprometimento no sexo masculino (13).

A Tabela 1 mostra que os diabéticos com micoses tinham uma média maior, apesar de não significativo, dos níveis glicêmicos do que aqueles sem diagnóstico de fungos, sem diferença significativa quanto ao controle glicêmico. Por outro lado, analisando os indivíduos insulino dependentes, observa-se que do total de oito, cinco (62,5%) tinham micose (Tabela 2), além disso, entre esses indivíduos, o valor da HG foi ligeiramente maior (7,9 %) em comparação aos demais (7,1%). Esse raciocínio sugere que micoses estariam mais associadas ao pobre controle da DM, concordando com outros autores (14). Quanto ao perfil lipídico, bem como a função renal os resultados encontraram-se dentro da normalidade.

Como consequência da deficiência da insulina, frequentemente observa-se alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (15). Entretanto, essas alterações metabólicas não foram detectadas neste estudo. Os dados bioquímicos encontrados sugerem uma população metabolicamente

controlada, possivelmente por se tratar de um grupo de pacientes que fazem parte do programa HiperDia do Ministério da Saúde e são acompanhados semanalmente por profissionais de saúde.

Entre os agentes isolados, o grupo dos dermatófitos foi predominante (52,3%), sendo *Trichophyton rubrum*, o agente mais isolado, corroborando também os achados mais frequentes no mundo (12). Interessante notar que todos os fungos oportunistas detectados (leveduras e FFND) foram encontrados em pessoas do gênero feminino. Já no gênero masculino fungos dermatófitos foram encontrados nos quatro pacientes com dermatomicose, por outro lado, em seis mulheres também foi isolado dermatófitos. As espécies de dermatófitos mais prevalentes foram as pertencentes aos complexos *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, o que está de acordo com a literatura mundial (12).

A partir da relação positiva entre DM e infecção fúngica, optou-se por fazer uma avaliação mais aprimorada quanto ao comportamento dos fungos isolados dos pacientes com DM frente a fagócitos de hospedeiro diabético. Apesar da maior frequência de fungos dermatófitos, foi utilizado as leveduras, pois representam um modelo universal de onicomicose (11). Assim, foi selecionado leveduras isoladas de unha de mãos com paroníquia, oriunda de paciente do sexo feminino e com DM. Fagócitos peritoneais de camundongos Balb/C diabéticos foram desafiados com isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (CaW e CpW), e respectivas cepas ATCC. De acordo com a Figura 1, CaW foi ligeiramente mais sensível à fagocitose do que a cepa de referência. Por outro lado, CpW foi estatisticamente mais sensível à fagocitose ( $p < 0,05$ ), com taxa de fagocitose 1,5 vezes menor comparando com a cepa ATCC.

Uma vez que a atividade microbicida é o evento sequencial à fagocitose, nós buscamos avaliar o desfecho dessa interação determinando a taxa de morte (*killing*) Nesse sentido, a Figura 1 B e D mostram que essas células fagocíticas foram deficientes na atividade microbicida sobre CaW e CpW independente da taxa de fagocitose. *C. parapsilosis* foi mais eficiente em evadir dos fagócitos de animais diabéticos do que *C. albicans* (Figura 1 C). De fato, a literatura mostra que a atividade microbicida dos fagócitos de pacientes com DM é menos eficiente devido às alterações metabólicas decorrentes da presença da hiperglicemia crônica (6). Adicionalmente, nosso estudo mostrou que os pacientes possuem altas taxas de HG, contribuindo para um mecanismo importante de permanência fúngica nesses hospedeiros e aumento das infecções.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo mostram que os pacientes diabéticos possuem altas taxas de infecção fúngica, sendo os dermatófitos os agentes mais frequentes. Além disso, nossos resultados sugerem que a predisposição do hospedeiro diabético no desenvolvimento de fungos agentes de dermatomicoses, pode estar relacionado à falha na ativação de fagócitos, uma vez que, apesar de existir interação entre o fungo e as células fagocíticas, o mecanismo de morte não foi eficiente. Esses resultados contribuem para afirmar a susceptibilidade do paciente com DM às infecções fúngicas.

## FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, aos Gestores de Saúde do Município de Ivatuba, e ao Colégio e Faculdade Instituto Adventista Paranaense.

## REFERÊNCIAS

1. Choa NH, Shawb CJES, Karurangaa Y, Huang, da Rocha Fernandes JD, Ohloggea a AW, Malandaa B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Apr;138:271-81. doi:https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023.
2. Iser BPM, Stopa SR, Chueiri PS, Szwarcwald CL, Malta DC, Monteiro HOC et al. Self-reported diabetes prevalence in Brazil: results from National Health Survey 2013. Prevalencia de diabetes autorreferida en Brasil: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2013. *Epidemiol Serv Saúde.* 2015; 24(2). doi: https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000200013 [Acesso em 16 Jul 2019]; Disponível em: https://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S2237-96222015000200305.
3. Lima AL, Illing T, Schliemann S, Elsner P. Cutaneous manifestations of *Diabetes Mellitus*: A Review. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(4):541–53. doi: 10.1007/s40257-017-0275-z.
4. Sanches MM, Roda A, Pimenta R, Filipe PL, Freitas JP. Manifestações cutâneas da *Diabetes Mellitus* e pré-diabetes. *Acta Med Port.* 2019;32(6):459–65. doi: https://doi.org/10.20344/amp.10738.
5. Poradzka A, Jasik M, Karnafel W, Fiedor P. Clinical aspects of fungal infections in diabetes. *Acta Pol Pharm.* 2013;70(4):587-96. PubMed PMID: 23923382.
6. Assadamongkol R, Lertwattanarak R, Wannachalee, Bunyaratavej S, Leeyaphan C, Matthapan L.

- Prevalence, risk factors, and type of organism in fungal foot infection and toenail onychomycosis in thai diabetic patients. J Med Assoc Thai. 2016;99(6):659-64. PubMed PMID: 29900728.
7. Calsolari MR, de Castro RF, Maia RM, Maia FCP, de Castro AV, Reis R, et al. Análise retrospectiva dos pés de pacientes diabéticos do ambulatório de diabetes da Santa Casa de Belo Horizonte. Mg arq Bras Endocrinol Metab. 2002; 46(2):173-6.
  8. Öztürk AM, Taşbakan MI, Metin DY, Yener C, Uysa S, Simşir IY, et al. A neglected causative agent in diabetic foot infection: a retrospective evaluation of 13 patients with fungal etiology. Turk J Med Sci. 2019; 49(1):81-86. <http://journals.tubitak.gov.tr/medical/>: doi:10.3906/sag-1809-74.
  9. Akkus G ,Evrans M, Gungor D, Karakas M, Sert M , Tetiker T. *Tinea pedis* and onychomycosis frequency in *diabetes mellitus* patients and diabetic foot ulcers. A cross sectional – observational study. Pak J Med Sci. 2016;32(4):891–5. doi: 10.12669/pjms.324.10027. PMCID: PMC5017097 PubMed PMID: 27648034.
  10. Foss NT, Polon DP, Takada MH, Foss FMC. Skin lesions in diabetic patients. Rev Saúde Pública. 2005;39(4):01-5. PMID: 16113921. doi: 10.1590/s0034-89102005000400024.
  11. Dahlke RJ, Tatiani KRB, Ana P, Caio MM de C. Micoses superficiais em pacientes com *diabetes mellitus* atendidos em um ambulatório geral em Blumenau, SC. Rbac. 2015;47(4):170-3.
  12. Eba M, Njunda A, Mouliom RN, Kwenti ET, Fuh AN, Nchanji GT, et al. Onychomycosis in diabetic patients in Fako Division of Cameroon: prevalence causative agents, associated factors and antifungal sensitivity patterns. BMC Res Notes. 2016;9(1):494. doi:10.1186/s13104-016-2302-1.
  13. Oz Y, Goraan I, Oz A, Balta I. Prevalence and epidemiology of *tinea pedis* and toenail onychomycosis and antifungal susceptibility of the causative agents in patients with type 2 diabetes in turkey. Int J Dermatol. 2017;56(1):68-74.
  14. Tamayo GS, López-Jácome LE, Sanchez JR, Cendejas RF, Zulueta PR, et al. Higher *in vitro* proliferation rate of *Rhizopus oryzae* in blood of diabetic individuals in chronic glycaemic control compared with non-diabetic individuals. Journal List. Springer Open Choice. Mycopathologia. 2017;182(11):1005–14. doi: 10.1007/s11046-017-0174-0. PMCID: PMC5684257. PMID: 28685375.
  15. López-Jaramillo P, Barbosa E, Molina DI, Sanchez R, Diaz M, Camacho PA et al. Latin American Consensus on the management of hypertension in the patient with diabetes and the metabolic syndrome. Hypertens. 2019;37(6):1126-47. doi: 10.1097/HJH.0000000000002072.

**Palavras-chave:** dermatomicose; *diabetes mellitus*; fungos.

# EVIDÊNCIAS DO USO DO PROBIÓTICO *Lactobacillus reuteri* PARA REDUÇÃO DA CÓLICA INFANTIL EM BEBÊS ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE OU PREDOMINANTEMENTE COM LEITE MATERNO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Angela Pierina dos Reis Buzzo Zermiani<sup>1</sup>; Ana Luiza Pelissari Peçanha de Paula Soares<sup>1</sup>; Bárbara da Silva Guedes de Moura<sup>2</sup>; Edson Arpini Miguel<sup>3</sup>; Luciana Dias Ghiraldi Lopes<sup>4</sup>; Natália de Carvalho Scharf Santana<sup>2</sup>; Thais da Silva Santos<sup>2</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Medicina, Hospital Universitário de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: angelabuzzo@hotmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

O choro inconsolável de recém-nascido é um problema enfrentado por bebês em nível mundial(1), podendo ser classificado como cólica quando descartados outros diagnósticos de desconforto intestinal(2). A etiologia do choro ainda permanece incompleta e apesar de seu caráter benigno(3), o choro diário que perdura por horas representa para os cuidadores um grande fardo, facilitando inclusive o desenvolvimento de depressão materna(4) e o desmame precoce(5).

A formação da microbiota se inicia no útero materno e posteriormente é influenciada por outros fatores importantes que envolvem o tipo de alimentação, exposição pré-natal da mãe à animais e microorganismos diferentes, o tipo de parto, a exposição da gestante e/ou bebê à antibióticos e o tipo de ambiente imediato em que o bebê é exposto após o nascimento(6). Diferenças entre a microbiota de bebês amamentados e bebês alimentados por fórmulas lácteas são relatados por pesquisadores(7).

A relação entre disbiose em bebês em seus primeiros dias de vida com o aparecimento de disfunções orgânicas no futuro foi demonstrada em pesquisas(8). Uma das consequências de uma flora intestinal desregulada, seria inflamação entérica, causada pela presença de bactérias patogênicas em desequilíbrio com as que atuam de forma benéfica(9). Um estudo que avaliou a presença do marcador inflamatório calprotectina nas fezes de bebês com 2 meses de idade, associou sua presença como fator de risco para o desenvolvimento futuro de dermatite atópica e asma na idade de 6 anos(8). Outros pesquisadores atribuem à disbiose, problemas como enterocolite necrosante do recém-nascido, doença do refluxo gastroesofágico, diarreias, cólicas e outros fatores (10–14). Estudo recente comprovou um maior número de marcadores inflamatórios nas fezes de bebês que apresentavam cólica, reforçando a hipótese de inflamação intestinal como causadora da motilidade intestinal anormal(3).

Diversas pesquisas vêm comprovando a eficácia de tratamento e prevenção da cólica por meio de uso de probióticos. Os estudos têm demonstrado a capacidade dos probióticos para a redução de maneira significativa do tempo de choro de bebês recém-nascidos (4,12,15–18). As evidências destacam que o *Lactobacillus reuteri* estaria envolvido na manutenção de uma flora intestinal equilibrada a ponto de competir com microorganismos patogênicos causadores de inflamações intestinais locais(15,17). Estudo de meta-análise realizado em 2017, que compara a eficácia do probiótico com outros tratamentos convencionais concluiu que a escolha do probiótico parece ser a mais assertiva para a diminuição da cólica (19).

No entanto, existem ainda muitos caminhos a serem explorados frente ao assunto. Outros pesquisadores suplementaram gestantes com probióticos e observaram significativa redução de sintomas gastrointestinais nos bebês amamentados(20,21) aumentando a capacidade imunorregulatória nas dosagens do probiótico recebidas desde o período pré-natal até os dois anos de idade(22). Um recente estudo envolvendo pesquisas sobre probióticos que compõem o leite materno traz contribuições sobre ocorrência de translocação bacteriana por meio de uma suposta via enteromamária. O estudo destaca que o conhecimento destes fatos poderia propiciar oportunidades para se obter maior controle sobre uma microbiota desregulada(23) e, portanto, prevenção de muitas doenças. Paralelamente, outra pesquisa agregou informações sobre a transferência de lactobacilli da flora intestinal materna para o leite materno e



posteriormente para o intestino do bebê, fortalecendo o papel da microbiota na prevenção de infecções e desenvolvimento da imunidade humoral (16).

A pesquisa teve como objetivo identificar as publicações científicas em base de dados sobre as evidências para o tratamento e prevenção de cólica infantil por meio da suplementação do *Lactobacillus reuteri* em lactentes amamentados exclusivamente ou predominantemente com leite materno.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Estratégia de busca bibliográfica ou Estratégia de Pesquisa**

A pesquisa foi conduzida de acordo com o protocolo PRISMA (24). Na primeira etapa foi realizada a definição de descritores da pesquisa por dois pesquisadores (APRBZ, JJVT). As bases de dados utilizados para busca de artigos foram Pubmed e Web of Science. A busca das publicações no Pubmed seguiu a estratégia via *MeSH* termos (*Medical Subject Headings*) e no Web of Science a busca foi realizada por tópicos. Para cada uma das bases os termos foram organizados em três blocos e relacionados entre si. No primeiro bloco constava os termos “colic”; “gastrointestinal diseases”; “inflammatory bowel disease”; “crying”; “dysbiosis”; o bloco 2: “gastrointestinal microbiome”; “*Lactobacillus reuteri*”; e no bloco 3: “mammary glands”; “milk, human”; “breastfeeding”; “infant, newborn”; “infant”. Utilizamos o booleanos OR para o cruzamento dos termos intra blocos e o booleano AND para associar os 3 blocos. Para ampliar a sensibilidade da busca no no Pubmed, também realizamos buscas por termos livres, usando os seguintes termos: *Lactobacillus reuteri*, colic, gastrointestinal diseases, breast-feeding, human milk, crying e infant. Os filtros aplicados para direcionamento das publicações disponíveis até fevereiro de 2019 no Pubmed e no Web of Science foram para idioma (inglês, português e espanhol).

### **2.2. Critérios de seleção dos artigos**

Com base nos títulos e resumos, a segunda etapa foi selecionar os artigos que contemplassem o objetivo do estudo. Para esta etapa, um grupo de 4 pesquisadores (APRBZ, ALPPPS, BLSGM e TSS) se reuniram e por consenso selecionaram os artigos de interesse. Revisões sistemáticas, meta-análises, editoriais, cartas, erratas, comentários, entrevistas, notícias, estudos comparativos e patentes foram excluídos. Devido ensaios clínicos anteriores não terem observado melhoras do tempo de choro diário em crianças alimentadas apenas com fórmula infantil, excluímos de trabalhos em que a amamentação das crianças não se dava exclusiva ou predominantemente por leite materno, ou que não deixassem claro o tipo de alimentação que o bebê recebeu. Outro fator que fortaleceu a decisão foi pela pesquisa que demonstrou que o leite humano poderia agir como fator de proteção contra disfunções enterais(25). Essa medida foi tomada para reduzir o risco de viés de seleção. A figura 1 descreve as etapas utilizadas para a seleção dos artigos.

### **2.3. Avaliação da qualidade dos artigos**

Para a terceira fase foi realizada a leitura completa de 24 artigos em PDF que foram selecionados por consenso na etapa anterior. Para ampliar a sensibilidade da pesquisa, também foram conferidas as referências bibliográficas dos artigos. Para avaliação do risco de viés foi utilizado o software Review Manager (RevMan) 5.3.

### **2.4. Extração dos dados**

Para extração de dados e inclusão na revisão sistemática foram selecionados 10 estudos. O grupo formado pelos pesquisadores APRBZ, ALPPPS, BLSGM e TSS se reuniram para definir as informações que fariam parte da tabela e após preenchimento, se encontrou novamente para ajustes por consenso. Foram extraídas informações consideradas relevantes de cada artigo: autor, país, dia em que o acompanhamento foi registrado, tempo de tratamento, histórico familiar de doença gastrointestinal e atópica, amostra inicial e final, população controle, média de idade infantil, tipo de aleitamento, gênero, tipo de parto, idade gestacional, peso ao nascer, método usado para avaliação do choro, existência de avaliação fecal, resultados e conclusão.

### **2.5. Avaliação da qualidade dos artigos e tabelas pelos especialistas**

Um segundo grupo, de juízes, formado pelos pesquisadores BLSGM, NCSS, LDGL e EAM avaliaram cada artigo selecionado e os dados extraídos nas tabelas. Nesta etapa, por consenso, um dos artigos foi excluído por julgarem que não atendia ao objetivo do trabalho, restando 10 estudos para inclusão na Revisão Sistemática.

## **3. RESULTADOS**

Foram aprovados para análise de dados, 10 ensaios clínicos (15,16,26–31), conforme descrito na figura 1, com publicações entre 2007 a 2018 e 7 deles apresentaram número de registro de pesquisa clínica

(15,16,18,28,29,31,32). A população estudada foi de bebês diagnosticados com cólica (classificados na maioria pelo protocolo de Wessel ou Wessel modificado), com idades entre 11 e 81 dias, sendo mais comum crianças com idade entre 20 e 40 dias de vida. A alimentação dos bebês se deu exclusivamente ou predominantemente por leite materno. A amostra total inicial foi de 1102 pacientes e final de 477, excluindo um estudo (29), que utilizou os mesmos pacientes acompanhados para outra pesquisa (15) para avaliação das fezes dessas crianças, sendo composta por 47,7% de meninas e 52,3% por meninos. Dos estudos que apresentaram o tipo de parto (15,16,18,26–29), 76% das crianças nasceram por parto vaginal, distribuídas em 47% no grupo tratamento e 53% no grupo placebo.

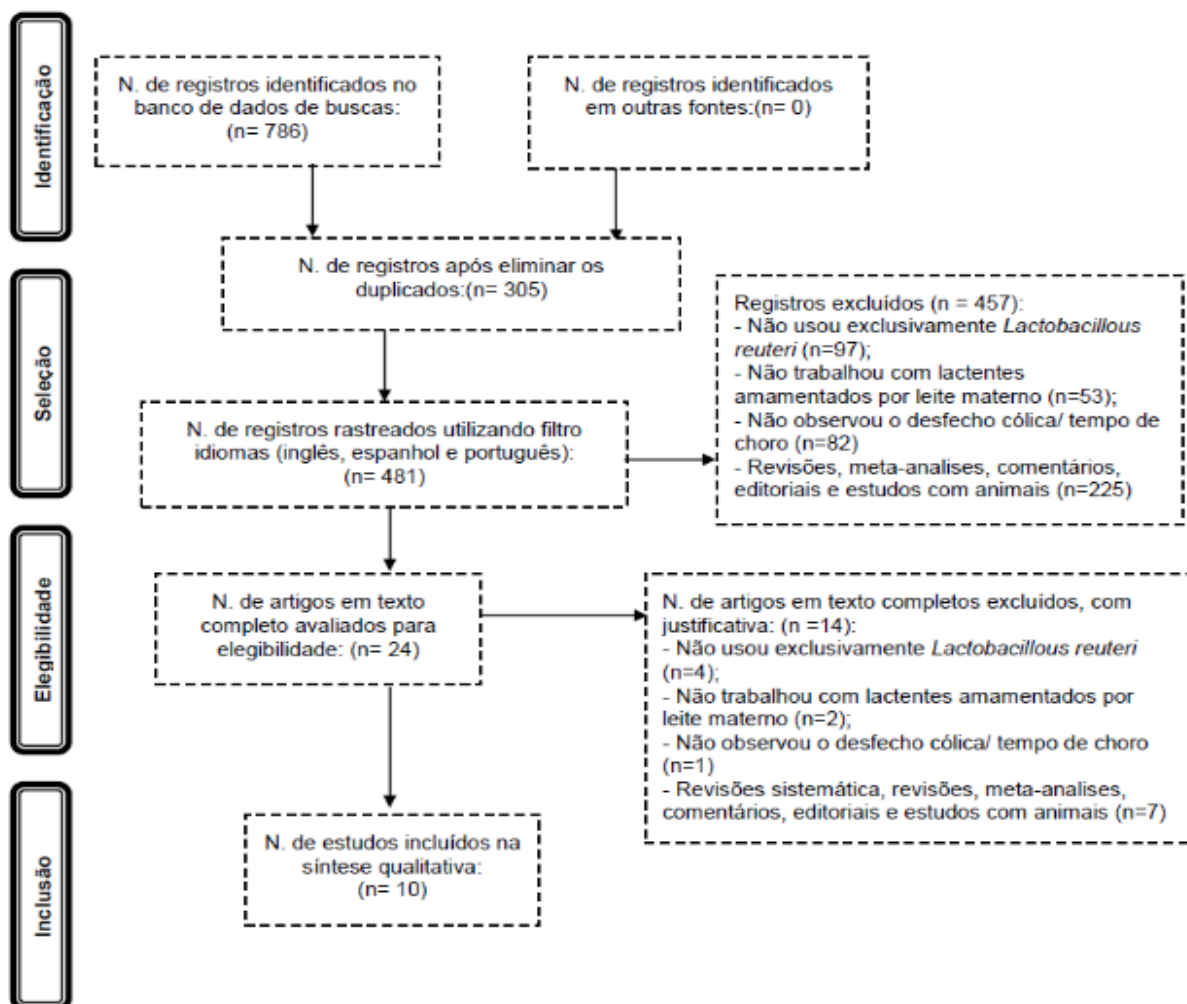


Figura 1. Fluxograma dos artigos selecionados para a revisão sistemática.

Um dos autores, além de observar resultado na diminuição significativa do tempo de choro do bebê também concluiu que as mães dos bebês tratados com *Lactobacillus reuteri* apresentaram menor risco em desenvolver depressão materna comparado ao grupo placebo e sugeriu que este resultado pode ser ainda melhor quando a amamentação se dá exclusivamente por leite materno(4).

Os autores de 8 trabalhos testaram a administração 5 gotas por dia de suspensão oleosa oral de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 ( $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia) versus placebo(4,15,16,21,27-29, 31) e 1 estudo testou a mesma dosagem de *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 versus simeticona (27). Nenhuma das publicações registrou efeito adverso. Em todos, o tempo de choro e/ou agitação foi registrado pelos pais diariamente e a duração do tratamento durou 21, 28, 30 ou 42 dias. Os autores apresentaram os registros iniciais (medição feita antes do início da intervenção com *L. reuteri* ou placebo) e após 1, 2, 3 e 4 semanas. Além do tempo de choro, alguns analisaram a composição das fezes dos pacientes acompanhados. Um deles encontrou no vigésimo primeiro dia, presença do *Lactobacillus reuteri* nas fezes de 12 dos 13 bebês que receberam o probiótico, enquanto no grupo placebo não encontrado em nenhuma criança(15). Os resultados da intervenção sobre o tempo de choro/dia estão destacados na tabela 1.

**Tabela 1. Resultados reportados nos artigos selecionados para revisão sistemática referente ao tempo de choro dos neonatos com diagnóstico com cólica que receberam intervenção por *L. reuteri* ou placebo.**

Autor	Intervenção	N	Tempo de Choro, minutos/dia, média (IIQ ou DP)								
			(Dia 0)	(Dia 7)	p-valor	(Dia 14)	p-valor	(Dia 21)	p-valor	(Dia 28-30)	p-valor
(27)	L	41	197 (180-276)	159 (54-211)	<0,01	95 (41-170)	<0,001	74 (35-139)	<0,001	51 (26-105)	<0,001
	P	42	197 (180-278)	177 (38-241)		153 (51-231)		154 (54-229)		145 (70-191)	
(4)	L	20	200 ± 6,3	162,75 ± 10,9	<0,01	112,75 ± 18,4	<0,01	82,20 ± 17,1	<0,01	32,05 ± 8,3	<0,01
	P	19	200,68 ± 8,3	197,89 ± 7,96		169,21 ± 13,6		137,11 ± 18,3		120,63 ± 20,0	
(32)	L	32	299,66 ± 27,5	-	-	118,32 ± 21,1	0,03	95,11 ± 16,3	0,01	74,67 ± 25,04	0,001
	P	22	305,41 ± 30,1	-		226,31 ± 19,8		187,68 ± 31,9		147,85 ± 38	
(16)	L	40	240 (210-270)	180 (149-180)	<0,01	105 (101-120)	<0,001	75 (60-90)	<0,001	52 (45-75)	<0,0001
	P	40	240 (203-278)	180 (150-210)		150 (120-180)		128 (116-150)		120 (90-128)	
(15)	L	25	370 (60-180)	95 (43-128)	0,08	60 (35-105)	0,10	35 (43-128)	0,02	-	-
	P	25	300 (75-225)	185 (75-224)		150 (73-218)		90 (74-222)		-	-
(18)	L	24	131 (84-149)	90 (53-129)	0,03	75 (54-103)	0,02	60 (35-99)	0,05	-	-
	P	28	122 (88-163)	120 (91-149)		103 (78-140)		102 (61-148)		-	-
(31)	L	13	109,5 (70-185)	-	-	-	-	19 (6-56)	0,92	-	-
	P	7	96 (38-140)	-		-		17 (3-81)		-	-
(30)	L	18	302,3 ±19,9	-	-	-	-	-	-	76,75 ±22,2	<0,001
	P	12	312,69 ±15,7	-		-		-		194,32 ±33,9	>0,05

L: Pacientes que usaram *L. reuteri*; P: Pacientes que usaram o placebo; IIQ: Intervalo Interquartil; DP: Desvio padrão;.

#### 4. DISCUSSÃO

Conforme mostrado na tabela 1, nem todos os estudos selecionados destacaram o a presença de acompanhamento de seus pacientes semanalmente, mas a maioria (4,15,16,25,28,29,31) registrou o tempo de choro prévio e com 21 dias após o início da administração do probiótico ou placebo. Nota-se que de cinco publicações que registraram o resultado após uma semana de intervenção, quatro deles obtiveram um valor de  $p < 0,05$ . Na segunda semana, seis artigos trouxeram resultados, sendo que cinco deles já mostraram eficácia significativa na redução de tempo de choro nos pacientes do grupo tratamento em comparação com o grupo placebo. No vigésimo primeiro dia, houve registro de sete estudos, onde seis deles apresentaram valores significativos e o outro, um valor de  $p = 0,92$ , porém, com número de amostra baixa, o que pode mascarar o resultado. Cinco estudos mediram o tempo de choro no dia 28 e todos eles obtiveram um valor de  $p < 0,001$ . O trabalho onde os pesquisadores acompanharam por tempo maior os seus pacientes encontrou redução em 66% do tempo de choro no grupo placebo ao final dos 42 dias, sugerindo que os sintomas de cólica pudessem se resolver sozinhos a partir de 3 semanas. Entretanto, esse artigo apresenta limitações quanto a sua quantidade amostral, que é baixa (31).

Um estudo de meta-análise de 2018 que avaliou se os resultados da intervenção do *Lactobacillus reuteri* para melhora da cólica variam de acordo com o tipo de aleitamento aponta que os resultados obtidos com pacientes alimentados com leite materno são drasticamente superiores àqueles que foram alimentados com fórmula láctea(33). Outra pesquisa demonstrou que o oligossacarídeo do leite humano, agiria como fator de proteção contra disfunções enterais(25). O que se pode deduzir é que provavelmente o prebiótico contido no leite materno alimente os organismos benéficos e contribuam para a manutenção da microbiota saudável.

Por este motivo, para reduzir o risco de viés de seleção, excluímos de nossa revisão sistemática trabalhos em que a amamentação das crianças não se priorizava exclusiva ou predominantemente leite materno, ou que não deixassem claro o tipo de alimentação que o bebê recebeu. Alguns artigos até discriminaram inicialmente o número de pacientes que receberam leite humano ou fórmula, mas não relataram estes dados nos resultados e, portanto, não foram aqui incluídos.

Partindo do pressuposto que a formação da microbiota do indivíduo se dá por alguns fatores(6), seria interessante analisar uma associação entre o tipo de parto e o tipo de intervenção para melhora da cólica (se placebo ou probiótico), a fim de verificar se as crianças que tiveram contato com a flora vaginal da mãe (76% da amostra, divididas em 47% para o grupo *L. reuteri* e 53% no grupo placebo) apresentariam melhor resultado do que as nascidas por cesariana. Porém, os trabalhos que discriminaram a porcentagem de sua amostra em diferentes tipos de parto, não trouxeram esta separação nos resultados, impossibilitando nossa comparação.

## 5. CONCLUSÃO

A revisão sistemática evidenciou que a maioria das publicações com administração do *Lactobacillus reuteri* para bebês alimentados exclusiva ou predominantemente com leite materno reduziu o tempo de choro em bebês diagnosticados com cólica. Os dados apresentam a redução do tempo de choro das crianças a partir do sétimo dia de tratamento.

## REFERÊNCIAS

1. Lucassen PLBJ, Assendelft WJJ, Gubbels JW, Douwes AC, Geldrop WJ Van. Systematic review of the occurrence of infantile colic in the community. 2001;(March 1998):398–403.
2. Johnson JD, Cocker K, Chang E. Infantile Colic: Recognition and Treatment. 2015 [cited 2018 Jul 6];92(7). Available from: [www.aafp.org/afp](http://www.aafp.org/afp)
3. Savino F, Garro M, Montanari P, Galliano I, Bergallo M. Crying Time and RORγ/FOXP3 Expression in *Lactobacillus reuteri* DSM17938-Treated Infants with Colic: A Randomized Trial. *J Pediatr*. 2018 Jan 1;192:171-177.e1.
4. Mi GL, Zhao L, Qiao DD, Kang WQ, Tang MQ, Xu JK. Effectiveness of *Lactobacillus reuteri* in infantile colic and colicky induced maternal depression: a prospective single blind randomized trial. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2015;
5. Howard CR, Lanphear N, Lanphear BP, Eberly S, Lawrence RA. Parental responses to infant crying and colic: the effect on breastfeeding duration. *Breastfeed Med*. 2006;1(3):146–55.
6. Khurshid M, Aslam B, Nisar MA, Akbar R, Rahman H, Khan AA, et al. Bacterial munch for infants: Potential pediatric therapeutic interventions of probiotics. *Future Microbiol*. 2015;10(11):1881–95.
7. Savino F, Cresi F, Pautasso S, Palumeri E, Tullio V, Roana J, et al. Intestinal microflora in breastfed colicky and non-colicky infants. *Acta Paediatr [Internet]*. 2007 Jan 2;93(6):825–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2004.tb03025.x>
8. Orivuori L, Mustonen K, de Goffau MC, Hakala S, Paasela M, Roudit C, et al. High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(5):928–39.
9. Lin P. The role of the intestinal microbiome in ocular inflammatory disease. *Curr Opin Ophthalmol [Internet]*. 2018 Mar [cited 2018 Jul 10];29(3):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29538183>
10. Maragkoudaki M, Chouliaras G, Moutafi A, Thomas A, Orfanakou A, Papadopoulou A. Efficacy of an oral rehydration solution enriched with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and Zinc in the management of acute diarrhoea in infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2018;10(9).
11. Urbańska M, Gieruszczak-Białek D, Szymański H, Szajewska H. Effectiveness of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the Prevention of Nosocomial Diarrhea in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(2):142–5.
12. Indrio F, Di Mauro A, Riezzo G, Civardi E, Intini C, Corvaglia L, et al. Prophylactic Use of a Probiotic in the Prevention of Colic, Regurgitation, and Functional Constipation. *JAMA Pediatr [Internet]*. 2014 Mar 1 [cited 2018 Jul 9];168(3):228. Available from: <http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamapediatrics.2013.4367>
13. Thomas CM, Saulnier DMA, Spinler JK, Hemarajata P, Gao C, Jones SE, et al. Fcγ2-mediated folate metabolism contributes to suppression of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Microbiologyopen*. 2016;5(5):802–18.
14. P.D. H, W.A. W. From birth to “immunohealth,” allergies and enterocolitis. *J Clin Gastroenterol [Internet]*. 2015;49(December):S7–12. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L606457119>
15. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM



- 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics* [Internet]. 2010 Sep 16 [cited 2018 Jul 9];126(3):e526-33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713478>
16. Szajewska H, Gyrzczuk E, Horvath A. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the Management of Infantile Colic in Breastfed Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Pediatr* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2018 Jul 9];162(2):257-62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347612009201>
  17. Sung V, Hiscock H, Tang MLK, Mensah FK, Nation ML, Satzke C, et al. Treating infant colic with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: double blind, placebo controlled randomised trial. *BMJ* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2018 Jul 9];348:g2107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690625>
  18. Chau K, Lau E, Greenberg S, Jacobson S, Yazdani-Brojeni P, Verma N, et al. Probiotics for infantile colic: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial investigating *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *J Pediatr*. 2015 Jan 1;166(1):74-78.e1.
  19. Gutiérrez-Castrellón P, Indrio F, Bolio-Galvis A, Jiménez-Gutiérrez C, Jimenez-Escobar I, López-Velázquez G. Efficacy of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for infantile colic: Systematic review with network meta-analysis. *Med (United States)*. 2017;96(51).
  20. Symptoms F, Clinical AR, Baldassarre ME, Mauro A Di, Mastromarino P, Fanelli M, et al. Administration of a Multi-Strain Probiotic Product to Women in the Perinatal Period Differentially Affects the Breast Milk Cytokine Profile and May Have. :1-13.
  21. Garofoli F, Civardi E, Indrio F, Mazzucchelli I, Angelini M, Tinelli C, et al. The early administration of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 controls regurgitation episodes in full-term breastfed infants. *Int J Food Sci Nutr*. 2014;65(5):646-8.
  22. Forsberg A, Abrahamsson TR, Björkstén B, Jenmalm MC. Pre- and post-natal *Lactobacillus reuteri* supplementation decreases allergen responsiveness in infancy. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2013 Apr [cited 2018 Jul 9];43(4):434-42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cea.12082>
  23. Salminen S, Szajewska H, Bergmann H, Rodrı JM. Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition : a workshop report *British Journal of Nutrition*. 2018;(2014):1119-28.
  24. Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (prisma-p) 2015: Elaboration and explanation. *BMJ* [Internet]. 2015;349(January):1-25. Available from: <http://dx.doi.org/doi:10.1136/bmj.g7647>
  25. Bering SB. Human milk oligosaccharides to prevent gut dysfunction and necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Nutrients*. 2018;10(10).
  26. Garofoli F, Civardi E, Indrio F, Mazzucchelli I, Angelini M, Tinelli C, et al. The early administration of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 controls regurgitation episodes in full-term breastfed infants. *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2014 Aug 17 [cited 2018 Jul 9];65(5):646-8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2014.898251>
  27. Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) Versus Simethicone in the Treatment of Infantile Colic: A Prospective Randomized Study. *Pediatrics* [Internet]. 2007 Jan 1;119(1):e124-30. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2006-1222>
  28. Mi GL, Zhao L, Qiao DD, Kang WQ, Tang MQ, Xu JK. Effectiveness of *Lactobacillus reuteri* in infantile colic and colicky induced maternal depression: a prospective single blind randomized trial. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2015 Jun 22;107(6):1547-53.
  29. Roos S, Dicksved J, Tarasco V, Locatelli E, Ricceri F, Grandin U, et al. 454 Pyrosequencing Analysis on Faecal Samples from a Randomized DBPC Trial of Colicky Infants Treated with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *PLoS One*. 2013 Feb 28;8(2).
  30. Savino F, Galliano I, Garro M, Savino A, Daprà V, Montanari P, et al. Regulatory T cells and Toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression in infants with colic treated with *Lactobacillus reuteri* DSM17938. *Benef Microbes*. 2018;9(6):917-25.
  31. Ournal THEJ, Ediatrics OFP, Trial RC, Fatheree NY, Liu Y, Taylor CM, et al. *Lactobacillus reuteri* for Infants with Colic: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. *J Pediatr* [Internet]. 2017;191:170-178.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.07.036>
  32. Savino F, Garro M, Montanari P, Galliano I, Bergallo M. Crying Time and RORγ/FOXP3 Expression in *Lactobacillus reuteri* DSM17938-Treated Infants with Colic: A Randomized Trial. *J Pediatr* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2018 Jul 8];192:171-177.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347617311435>
  33. Sung V, D'Amico F, Cabana MD, Chau K, Koren G, Savino F, et al. *Lactobacillus reuteri* to treat infant colic: A meta-analysis. *Pediatrics*. 2018.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus reuteri*; cólica; leite humano.

## CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIC PREDICTORS IN PREGNANT WOMEN WITH HEREDITARY/ACQUIRED THROMBOPHILIA TREATED IN THE HEALTH SERVICES OF MARINGÁ

Thaís da Silva Santos<sup>1</sup>; Bruno César Gomes Buranello<sup>2</sup>; Ana Beatriz Camillo Santos<sup>3</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>4</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate student, Postgraduate Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Graduate student in Medicine, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Graduate student in Biomedicine, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Professor, Postgraduate Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: thaís.silva8912@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Although pregnancy is a physiological phenomenon that is part of life experience, some women had particular characteristics that make them more likely to have poor outcomes in pregnancy. The pregnancy these women receive the classification of high-risk and need special attention because the most deaths and injuries that may arise in pregnancy are preventable. Thus, high-risk prenatal care has the purpose of modifying pregnancy outcomes, making it more favorable for both mothers and fetus (1).

Thrombophilia is defined as a state of hypercoagulability that tends to thrombosis (1, 2). It can be classified into acquired, represented mainly by antiphospholipid syndrome (APS) or hereditary. Indications for investigation of thrombophilia are past or recent cases of any thrombotic event, preeclampsia or eclampsia, recurrent pregnancy loss (RPL), intrauterine growth retardation (IUGR), fetal death, placental abruption or family history of thrombophilia (1). The risk of thrombosis for those with thrombophilia is high, about 20 to 50% of all pregnancies with a thrombosis episode (3, 4).

APS is also an autoimmune disease with one or more antiphospholipid antibodies, such as anticardiolipin antibodies (ACLs), lupus anticoagulant (LA) and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies ( $\alpha\beta$ 2GPI). For the diagnosis is necessary that in two tests, at an interval of 12 weeks, have the presence of any of these antiphospholipid antibodies. Besides, to finalize the diagnosis at least one of the following clinical criteria must be present: an episode of venous or arterial thrombosis or obstetric morbidity (5).

Inherited thrombophilia results from the presence of mutations in factors involved with coagulation, which increase the risk of thrombosis. The main inherited thrombophilia are protein C, S and antithrombin III deficiency, and factor V Leiden, prothrombin gene and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations (1, 6). The investigate of the protein C, S and antithrombin III deficiency should not do with pregnant women due to the physiological reduction that happens in pregnancy (1, 6-8).

Homozygous *MTHFR* (C677T) mutations are one of the main causes of hyperhomocysteinemia, which is strongly associated with venous thrombosis. Nevertheless, due to the lack of strong evidence of the risks of *MTHFR* C677T polymorphism (heterozygosity or homozygosity) in the absence of hyperhomocysteinemia for poor pregnancy outcomes, the *MTHFR* mutations have been not recommended the screening (6). However, some recent studies show associations between *MTHFR* (C677T and A1298C) and RPL (9-12).

The prevalence in the general population is different among inherited thrombophilia, and there is variation between race and ethnicity too. Protein S, C or antithrombin III deficiencies the prevalence in the general population is 1%, but in patients with venous thromboembolism can occur in about 7% of individuals. The Factor V Leiden mutation in Caucasians is about 4%-7%, in non-Caucasians 1%, but who had a previous history of venous thromboembolism about 21%. Prothrombin gene (G20210A) also has a higher prevalence in Caucasians with 2%-3% and nearly to 1% in non-Caucasians, but turn up only in 6% of cases of anterior venous thromboembolism. Hyperhomocysteinemia is present in 5% of the general population and 10% of patients with venous thromboembolism (13).

After due evaluation of the pregnant woman, the recommendation is that women with APS or hereditary thrombophilia should receive prophylaxis. The best moment for prophylactic use is before the

conception. If pregnancy happens without prophylaxis, should be started as soon as possible. The drug more used for thromboprophylaxis is low molecular weight heparin (LMWH), but in patients with weakly positive ACL with clinical or obstetric history, prescribe of acetylsalicylic acid (ASA) may be done (1). However, in patients with strongly positive ACL with a history of RPL or late fetal death, the combination of ASA plus LMWH got good results (1, 14, 15).

The criteria for the diagnosis of thrombophilia in pregnancy are not well-defined yet, and taken care of these patients is still based on clinical judgment (2, 16, 17). Our objective was to characterize the epidemiological and clinical-laboratory predictors of high-risk pregnant women with inherited/acquired thrombophilia forward to the health service of the Maringá.

## 2. MATERIAL AND METHODS

The cross-sectional and retrospective epidemiological study was performed at the Ambulatory of High-Risk Pregnancy in the hospital Santa Casa of Maringá in the period 2015-2016.

A total of 6,483 medical appointments and 2,832 medical records were reviewed from the outpatient assistance in which 125 patients were selected with suspected or diagnosed of hereditary or acquired thrombophilia and/or with prescription of the drug enoxaparin. The electronic medical records of patients included in the Tazy® software were used for data collection and medical records that were not available in the program or incomplete were excluded.

The researchers developed an instrument for collecting the data with the following variables: 1) socio-demographic (age, marital status, schooling, race and city of origin). 2) Clinical/obstetric, previous history of comorbidities (preeclampsia, prematurity, obesity, autoimmune disease, hypothyroidism, thrombotic event and others), obstetric (fetal death, miscarriages, intrauterine growth restriction, placental abruption, number of pregnancies, gestational age, type of delivery), addictions (smoking, alcohol and illicit drug use) and neonatal conditions (gender and birth weight). 3) Prescription drugs. 4) Laboratory data (mainly, tests for diagnosis of hereditary and acquired thrombophilia). For clipping of variables birth weight (<2,500g and  $\geq$  2,500g) and gestational age (<37 and  $\geq$ 37 weeks), it was used the reference of the World Health Organization (18). There are controversial about the definition of recurrent pregnancy loss, two versus three or more consecutive miscarriages. The literature strongly suggests the evaluation after just two losses (19, 20), so, it was used the definition two or more consecutive miscarriages for definition recurrent pregnancy loss.

In the organization and tabulation of the data was used the EpiData®3. 0.1 program database and the descriptive statistics (mean, standard deviation and frequency) and measures of effect (Odds Ratio and 95% confidence interval) with significance for  $p < 0.05$  was performed in Stata®12 and OpenEpi 3.01 (21) software.

The Internal Commission of the Santa Casa hospital and Human Research Ethics Committee of the State University of Maringá (COPEP/UEM-nº 1.889.649/17) approved this research.

## 3. RESULTS

2,832 medical records were reviewed from the outpatient assistance in which 125 patients were selected with suspected or diagnosed of hereditary or acquired thrombophilia and/or with prescription of the drug enoxaparin that represents 4.41% (125/2,832) of the total initial sample. During the evaluated four pregnant women had two pregnancies that result in 129 pregnancies. Moreover, of that only 2.3% (3/129) of current pregnancies ended in miscarriage.

Of the 125 patients, 71.2% (89/125) were living in Maringá city. The average age of pregnant women was 31.7 ( $\pm$  6.1), with a range from 18 to 44 years old. In addition, 59.2% (74/125) of the women were between 21 to 34 years old and 37.6% (47/125) over 35 years old. The marital status assessment showed that among pregnant women, 80.8% (101/125) had partnered and 19.2% (24/125) had not a partner. In the cohort of women, 80.8% (101/125) declared themselves as white and 82.2% (60/73) patients reported that had more than or equal 9 years of schooling.

Obstetric history showed that 87.6% (113/129) women had more than two previous pregnancies and the mean was 2.87 ( $\pm$  1.6), range from one to ten pregnancies. The average previous deliveries among pregnant women were 1.47 ( $\pm$  0.97) with variation from one to six deliveries, moreover, 93% (80/86) of the women had less than two previous deliveries. The records showed that 42.6% (55/129) of the patients had miscarriages, which average was 2.11 ( $\pm$  1.0) ranging from one to five habitual abortion. In addition, 65.4% (36/55) women had less than two miscarriages. During the period evaluated, the mean weight of the newborns was 2.959 ( $\pm$  529.2) grams, variation from 1.090 to 4.190 grams and low birth weight (<2,500 g) was observed in 15% (10/67) of the newborns. The mean of gestational age was 37 ( $\pm$  2.45), ranging from 28 to 40 weeks and deliveries with  $\geq$ 37 weeks represented 74% (51/69) of the sample. Moreover, cesarean section was the most frequent (87.1%).

Of the 125 pregnant women evaluated, 111 (88.4%) were forwarded with suspected or diagnosed thrombophilia and 31.2% (39/125) of the women had a history of thrombosis. Inherited thrombophilia among these patients was 73% (49/67), only 9% (6/67) acquired thrombophilia and 18% (12/67) other combinations

(Mixed, combination hereditary and/or acquired). Regarding the types of thrombophilia, 12.5% (10/80) of the pregnant women had APS. In addition, Protein S, Antithrombin III, Protein C deficiencies had been 40.0% (32/80), 7.5% (6/80) and 5.0% (4/80), respectively. Factor V Leiden mutation was reported in 12.5% (10/80) of the patients, which 80% (8/10) were a heterozygous mutation.

The *MTHFR* mutation (C677T and A1298C) was described in 21.3% (17/80) of pregnant women. In addition, the polymorphic gene of *MTHFR* C677T was present in 12.5% (10/80) of the mothers, which 18.8% (3/16) were homozygous and 43.8% (7/16) heterozygous. However, none of the patients had elevated homocysteine levels. Moreover, only 1.3% (1/80) of women had Elevated Factor VIII levels and 1.6% (2/125) had May-Thurner Syndrome.

**Table 1. The statistical association of medical records of Thrombosis events in pregnant women who were taken care in Ambulatory of High-Risk Pregnant in the period 2015-2016**

Independent variables	History of thrombosis events		Univariate Analysis		
	YES (%)	NO (%)	OR	95% CI	p
<b>Schooling</b>					
≤8 years	7(33.3)	6 (11.5)	1		
≥9 years	14 (66.7)	46 (88.5)	0.26	(0.14-0.47)	<0.001*
<b>Type of delivery**</b>					
Cesarean section	20 (71.4)	37 (97.4)	0.07	(0.04-0.12)	<0.001*
Vaginal delivery	8 (28.6)	1 (2.6)	1		
<b>Gestational age (weeks)**</b>					
<37	3 (10.7)	13 (35.1)	0.22	(0.06-0.72)	0.02*
≥37	25 (89.3)	24 (64.9)	1		
<b>Recurrent pregnancy loss</b>					
Yes	3 (7.7)	29 (33.7)	0.16	(0.04-0.49)	<0.001*
No	36 (92.3)	57 (66.3)	1		
<b>Protein S deficiency</b>					
Yes	4 (10.3)	26 (30.2)	0.26	(0.08-0.70)	<0.01*
No	35 (89.7)	60 (69.8)	1		
<b>Thrombophilia</b>					
Yes	30 (76.9)	81 (94.2)	0.21	(0.14-0.31)	<0.001*
No	9 (23.1)	5 (5.8)	1		
<b>Therapeutic combination</b>					
LMWH+ASA	7 (21.2)	41 (51.9)	1		
LMWH	26 (78.8)	38 (48.1)	4.00	(2.41-6.59)	<0.001*

\* p<0.05; \*\*last pregnancy; LMWH: Low-molecular-weight heparin; ASA: Acetylsalicylic acid; CI: confidence interval

The history of recurrent pregnancy loss among the pregnant women evaluated was 25.6% (32/125) and 5.6% (7/125) had during the pregnancy the IUGR records. In addition, 25% (31/125) have had prematurity in the previous pregnancy and the placental abruption were described in 4% (5/125) of pregnant women. About 12% (15/125) of women have had preeclampsia and fetal death in the previous pregnancies. Regarding therapeutic prescription, 52.8% (66/125) received LMWH, 39.2% (49/125) LMWH plus ASA, 5.6% (7/125) only received ASA.

The statistical association demonstrates pregnant women better schooling (≥ 9 years) had a 26% rate of records of the thrombosis when compared with fewer education levels (OR: 0.26; 95% CI: 0.14-0.47; p < 0.001). The probability of having a thrombotic event was 21% among pregnant women with suspected or diagnosed thrombophilia (OR: 0.21; 95% CI: 0.14-0.31; p<0.001). Patients who had children preterm birth (<37 weeks) have a 22% chance of having thrombosis (OR:0.22; 95% CI:0.06-0.72; p=0.02). Regarding the type of delivery, cesarean section was 7% more performed than vaginal delivery in patients with a history of thrombosis (OR: 0.07; 95% CI: 0.04-0.12; p<0.001). Pregnant women with a history of thrombosis have 16% of chance had the previous history of recurrent pregnancy loss (OR: 0.16; 95% CI: 0.04-0.49; p<0.001). Only 26% of patients with Protein S deficiency to have had a thrombosis when compared to women with this deficiency (OR: 0.26; 95% CI: 0.08-0.70; p<0.01). In addition, LMWH prescriptions were three times higher



than LMWH plus ASA prescriptions in these patients with the record of thrombosis (OR: 4.00; 95% CI: 2.41-6.59;  $p < 0.001$ ) (Table 1).

The pregnant women with better schooling ( $\geq 9$  years) were more often forwarded with suspected or diagnosed thrombophilia when compared with a lower education level (OR: 6.22; 95% CI: 1.31-29.4;  $p = 0.02$ ). The data shows that the mother's *MTHFR* C677T polymorphism is associated with adverse pregnancy outcomes, such as recurrent pregnancy loss and the number of abortions in this study. Pregnant women with recurrent pregnancy loss were 21 times more likely to have the *MTHFR* C677T homozygous mutation (OR: 22.0; 95% CI: 1.10-437.3;  $p = 0.01$ ). The *MTHFR* C677T homozygous was 45.5 times higher in women with records of more than three previous miscarriages (OR: 46.5; 95% CI: 2.30-940.4;  $p < 0.001$ ).

#### 4. DISCUSSION

Sociodemographic data of pregnant women with suspected or diagnosed thrombophilia showed that were younger, with good education, white and married. In other studies with high-risk pregnant women shown similar data (22-25). Our data demonstrate that among mothers with better schooling had a lower rate of records of the thrombosis. In addition, there was little forwarded with suspected or diagnosed thrombophilia were among women with a lower education level. Unfavorable sociodemographic conditions such as low education and unsafe marital status are examples of gestational risk factors, as well as age over 35 years old (1, 26). Beside, education directly influences the individual's self-care regarding health. Low education can impair the perception of health problems, use of health services and adherence to therapeutic procedures (27). The literature shows that women over 35 years old are at higher risk of thrombosis (3, 4, 28, 29).

Our obstetric data show that most patients had multiple pregnancies, which other articles also reported (22, 23). Studies indicate that multiple pregnancies are associated with gestational complications such as venous thrombosis (3, 4, 29). The most frequent delivery type in our study was cesarean section, as described by other authors (22, 23). Several studies indicate to cesarean section as a significant risk factor for thrombosis (3, 4, 29, 30), but women having vaginal deliveries are also at risk (29). Most women who had thrombotic events after cesarean section or vaginal delivery have some risks factor (31). Therefore, there is a recommendation to use thromboprophylaxis only for pregnant women who present some kind of risk (16, 29). Our cohort showed that most gestational age was after 37 weeks and newborn weight with more than 2500 g, similar data are reported in other studies with high-risk pregnant women (23, 25). In addition, our observed that among pregnant women who had children preterm birth was 22% chance of having thrombosis. The literature considers that preterm birth as a risk factor for venous thromboembolism during the pregnancy and the puerperium (29).

In our study, thrombophilia's patients or those with protein S deficiency showed a significant association with a history of a thrombotic event. Thrombophilia has been the second most important risk factor for thrombosis (3). The frequency of acquired thrombophilia in our sample was about 12%. Venous thromboembolism cases happen about 15.8% of pregnant women with APS (3). In addition, obstetric complications such as recurrent pregnancy loss, preeclampsia, HELLP syndrome, preterm birth, and IUGR also reported in women with APS (5, 15). The most frequent inherited thrombophilia were protein S deficiency, *MTHFR* mutation (C677T and A1298C) and Factor V Leiden mutation, respectively. The hereditary thrombophilia was significantly associated with an increased risk of venous thromboembolism. The only exception was homozygous for *MTHFR* C677T (15). In this study, the data shows only the mother's *MTHFR* C677T polymorphism was associated with recurrent pregnancy loss. The literature validates the association of *MTHFR* C677T mutation (9-11), but other studies also recognize the relationship between *MTHFR* A1298C gene mutation and RPL (10, 12).

The LMWH was the more prescribed for patients, but a large proportion (39.2%) also got the prescribed LMWH plus ASA. Up to now, there is no robust evidence of the use of aspirin for thromboprophylaxis in pregnancy (29). However, in patients with APS that had recurrent pregnancy loss or fetal death, the use of LMWH plus ASA is more effective when compared to the isolated use (14, 15). In subjects with hereditary thrombophilia who had a poor obstetric history also reported the benefits of the association LMWH plus ASA, but the authors themselves are cautious about the results and recommend further studies to prove the benefits (32).

#### 5. CONCLUSION

The evaluation period (2015-2016) happened at the beginning of the implementation to Rede Mãe Paranaense (33) strategy and the municipal protocol for the care of pregnant women with thrombophilia (34). However, it was possible to perform the epidemiological and clinical-laboratory characterization of the patients treated and to observe some of the main risk factors identified in this population. Schooling, preterm birth, type of delivery, recurrent pregnancy loss, protein S deficiency, thrombophilia and LMWH prescriptions shown a statistical association among pregnant women had the history of thrombosis.

#### FINANCIAL SUPPORT

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the collaborators of the Ambulatory of High-Risk Pregnancy in the hospital Santa Casa of Maringá.

**REFERENCES**

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Gestação de alto risco: manual técnico*. Brasília: Editora Ministério da Saúde; 2012.
2. Figueiró-Filho EA, Oliveira VM, Breda I, Coelho LR, Ferreira CM. Eficácia de intervenção com enoxaparina baseada em sistema de pontuação nos desfechos perinatais de gestantes com trombofilias. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34(10):459-65.
3. James AH, Jamison MG, Brancazio LR, Myers ER. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(5):1311-5.
4. Liu S, Rouleau J, Joseph KS, Sauve R, Liston RM, Young D, et al. Epidemiology of pregnancy-associated venous thromboembolism: a population-based study in Canada. *J Obstet Gynaecol Can*. 2009;31(7):611-20.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295-306.
6. ACOG Practice Bulletin No. 197: Inherited Thrombophilias in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 132. United States 2018.
7. Basaran A, Deren Ö, Buyukasik Y, Basaran M. Free protein S reference ranges in gravidas without hereditary and acquired thrombophilia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015;31(2):286-91.
8. Fardella P, Parra M, Conte G, Flores C, Muñoz H, Soto L, et al. Proteína S libre en embarazadas normales: comparación entre dos métodos. *Rev méd Chile*. 2005;133(6):633-8.
9. Chen H, Yang X, Lu M. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in China: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(2):283-90.
10. Yang Y, Luo Y, Yuan J, Tang Y, Xiong L, Xu M, et al. Association between maternal, fetal and paternal MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a comprehensive evaluation. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(6):1197-211.
11. Zhang Y, He X, Xiong X, Chuan J, Zhong L, Chen G, et al. The association between maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and birth defects and adverse pregnancy outcomes. *Prenat Diagn*. 2019;39(1):3-9.
12. Nair RR, Khanna A, Singh R, Singh K. Association of maternal and fetal MTHFR A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: a study of an Indian population and a meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;99(5):1311-8.
13. Coppens M, Kaandorp SP, Middeldorp S. Inherited thrombophilias. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2006;33(3):357-74.
14. Giancotti A, Torre RL, Spagnuolo A, D'Ambrosio V, Cerekja A, Piazze J, et al. Efficacy of three different antithrombotic regimens on pregnancy outcome in pregnant women affected by recurrent pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(7):1191-4.
15. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GDO, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132(2):171-96.
16. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos A-M, Vandvik PO. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;141(2):e691S-e736S.
17. Sarig G, Vidergor G, Brenner B. Assessment and management of high-risk pregnancies in women with thrombophilia. *Blood Rev*. 2009;23(4):143-7.
18. Dbstet A. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1977;56(3):247-53.
19. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;78(2):179-90.
20. American society for reproductive medicine. Fact Sheet: What is recurrent pregnancy loss (RPL)? 2017 [Access in Aug 08, 2019] Available from: <https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/patient-fact-sheets-and-booklets/documents/fact-sheets-and-info-booklets/>.

21. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: open source epidemiologic statistics for public health, version. 2014.
22. Dalla Costa L, Cura CC, Perondi AR, França VF, Bortoloti DS. Perfil epidemiológico de gestantes de alto risco. *Cogitare Enferm*. 2016;21(2).
23. Melo WA, Alves JI, da Silva Ferreira AA, de Souza VS, Maran E. Gestação de alto risco: fatores associados em município do noroeste paranaense. *Espaço saúde*. 2016;17(1):83-92.
24. Rezende CL, Souza JC. Qualidade de vida das gestantes de alto risco de um centro de atendimento à mulher. *Psicol inForm*. 2012;16(16):45-69.
25. Barros VIPVL, Igai AMK, Andres MP, Francisco RPV, Zugaib M. Resultados gestacionais e trombofilias em mulheres com história de óbito fetal de repetição. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014.
26. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de ações programáticas estratégicas. Estudo da mortalidade de mulheres de 10 a 49 anos, com ênfase na mortalidade materna: relatório final. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.
27. Comissão nacional sobre determinantes sociais da saúde. As causas sociais das iniquidades em saúde no Brasil: Editora Fiocruz; 2008. [Access in Aug 08, 2019]. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/causas\\_sociais\\_iniquidades.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/causas_sociais_iniquidades.pdf).
28. Sultan AA, West J, Tata LJ, Fleming KM, Nelson-Piercy C, Grainge MJ. Risk of first venous thromboembolism in and around pregnancy: a population-based cohort study. *Br J Haematol*. 2012;156(3):366-73.
29. Royal College of obstetricians and gynaecologists. Reducing the risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. RCOG Green-top Guideline No. 37a. 2015;37:1-40. [Access in Aug 08, 2019]. Available from: <https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg-37a.pdf>
30. Gader AA, Haggaz AED, Adam I. Epidemiology of deep venous thrombosis during pregnancy and puerperium in Sudanese women. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:85.
31. D'Alton ME, Friedman AM, Smiley RM, Montgomery DM, Paidas MJ, D'Oria R, et al. National partnership for maternal safety: consensus bundle on venous thromboembolism. *Obstet Gynecol*. 2016; 128(4):688-98.
32. Mutlu I, Mutlu MF, Biri A, Bulut B, Erdem M, Erdem A. Effects of anticoagulant therapy on pregnancy outcomes in patients with thrombophilia and previous poor obstetric history. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(3):267-73
33. Paraná. Secretária Estado da Saúde do Paraná. Linha Guia da Rede Mãe Paranaense. Curitiba. 2015. [Access in Aug 08, 2019]. Available from: [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/LinhaGuiaMaeParanaense\\_2018.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/LinhaGuiaMaeParanaense_2018.pdf)
34. Maringá. Secretaria Municipal de Saúde. Fluxo de atendimento à gestante com trombofilia. Maringá. 2015. [Access in Aug 08, 2019] Available from: <http://www2.maringa.pr.gov.br/sistema/arquivos/6cbace43997b.pdf>

**Keywords:** pregnancy, high-risk; thrombophilia; antiphospholipid syndrome.



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Resumos simples





International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Bioquímica clínica

## ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL E TRANSITÓRIA CAUSA ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE RATOS

Gustavo Henrique de Souza<sup>1</sup>; Lorena dos Santos Castro<sup>2</sup>; Heloísa Vialle Pereira-Maróstica<sup>2</sup>; Pâmela Alves Castilho<sup>3</sup>; Jacqueline Godinho<sup>4</sup>; Humberto Milani<sup>5</sup>; Jurandir Fernando Comar<sup>6</sup>; Livia Bracht<sup>6</sup>; Adelar Bracht<sup>6</sup>; Anacharis Babeto de Sá- Nakanishi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A isquemia cerebral é uma patologia de grande incidência, com alta taxa de mortalidade. Além dos danos causados ao cérebro, outros órgãos são afetados pela isquemia e reperfusão (I/R), principalmente o fígado. **Objetivo:** Avaliar o efeito temporal da isquemia cerebral global e transitória sobre o estado oxidativo do fígado de ratos. **Material e métodos:** Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética-UEM (CEUA nº 6128251017). Ratos *Wistar* machos foram submetidos à isquemia cerebral global transitória (modelo 4-VO). Ratos controle passaram pelos mesmos procedimentos experimentais, mas com ausência de obstrução dos vasos sanguíneos. Os animais foram divididos em três grupos: controle; isquêmicos 24h: ratos eutanasiados 24 horas após I/R; isquêmicos 5 dias: ratos eutanasiados 5 dias após I/R. O fígado foi removido, homogeneizado em tampão fosfato 0,1M (pH7,4) e o homogenato utilizado para a determinação dos níveis de peroxidação lipídica (método TBARS), níveis de proteínas carbonilada e conteúdo de glutathione reduzida (GSH). Para as determinações das atividades das enzimas antioxidantes e conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS total) foram utilizados os sobrenadantes obtidos após a centrifugação do homogenato. **Resultados:** Os resultados revelam que os níveis de lipoperóxidos, de proteínas carboniladas e ROS aumentaram em 1,5, 2,0 e 1,5 vezes, respectivamente, 24 horas após isquemia e manteve-se elevados até 5 dias após I/R. O conteúdo de GSH não diferiu entre os grupos. Entretanto, a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD) diminuiu 24h após I/R, sendo que a SOD manteve-se reduzida até 5 dias após I/R. **Conclusão:** A isquemia cerebral global transitória modifica o estado oxidativo do fígado 24 horas após restauração do fluxo sanguíneo do cérebro e mantém esta alteração por pelo menos 5 dias após a reperfusão cerebral.

**Palavras-chave:** isquemia cerebral; fígado; estresse oxidativo.

**Área temática:** Bioquímica Clínica

## TRATAMENTO COM 5-FLUOROURACIL EM RATOS ALTERA PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO RIM

Mariana Conceição da Silva<sup>1</sup>; Lillian Catarim Fabiano<sup>2</sup>; Pedro Luiz Zonta de Freitas<sup>2</sup>; Karile Cristina da Costa<sup>2</sup>; Stephanie Carvalho Borges<sup>3</sup>; Camila Quaglio Neves<sup>3</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmicas de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

**Introdução:** O rim é muito susceptível à toxicidade por medicamentos. O 5-fluorouracil é um medicamento antineoplásico que inibe a divisão celular a partir do bloqueio de síntese do DNA e também de RNA. No entanto, tal composto apresenta a sua degradação catabólica em células normais ocasionando vários efeitos colaterais no corpo, entre eles o estresse oxidativo.

**Objetivo:** Tendo em vista que pouco se sabe sobre as implicações do 5-FU nos rins, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da dose padrão do 5-FU sobre o estresse oxidativo no rim de ratos saudáveis. **Material e métodos:** Foram utilizados 12 ratos *Wistar* machos. Os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (CEUA, nº 4422140918). Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um controle e outro tratado. A administração do 5-FU no grupo tratado foi realizada com dose clínica padrão equivalente a humanos: (15 mg/kg) por 4 dias consecutivos, seguido da redução da dose para 6mg/kg por 4 dias alternados, por fim, administrado a última dose de 15mg/kg no 14º dia e eutanásia no 15º dia. Os órgãos foram coletados e congelados a -80°C para posteriores análises. Foram avaliados os níveis dos grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH), de Lipoperoxidação (LOOH), de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade enzimática da catalase (CAT), da superóxido dismutase (SOD), e da glutathione-S-transferase (GST). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de Student. **Resultados:** As análises do estresse oxidativo nas amostras indicaram que os níveis de GSH reduziram, já os níveis de ROS e a atividade das enzimas SOD, CAT e GST aumentaram significativamente no grupo 5-FU. Não houve alteração na lipoperoxidação. **Conclusões:** O tratamento com 5-FU não foi capaz de causar dano oxidativo, no entanto, o sistema antioxidante endógeno sofre alterações dos parâmetros analisados.

**Palavras-chave:** 5-FU; citotoxicidade; quimioterápico.

**Área temática:** Bioquímica Clínica

## EXTRATO DE CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*) INIBI A $\alpha$ -AMILASE PANCREÁTICA *IN VIVO*

Pâmela Alves Castilho<sup>1</sup>, Tamires Barlati Vieira da Silva<sup>2</sup>, Gustavo Henrique de Souza<sup>3</sup>, Juliana Nunes de Lima Martins<sup>4</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>5</sup>, Jurandir Fernando Comar<sup>5</sup>, Livia Bracht<sup>5</sup>, Adelar Bracht<sup>5</sup>, Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A hiperglicemia persistente e descontrolada é responsável por vários danos a órgãos e tecidos. Uma das estratégias terapêuticas do diabetes mellitus é a inibição da digestão e absorção de carboidratos da dieta. As amilases são importantes enzimas do grupo das hidrolases e são responsáveis pela degradação de amido e glicogênio. **Objetivo:** Avaliar o potencial efeito inibitório do extrato hidroetanólico da casca de jaboticaba (EHCJ) sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase pancreática *in vivo*. **Material e métodos:** Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética-UEM (CEUA nº 8309170117). Camundongos Swiss machos, em jejum, foram divididos em 5 grupos (n=3). O grupo I (controle positivo) recebeu amido de milho comercial (1g/kg de peso corporal) intragastricamente. Grupo II (controle negativo) recebeu apenas água filtrada. Grupo III recebeu amido de milho mais acarbose (50mg/kg) que é um inibidor de referência da  $\alpha$ -amilase. Os grupos IV e V receberam amido de milho mais EHCJ nas doses de 250 e 500mg/kg respectivamente. Os níveis plasmáticos de glicose em jejum foram determinados antes da administração de amido e inibidores da  $\alpha$ -amilase. Avaliações subsequentes dos níveis de glicose foram realizadas a cada 30 minutos por 120 minutos. Todas amostras de sangue foram obtidas por meio de uma pequena incisão na extremidade da cauda e analisadas por meio de um glicosímetro (Accu-Chek®). **Resultados:** O EHCJ inibiu a  $\alpha$ -amilase pancreática de camundongos de maneira dose dependente, sendo que a concentração de 500mg/Kg apresentou capacidade de inibição da amilase semelhante a acarbose. **Conclusão:** O EHCJ é um excelente inibidor da  $\alpha$ -amilase pancreática em camundongos. Os dados obtidos sugerem que o resíduo da casca da jaboticaba, descartado pelas empresas, pode ser útil no controle de picos hiperglicêmicos, e quem sabe no futuro, contribuir como adjuvante no tratamento do diabetes.

**Palavras-chave:** casca de jaboticaba; hiperglicemia; inibidores da  $\alpha$ -amilase.

**Área temática:** Bioquímica Clínica





International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Citologia clínica

## CO-INFECÇÕES ENTRE *Papillomavirus* HUMANO (HPV) E MICOPLASMAS GENITAIS EM MULHERES ASSINTOMÁTICAS

Isabella Harumi Yonehara Noma<sup>1</sup>; Tamy Tairanne Suehiro<sup>2</sup>; Fabricio Morelli<sup>2</sup>; Maria Vitória Felipe de Souza<sup>3</sup>; Cristiane Suemi Shinobu Mesquita<sup>4</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>4</sup>; Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado) do Laboratório de Citologia Clínica, Universidade Estadual de Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá/PR

**Introdução:** A infecção persistente por *Papillomavirus* humano de alto risco (HR-HPV) é o fator central no desenvolvimento do câncer cervical (CC). A maioria das infecções por HR-HPV é naturalmente eliminada, mas algumas persistem e podem progredir para lesões de alto grau (HSIL) e CC. As razões para essa história natural variável são pouco compreendidas, mas co-fatores são importantes para o desenvolvimento de neoplasia em mulheres infectadas pelo HPV. Micoplasmas genitais são um grupo de microrganismos que incluem espécies saprofíticas, bem como espécies oportunistas, dentre estas *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* e *U. parvum*. Embora muitas das espécies patogênicas sejam frequentemente isoladas do trato urogenital de mulheres saudáveis, estas também são responsáveis por várias desordens urogenitais. Porém, a ligação entre os HR-HPV e micoplasmas genitais no risco de desenvolver CC ainda não está clara. **Objetivo:** Investigar as taxas de co-infecções entre HPV e *Ureaplasma* spp., *M. hominis* e *M. genitalium* em mulheres assintomáticas. **Material e métodos:** Entre março e outubro de 2016, foram avaliadas 291 mulheres com idade entre 25 e 65 anos para HR-HPV usando o teste molecular automatizado Cobas HPV test, e *Ureaplasma* spp., *M. hominis* e *M. genitalium* utilizando reação em cadeia da polimerase simples. Aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (n°50688815.0.0000.0104/2015). As estatísticas foram realizadas pelo GraphPadPrism e considerados significativos valores com  $p < 0,05$ . **Resultados:** A prevalência do HR-HPV foi de 12,71%, sendo que o HPV-16 foi o tipo mais prevalente. Os micoplasmas genitais foram detectados em 72,2% das mulheres, sendo que *Ureaplasma* spp. foi o mais prevalente (50,5%), seguido por *M. hominis* (21,7%). *M. genitalium* não foi detectado. A positividade para *Ureaplasma* spp. foi associada com a HR-HPV ( $p = 0,003$ ; OR=4,17; CI=1,84-8,94). **Conclusão:** Há associação significativa entre *Ureaplasma* spp. e HR-HPV, sugerindo uma possível ação sinérgica na carcinogênese cervical.

**Palavras-chave:** micoplasmas genitais; HPV; câncer cervical.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ

**Área temática:** Citologia Clínica



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Epidemiologia

## EVOLUÇÃO DAS INTERNAÇÕES PSIQUIÁTRICAS POR ESTRESSE NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Ademilson José Bernardineli<sup>1</sup>; Denise Tiemi Uchida<sup>1</sup>; Maria Dalva de Barros Carvalho<sup>2</sup>; Sandra Marisa Pelloso<sup>2</sup>; Raíssa Bocchi Pedroso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Os Transtornos Mentais atingem cerca de 700 milhões de pessoas no mundo, representando 13% do total de todas as doenças segundo a Organização Mundial da Saúde. Dentre estes, o estresse se configura como uma epidemia, afetando mais de 90% da população mundial, sendo o Brasil considerado o país mais ansioso e estressado da América Latina. **Objetivo:** Avaliar a tendência das internações psiquiátricas por estresse nos estados do sul do Brasil, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Material e métodos:** Foram coletados registros dos arquivos do SIH/SUS de janeiro de 2009 a dezembro de 2018 na plataforma eletrônica do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) referente às internações cujo diagnóstico principal contido no capítulo V do CID – 10 pertencessem à categoria F43 Reações ao “*stress*” grave e transtornos de adaptação (F43.0 - Reação aguda ao “*stress*”; F43.1 - Estado de “*stress*” pós-traumático; F43.2 - Transtornos de adaptação; F43.8 - Outras reações ao “*stress*” grave; F43.9 - Reação não especificada a um “*stress*” grave. Calculou-se a incidência anual, mediante a divisão do número de internações por reação ao “*stress*” pelo número de pessoas sob risco de exposição durante o mesmo período (dados fornecidos no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE), por 100 mil habitantes. A tendência temporal foi avaliada por regressão Joinpoint, versão 3.4.2. **Resultados:** O estudo apresentou uma significativa redução na incidência das internações por estresse no período estudado. O coeficiente de detecção geral apresentou tendência decrescente, a maior redução ocorreu no Rio Grande do Sul com APC -16,0 e intervalo de confiança de 95% (IC95%) -20,3; -11,3. **Conclusão:** A redução nos casos de internação por estresse neste período coincide com a implantação da portaria nº 3.088 de 23 de dezembro de 2011, que insere a saúde mental na rede de atenção primária.

**Palavras-chave:** estresse; hospitalização; saúde mental.

**Financiador (es):** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

**Área temática:** Epidemiologia



## DENGUE VIRUS SPATIAL DISTRIBUTION ON 15th REGIONAL HEALTH

Alice Bianchi de Oliveira<sup>1</sup>; Deborah de Castro Moreira<sup>2</sup>; Fernando Américo Jorge<sup>2</sup>; Alex Sandro Jorge<sup>2</sup>; Greicy Cezar do Amaral<sup>3</sup>; Daniele Cristina Tita Granzotto<sup>4</sup>; Dennis Armando Bertolini<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Undergraduate student in Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Postgraduate student (Doctoral degree) in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Nurse of the Epidemiological Surveillance Section of the 15th Regional Health, Maringá/PR

<sup>4</sup>Professor, Department of Statistics, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Dengue virus (DENV) infection is the most common mosquito-borne viral disease of humans and it is considered a global health problem. DENV infection causes a flu-like illness, which can evolve to a potentially lethal complication called severe dengue, and usually maintain an epidemic pattern activity every 2-5 years. Transmission patterns for these emergent viruses at urban areas are poorly understood. Determinates spatial distribution of dengue is essential to understand its contribution to regional scenario, helping to allocate control scarce resources and to evaluate the impact of interventional activities, like optimal vaccination strategies and public health intervention planning. **Materials and Methods:** We collected data from the Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) from January 2010 to December 2016, from 15th Regional Health of Paraná State. Spatial autocorrelation was conducted through the Moran's Global Index (Moran's I) to verify global spatial dependency against the incidence of dengue cases. Local Indicator of Spatial Association (LISA) was employed to analyze local spatial association. All statistical analyses were performed with Software R. **Results:** From 2010 to 2016, the total amount of 65,535 cases of dengue were communicated in the Parana State, with median annual case rate of 13,425. Although the median annual case rate is about 13 thousand cases, the distribution is not uniform, varying from 839 to 17,182 related in 2016 and 2013, respectively. A hypotheses test was performed detecting a spatial autocorrelation with global spatial dependency ( $p$ -value = 0,0275). There is spatial autocorrelation between geographical areas in terms of dengue spread. **Conclusion:** Spatial analyses show that there is spatial autocorrelation between geographical areas in terms of dengue spread, due to mosquito disease transmitter may migrate to nearby regions; although is not possible to identify a single pattern in DENV spread.

**Keywords:** dengue virus; epidemiology; spatial analysis.

**Thematic area:** Epidemiology

## INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS NOTIFICADOS NO SUL DO BRASIL

Barbara Aparecida Dobiesz<sup>1</sup>, Denise Tiemi Uchida<sup>1</sup>, Rosana Rosseto de Oliveira<sup>2</sup>, Miguel Machinski Júnior<sup>3</sup>, Maria Dalva de Barros Carvalho<sup>4</sup>, Sandra Marisa Pelloso<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Docente- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** O Brasil está entre os países que mais utilizam agrotóxicos no mundo, o que pode ocasionar intoxicações agudas, doenças crônicas, problemas reprodutivos e danos ambientais para a população. A pulverização terrestre e aérea não atinge apenas pragas e sim solos, lençóis freáticos e águas pluviais, causando não apenas impactos ambientais mas risco à saúde, gastos de verbas públicas com atendimento hospitalar. **Objetivo:** Analisar o perfil epidemiológico das intoxicações por agrotóxicos no Sul do Brasil. **Material e métodos:** Estudo descritivo, exploratório, das notificações de intoxicações por agrotóxicos nos Estados do Sul do Brasil, referentes ao período de 2007 a 2017. Os dados de notificações foram obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponíveis *online* no sítio eletrônico do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus). Foram calculadas as taxas de incidência de intoxicação por agrotóxicos, para cada ano separadamente, mediante a divisão do número de casos novos de intoxicação por agrotóxicos, pelo número de pessoas sob risco de exposição durante o mesmo período, multiplicado por 100 mil. **Resultados:** Foram registradas 11218 notificações de intoxicações por agrotóxicos no Sul do Brasil no período analisado, com taxa de incidência de 10,11 em 2007 e 13,75 em 2017. O Paraná foi o Estado da região Sul com as maiores taxas de intoxicação por agrotóxicos em todo o período, principalmente para o sexo masculino que apresentou taxas de 11,31 em 2007 e 8,35 em 2017. Em contrapartida, o Rio Grande do Sul apresentou as menores taxas de intoxicações por agrotóxicos, mantendo a maior incidência para o sexo masculino, com taxas de 0,68 em 2007 e 5,53 em 2017. **Conclusão:** Houve um aumento de notificações por agrotóxicos no sul do Brasil no período analisado e o sexo masculino foi predominante no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

**Palavras-chave:** agrotóxicos; intoxicação; epidemiologia.

**Financiador (es):** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

**Área temática:** Epidemiologia

## EVOLUÇÃO DO NÚMERO DE CIRURGIAS BARIÁTRICAS E CIRURGIAS PLÁSTICAS REPARADORAS PÓS BARIÁTRICAS NO ESTADO DO PARANÁ

Carlos Felipe Pasquini de Paule<sup>1</sup>; Bárbara Dobiesz<sup>1</sup>; Maria Dalva de Barros Carvalho<sup>2</sup>; Raíssa Bocchi Pedroso<sup>2</sup>; Sandra Marisa Peloso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docentes – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Atualmente a cirurgia bariátrica é considerada a ferramenta mais eficaz no controle e tratamento da obesidade severa sendo o Brasil, o segundo país em número destas cirurgias. Apesar dos efeitos benéficos já comprovados, a perda significativa de peso pode resultar em flacidez de pele e deformidades do contorno corporal, gerando impacto psicossocial, além de transtornos que incluem dificuldades de higiene pessoal e na vida íntima. Com o crescente aumento do número de cirurgias bariátricas realizadas pelo SUS, o acesso a cirurgia plástica reparadora pós bariátrica passa a ser uma grande preocupação. **Objetivo:** Comparar o número de cirurgias bariátricas e cirurgias plásticas reparadoras pós-bariátricas realizadas pelo SUS no estado do Paraná e os valores gastos com estes procedimentos. **Métodos:** Trata-se de uma análise quantitativa, descritiva, baseada em dados secundários considerando códigos de procedimentos utilizados para cirurgia bariátrica e reparadoras. A fonte dos dados constituiu-se dos arquivos públicos do Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), correspondentes ao período entre janeiro/2013 e dezembro/2018 e SIGTAP- Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS. **Resultados:** Em 2013, foram realizadas 3150 cirurgias bariátricas no estado do Paraná enquanto que em 2018 esse número subiu para 6657, mostrando um crescimento gradual nesse intervalo de tempo. As cirurgias plásticas em 2013 totalizaram 182 procedimentos e em 2018 queda para 136 cirurgias. Em 2018, o valor repassado para o hospital que executa uma guia de gastroplastia (bariátrica) é cerca de 4,7 vezes maior que o valor repassado por uma dermolipectomia abdominal (plástica). Em relação aos valores repassados pelos serviços profissionais essa diferença é de 5,5 vezes maior na gastroplastia. **Conclusão:** O número de cirurgias plásticas reparadoras pós-bariátricas não acompanha o número de cirurgias bariátricas, sendo o tratamento cirúrgico da obesidade oferecido pelo SUS incompleto, considerando a falta de acesso a plástica reparadora.

**Palavras-chave:** cirurgia bariátrica; cirurgia reparadora; obesidade.

**Financiador (es):** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

**Área temática:** Epidemiologia

## PERFIL DA SAÚDE MENTAL ENTRE HOMENS E MULHERES NO SUL DO BRASIL

Denise Tiemi Uchida<sup>1</sup>; Ademilson José Bernardineli<sup>1</sup>; Maria Dalva de Barros Carvalho<sup>2</sup>; Sandra Marisa Pelloso<sup>2</sup>; Raíssa Bocchi Pedroso<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup> Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Segundo a Organização Mundial da Saúde os transtornos mentais e comportamentais representam 13% do total de todas as doenças no mundo, sendo o Brasil considerado o país mais estressado da América Latina. As altas exigências psicológicas e físicas, como a constante competitividade, a falta de capacidade de enfrentamento as adversidades e as relações interpessoais geram um alto nível de estresse, acometendo qualquer pessoa. **Objetivo:** Comparar a taxa de internação por estresse segundo o sexo nos estados do sul do Brasil. **Material e Métodos:** Trata-se de um estudo observacional descritivo, utilizando dados secundários do DATASUS (SIH/SUS) no período de janeiro/2009 a dezembro/2018, nos estados do Sul do Brasil. Foram selecionadas internações cujo diagnóstico principal pertence à categoria F43-Reações ao “stress” grave e transtornos de adaptação e o sexo. Foi calculada a taxa de incidência para cada ano separadamente, mediante a divisão do número de internações por reação ao “stress” pelo número de pessoas sob risco de exposição durante o mesmo período, multiplicado por 100.000 habitantes. **Resultados:** No período analisado, 2011 teve as maiores taxas para o sexo feminino em todos os estados, 2012 em Santa Catarina e 2018 no Paraná foram os únicos anos onde as taxas apresentaram valores maiores para o sexo masculino do que para o sexo feminino. De modo geral o Paraná apresentou as maiores taxas de internações por estresse de 3,69 para homens e 5,68 para mulheres, seguido pelo Rio Grande do Sul com taxa de 3,28 e 5,39 e Santa Catarina 2,33 e 3,59 para homens e mulheres, respectivamente. **Conclusão:** Nota-se que as mulheres sofrem mais por estresse. Muito provavelmente, por causa do acúmulo de tarefas da mulher atual, um maior comprometimento com assuntos relacionados ao trabalho e à família, ao assumir uma dupla ou tripla carga de trabalho (profissão, casa e família).

**Palavras-chave:** saúde mental; estresse; sexo.

**Financiador (es):** Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

**Área temática:** Epidemiologia

## MORTALIDADE POR REAÇÕES ADVERSAS A MEDICAMENTOS: ANÁLISE DE TENDÊNCIA NO BRASIL

Estela Louro<sup>1</sup>; Simone Tomás Gonçalves<sup>1</sup>; Vladimir Dias Marques<sup>1</sup>; Amanda de Carvalho Dutra<sup>2</sup>; Rosana Rosseto de Oliveira<sup>3</sup>; Raissa Bocchi Pedroso<sup>4</sup>; Roberto Kenji Nakamura Cuman<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** As reações adversas a medicamentos (RAM) têm grande relevância como problema de saúde pública no mundo, pois contribuem para o aumento da morbidade, da estadia hospitalar e da mortalidade. No Brasil, poucos estudos nesta área foram realizados e, até o momento, não foram encontrados trabalhos que enfocassem apenas a mortalidade por RAM. **Objetivo:** Analisar a tendência da mortalidade por RAM no Brasil e regiões. **Material e métodos:** Estudo exploratório de série temporal da mortalidade por RAM no Brasil com os dados contidos no Sistema de Informação de Mortalidade, durante o período de 2008 a 2017. Utilizou-se a 10<sup>a</sup> revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), com os códigos Y40 a Y59. Foram calculadas as taxas de mortalidade por RAM, analisadas segundo sexo, faixa etária e região de residência. Para a análise de tendência, utilizou-se o modelo de regressão polinomial, sendo considerada uma tendência significativa quando o modelo estimado obteve  $p < 0,05$ . **Resultados:** Foram registrados 1038 óbitos por RAM nos 10 anos analisados, com uma taxa de mortalidade de 0,04 em 2008, chegando a 0,07 em 2017. A Região Sudeste apresentou as maiores taxas de mortalidade em média no período, seguida pela Região Sul, enquanto as menores taxas foram encontradas na Região Norte. Houve aumento da tendência das taxas de mortalidade por RAM em ambos os sexos e nas faixas etárias de 0 a 9 anos (aumento médio anual de 0,027,  $r^2=0,69$ ), 10 a 19 anos (0,024,  $r^2=0,70$ ) e 60 anos ou mais (0,024,  $r^2=0,74$ ). **Conclusão:** A tendência da mortalidade por RAM está aumentando no Brasil com diferenças regionais. Quando comparado a outros países, o baixo número de registros no período demonstra a necessidade de sensibilização dos profissionais de saúde quanto ao preenchimento das certidões de óbito quando a *causa mortis* estiver relacionada a RAM.

**Palavras-chave:** reações adversas associadas a medicamentos; mortalidade; Brasil.

**Área temática:** Epidemiologia



## EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF HEPATITIS B CHRONIC CARRIERS UNDERGOING TREATMENT IN THE 10TH REGIONAL HEALTH OF PARANÁ STATE, BRAZIL

Gabriele Nascimento de Oliveira<sup>1</sup>; Cláudia Ariati<sup>2</sup>; Bárbara Sackser Horvath<sup>2</sup>; Barbara Gimenez Sartor<sup>3</sup>; Josana Aparecida Dranka Horvath<sup>4</sup>; Alex Sandro Jorge<sup>5,6</sup>; Deborah de Castro Moreira<sup>6</sup>; Fernando Américo Jorge<sup>6</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>7</sup>; Dennis Armando Bertolini<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Pos-Graduate Academic (MSc) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Pharmacy Student, State University of West Paraná, Cascavel/PR

<sup>3</sup>Biomedicine Student, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Nurse, Specialized Centre in Infectious and Parasitary Diseases (CEDIP), Cascavel/PR

<sup>5</sup>Professor – Medical and Pharmaceutical Sciences Centre, State University of West Parana, Cascavel/PR

<sup>6</sup>Pos-Graduate Academic (PhD) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** It is estimated that there are 257 million chronic carriers of hepatitis B virus (HBV) worldwide. The Western Region of Paraná State is considered of the high prevalence of HBV in Brazil. **Objective:** Identify the epidemiological profile of hepatitis B chronic carriers undergoing treatment in the 10th Health Regional of Paraná State (10th HR). **Material and methods:** Cross-sectional study with analysis of medical records of hepatitis B chronic carriers undergoing treatment in 10th HR, in the first access at the regional reference center CEDIP (Specialized Center of Parasitic Infectious Diseases of Cascavel-PR), as approved by the Ethics Committee in Research with Human Beings (Opinion No. 2191947). **Results:** We analyzed 441 active medical records, of which 68.1% (300/441) were male patients. The average age range was similar for men and women, respectively 51.9 years and 52.3 years, with higher prevalence in married individuals (269/441) and predominance in men (193/269). Regarding education, 44% (194/441) reported having more than 8 years of schooling. Among the municipalities of 10th HR, the highest prevalence was in Cascavel, with 57.8% (255/441) of the cases. The average treatment time showed that most patients had more than 6 years of follow-up. Regarding the serological markers analyzed, it was observed that in the adherence moment, 54.6% (241/441) of the patients had no tests of HBeAg and 51.2% (226/441) of HBeAb. Early knowledge of the replicative state of the virus is important for the initial therapeutic decision. **Conclusion:** The data obtained were in line with the official epidemiological bulletin of the Paraná State published in 2018. The lack of serological markers HBeAg and HBeAb may have hindered the initiation of treatment. The temporal analysis of the variables found is being processed to establish correlations of therapeutic response in these patients.

**Keywords:** hepatitis B; hepatitis B, chronic; therapeutics.

**Financial support:** Fundação Araucária, CNPq/CAPES

**Thematic area:** Epidemiology

## MORTALIDADE EM MULHERES JOVENS POR CÂNCER DE MAMA: REVISÃO SISTEMÁTICA

Juliana Dalcin Donini e Silva<sup>1</sup>; Vladimir Dias Marques<sup>1</sup>; Amanda Carvalho Dutra<sup>2</sup>; Kely Paviani Stevanato<sup>2</sup>; Raíssa Bocchi Pedroso<sup>3</sup>; Luciano de Andrade<sup>3</sup>; Sandra Marisa Pelloso<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O câncer de mama é o principal responsável por mortes em todo o mundo. Apesar da sua incidência ser maior em mulheres acima de 50 anos, o aumento da mortalidade em mulheres jovens nos últimos anos tem chamado atenção. Este fenômeno tem sido observado em vários países, muitos em fase de desenvolvimento. Logo, é necessário conhecer melhor como esses números se apresentam quando comparamos com a mortalidade em países desenvolvidos. **Objetivo:** Comparar a mortalidade de mulheres jovens, por câncer de mama, em países de diferentes níveis econômicos. **Material e métodos:** Trata-se de revisão sistemática da literatura utilizando as bases de dados Pubmed, Embase, Web of Science e Biblioteca Virtual da Saúde. Os descritores utilizados foram “*vital statistics*”, “*epidemiologic studies*”, “*breast neoplasms*”, “*adult*”. Foram incluídos artigos completos e originais publicados entre julho de 2009 a julho de 2018, nas línguas inglesa, portuguesa e espanhola que continham a taxa de mortalidade por câncer de mama em mulheres entre 20 e 49 anos. O trabalho foi realizado segundo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses*). **Resultados:** Foram encontrados 6.167 artigos publicados que após exclusão das duplicatas e leitura dos títulos e resumos, foram selecionados 124 artigos. Após leitura completa, foram eleitos 20 artigos para extração dos dados. Os trabalhos apresentam taxas de mortalidade variadas, entre os anos de 1978 e 2013, para 68 países. **Conclusão:** Conclui-se que há poucos estudos realizados no mundo sobre a mortalidade por câncer de mama em mulheres jovens. Observou-se que a taxa de mortalidade é relativamente baixa quando comparada com a faixa etária acima de 50 anos, e tem diminuído nos últimos anos devido a melhoria do diagnóstico realizado precocemente e conseqüentemente acesso ao tratamento adequado, na maioria dos países estudados.

**Palavras-chave:** neoplasia de mama; mortalidade; revisão sistemática.

**Financiador (es):** Apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**Área temática:** Epidemiologia

## LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA NO ESTADO DO PARANÁ

Karla Gabriela Memare<sup>1</sup>; Marina Cristina Gadêlha<sup>1</sup>; Maria Dalva de Barros Carvalho<sup>2</sup>; Sandra Marisa Pelloso<sup>2</sup>; Raíssa Bocchi Pedroso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Leishmaniose Visceral Humana (LVH) é uma doença sistêmica que se não tratada pode levar a óbito, sendo considerada um grande problema de saúde pública. É uma zoonose tropical, negligenciada e em crescente desenvolvimento. No Paraná, o primeiro caso autóctone de LVH ocorreu em 2015, gerando grande preocupação. **Objetivo:** Analisar os casos autóctones e não autóctones de LVH no Paraná nos últimos 10 anos. **Material e Métodos:** Os dados coletados foram do período de janeiro de 2007 a dezembro de 2017, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponível no site do Ministério da Saúde. **Resultados:** Houve um total de 15 casos notificados, sendo possível a observação de um aumento significativo a partir de 2012 (86,6%), e apenas um caso autóctone confirmado na zona rural. Em relação a evolução da doença, foram descritos 8 casos de cura (53%); 4 óbitos (27%) e 3 ignorado/branco (20%). **Conclusão:** Os dados encontrados no SINAN corroboram com os dados divulgados pela Vigilância epidemiológica, que demonstra aumento do número de casos de LV a partir de 2013. Além disso, a concentração de casos na zona urbana demonstra um processo de urbanização da doença, que vem sendo descrito na Literatura, nos últimos 30 anos. Apesar do número de óbitos ser baixo, é importante salientar a existência de subnotificações e a relevância do correto diagnóstico destes casos autóctones, para uma melhor abordagem em medidas de controle, profilaxia, e prevenção da doença.

**Palavras-chave:** leishmaniose; SINAN; epidemiologia.

**Financiador (es):** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

**Área temática:** Epidemiologia

## ANÁLISE GEOESPACIAL DE ÓBITOS POR QUEDAS DE IDOSOS NO SUL DO BRASIL, DE 2008 À 2017

Mariana Teixeira da Silva<sup>1</sup>; Amanda de Carvalho Dutra<sup>1</sup>; Daniel Andrade Reis<sup>1</sup>; Raissa Bocchi Pedroso<sup>2</sup>; Luciano Andrade<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica (a) de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup> Docente- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** No Brasil, a terceira maior causa de óbitos na população em todas as faixas etárias é o trauma por acidentes. Pacientes idosos, frequentemente retornam ao departamento de emergência e, apresentam altas taxas de mortalidade - as quedas estão entre as várias síndromes geriátricas que não são apenas multifatoriais, mas podem contribuir para outras síndromes geriátricas. **Objetivo:** Avaliar as taxas de óbitos por quedas em idosos nos 3 estados da região Sul do Brasil, de 2008 à 2017. **Material e métodos:** Estudo observacional, de corte transversal e retrospectivo. Os dados foram obtidos no banco de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), e posteriormente avaliados por meio de Análise Exploratória de Dados Espaciais, utilizando-se o software GeoDa™. Índices de Moran Global e Local foram aplicados para verificar a presença de autocorrelação espacial e modelagem por meio de regressão espacial (Spatial Lag - SAR). **Resultados:** No período analisado, ocorreu uma taxa média de óbitos por quedas de 40.60 / 100,000 (DP  $\pm$ 15.04) na região sul do Brasil. O estado do Paraná apresentou a maior taxa com 50.17. Foi demonstrada uma autocorrelação espacial positiva para as taxas óbitos ( $I=0,79258$ ,  $p < 0,001$ ) por quedas para o Sul do Brasil. Na análise de regressão espacial, o modelo explicou 82% da variância das taxas de óbitos por quedas e foi correlacionada negativamente para o índice de analfabetismo e renda per capita (coeficiente = -0.184943,  $p < 0.05$ ; -0.0029328,  $p < 0,03$ ), respectivamente. **Conclusão:** Na região Sul do Brasil, as altas taxas de óbitos por quedas em idosos foram evidenciadas com mais significância nesse Estado. Visto isso, é fundamental analisar esse estado quanto à associação entre altas taxas de óbitos por quedas e indicadores socioeconômicos, a fim de entender as causas dessa alta incidência no nesse estado.

**Palavras chave:** saúde do idoso; acidentes por quedas; análise espacial.

**Área Temática:** Epidemiologia

## INJÚRIA HEPÁTICA INDUZIDA POR MEDICAMENTOS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS: REVISÃO SISTEMÁTICA

Simone Tomás Gonçalves<sup>1</sup>; Estela Louro<sup>1</sup>, Amanda de Carvalho Dutra<sup>2</sup>; Ana Luiza Pelissari<sup>3</sup>; Edilson Almeida de Oliveira<sup>4</sup>; Raissa Bocchi Pedroso<sup>5</sup>; Roberto Kenji Nakamura Cuman<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR,

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR,

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR,

<sup>4</sup>Farmacêutico da Secretaria de Saúde de Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

**Introdução:** A injúria hepática induzida por medicamentos (DILI) é incomum, mas importante reação adversa na prática clínica. Pode ser caracterizada apenas por alterações das enzimas hepáticas ou até insuficiência hepática fulminante, podendo ocasionar a morte. **Objetivo:** Realizar uma revisão sistemática para identificar quais os medicamentos que podem causar injúria hepática em pacientes hospitalizados. **Material e métodos:** Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com a declaração de Itens Preferenciais de Relatórios para Revisão Sistemática e Metanálise (PRISMA). Foram pesquisadas as seguintes bases de dados eletrônicas: Pubmed, Web of Science, Scopus e Lilacs. Além disso, as referências dos artigos incluídos foram pesquisadas manualmente. Foram definidos os termos de Medical Subject Headings (MeSH): Drug-Related Side Effects and Adverse Reactions, Medication Errors, Chemical and Drug-Induced Liver Injury, Hospitalization, Hospitals, patients e termos de entrada relacionados. **Resultados:** Inicialmente foram selecionados 379 artigos de estudos em pacientes hospitalizados, que tiveram injúria hepática devido à administração de medicamentos. Destes, 5 eram duplicados, sendo realizada revisão de títulos e resumos de 374 artigos. Destes, 34 foram eleitos, e após revisão do texto completo, foram selecionados 21 artigos. Foram encontradas uma variedade grande de medicamentos que causam DILI, destacando antimicóticos, antibióticos e antidepressivos. **Conclusão:** Apesar do pequeno número de trabalhos encontrados, uma grande variedade de medicamentos foi destacada como causadores de DILI em pacientes hospitalizados. Estes resultados contribuem para uma maior conscientização da equipe de saúde, aumentando a segurança do paciente.

**Palavras-chave:** injúria hepática induzida por medicamentos; efeitos colaterais e reações adversas associadas a medicamentos; pacientes hospitalizados.

**Área temática:** Epidemiologia





International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Farmacologia

## EFEITO HEPATOPROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDA (*Lavandula officinalis*) NA LESÃO HEPÁTICA AGUDA INDUZIDA POR PARACETAMOL EM CAMUNDONGOS

Gabriel Fernando Esteves Cardia<sup>1</sup>; Louise Ferreira Iunklaus<sup>2</sup>; Francieli Maria de Souza Silva-Comar<sup>3</sup>; Roberto Kenji Nakamura Cuman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A overdose de paracetamol (APAP) é uma das causas mais comuns de insuficiência hepática aguda induzida por medicamentos. A *Lavandula officinalis* é um produto natural com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias já conhecidas. **Objetivo:** Investigar os efeitos protetores do óleo essencial de lavanda (LEO) no dano hepático induzido por paracetamol em camundongos. **Material e métodos:** Camundongos Balb/c (pesando 25g) foram divididos em cinco grupos (n = 8/grupo) e foram pré-tratados com LEO em diferentes concentrações (200 e 400 mg/kg), Silimarina ou veículo (carboximetilcelulose) por via oral durante 7 dias. No sétimo dia, os camundongos foram injetados com uma dose única de APAP (250 mg/kg) para induzir a hepatotoxicidade. Após 12h de administração de APAP, os animais foram anestesiados com tiopental e a cavidade peritoneal foi exposta. O sangue foi coletado para análises bioquímicas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gamaglutamiltransferase ( $\gamma$ GT). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá (CEUA / UEM Nº 2534270418). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para avaliar as diferenças entre médias, consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . **Resultados:** Os valores de ALT, AST, ALP e  $\gamma$ GT aumentaram significativamente com a administração de APAP, indicando lesão hepática. Entretanto, os grupos tratados com LEO 200 mg/kg e LEO 400 mg/kg impediram significativamente alterações na atividade da AST (84% e 92%, respectivamente), ALT (87% e 90%, respectivamente), ALP (45% e 46%, respectivamente) e  $\gamma$ GT (57% e 66%, respectivamente), comparados ao grupo APAP. O tratamento com 200 mg/kg de silimarina inibiu a toxicidade do APAP e os valores dos parâmetros séricos mencionados acima foram revertidos significativamente. **Conclusão:** Nossos resultados, demonstraram que o tratamento com LEO melhora as funções hepáticas na hepatotoxicidade induzida por paracetamol como evidenciado pela redução das enzimas hepáticas séricas.

**Palavras-chave:** óleo essencial; *Lavandula officinalis*; hepatotoxicidade.

**Financiador (es):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Área temática:** Farmacologia

## LOW DOSE OF QUERCETIN-LOADED PECTIN/CASEIN MICROPARTICLES REDUCES THE OXIDATIVE STRESS IN ARTHRITIC RATS

Gabriella Saory Kondo<sup>1</sup>; Kaiany Santos de Souza<sup>1</sup>; Bruna Thais Silva<sup>2</sup>; Byanca Pereira Moreira Oliveira<sup>3</sup>; Patrícia Silva Silva<sup>4</sup>; Anacharis Babeto Sá-Nakanishi<sup>5</sup>; Jacqueline Nelisis Zanoni<sup>6</sup>; Odinei Hess Gonçalves<sup>7</sup>; Francielli Maria Souza Silva<sup>8</sup>; Jurandir Fernando Comar<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Posgraduate student in Biological Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Posgraduate student in Food Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Posgraduate student in Comparative Biology, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Posgraduate student in Program of Food Technology – Federal University of Technology – Paraná, Campo Mourão, PR. Department of Chemical Engineering, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Professor - Department of Biochemistry, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Professor - Department of Morphological Sciences, University of Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Professor - Post-Graduation Program of Food Technology – Federal University of Technology – Paraná, Campo Mourão, PR, Brazil

<sup>8</sup>Professor - Department of Pharmacology and Therapeutics, State University of Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Quercetin is a flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory properties and has therefore been investigated as promising agent to treat rheumatoid arthritis. High doses of quercetin improve inflammation and antioxidant status of arthritic rats, but have been associated with mitochondriotoxic and pro-oxidant activities. In turn, the benefits effects of quercetin have not been verified at low doses, a phenomenon that has been associated with chemical instability and low bioavailability of free quercetin. **Objective:** This study investigated the effects of long-term administration of quercetin-loaded pectin/casein microparticles on the oxidative status of liver and brain of rats with adjuvant-induced arthritis. **Material and methods:** Particles morphology was accessed by transmission electron microscopy and the physical stability by infrared spectra and differential scanning calorimetry. The efficiency of encapsulation was indirectly measured using X-ray diffraction. Quercetin microcapsules (10 mg·Kg<sup>-1</sup>) were orally administrated during 60 days. Respiratory activity was additionally evaluated in hepatic isolated mitochondria. **Results:** Quercetin microcapsules abolished the increases of carbonyl proteins, TBARS and reactive oxygen species, and restored the reduced glutathione content in the liver and brain of arthritic rats. Paw edema was not improved in arthritic rats, but the plasmatic activity of ALT and mitochondrial respiration were not modified by quercetin, which indicates no mitochondriotoxic or hepatotoxic action of quercetin. **Conclusion:** Quercetin-loaded pectin/casein microcapsules orally administered at a low dose improves the oxidative stress of arthritic rats independent of its anti-inflammatory activity, a situation that supports the long-term use of quercetin as antioxidant agent to treat rheumatoid arthritis.

**Keywords:** adjuvant-induced arthritis; quercetin; reduced glutathione.

**Financial support:** CNPq

**Thematic area:** Pharmacology

## EFFECTS OF ALPHA-TOCOPHEROL-LOADED POLYCAPROLACTONE NANOPARTICLES ON INFLAMMATION AND SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN ARTHRITIC RATS

Louise Ferreira Iunklaus<sup>1</sup>; Lucas Stafuza Moreira<sup>2</sup>; Geferson de Almeida Gonçalves<sup>3</sup>; Guilherme Henrique Oliveira Silva<sup>4</sup>; Francielli Maria de Souza Silva<sup>5</sup>; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi<sup>6</sup>; Lívia Bracht<sup>6</sup>; Ciomar Aparecida Bersani Amado<sup>5</sup>; Adelar Bracht<sup>6</sup>; Jurandir Fernando Comar<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Undergraduate student in Medicine, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Posgraduate student in Biological Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Posgraduate student in Food Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Undergraduate student in Pharmacy, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Professor - Department of Pharmacology and Therapeutics, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Professor - Department of Biochemistry, State University of Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune inflammatory disease that affects primarily the joints. The pathophysiology of arthritis involves an intense hyperplasia of synovial membrane with participation of proinflammatory cytokines and overproduction of reactive species. **Objective:** The present study investigated the effects of  $\alpha$ -tocopherol-loaded polycaprolactone nanoparticles orally administered on articular inflammation and systemic oxidative status of rats with Freund's adjuvant-induced arthritis, a model for severe rheumatoid arthritis. These effects were compared with those of unencapsulated  $\alpha$ -tocopherol intraperitoneally administered alone or in combination with zinc. **Material and methods:** For this purpose, Holtzman healthy and arthritic rats were treated according to two protocols: (1) intraperitoneal administration of unencapsulated  $\alpha$ -tocopherol (100 mg/Kg) alone or in combination with zinc (40 mg/Kg); and (2) oral administration of unencapsulated and encapsulated  $\alpha$ -tocopherol (100 mg/Kg). Animals were treated once a day during 18 days after arthritis induction. **Results:** Encapsulated  $\alpha$ -tocopherol decreased paw edema (-40%) and articular leukocytes (-28%). The encapsulated compound decreased by 15% the high levels of protein carbonyl groups in the plasma, liver and brain, reduced the ROS content in the liver (-20%) and brain (-40%), increased the ferric reducing ability of plasma (+22%), and GSH levels (+25%) and GSH/GSSG (+40%) in the arthritic liver and brain. Unencapsulated  $\alpha$ -tocopherol orally administered was lesser effective against arthritis when compared to that encapsulated. Alpha-tocopherol intraperitoneally administered was as effective on arthritis as that encapsulated and orally administered, but its association with zinc did not cause further improvements. **Conclusion:** The results show that both route of administration and encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol positively modify its effects against arthritis. Intraperitoneal route allows a great absorption of lipophilic substances and encapsulation improves the solubility and the release profile of  $\alpha$ -tocopherol in the gastrointestinal tract. Thus,  $\alpha$ -tocopherol-loaded polycaprolactone nanoparticles may be a good resource to complement the therapeutic approach of rheumatoid arthritis.

**Keywords:** adjuvant-induced arthritis;  $\alpha$ -tocopherol; antioxidant status.

**Financier (s):** CNPq

**Thematic area:** Pharmacology

## VALIDAÇÃO DE MODELO FARMACOCINÉTICO FISIOLÓGICO (PBPK) DE CETAMINA POR VIA INTRAVENOSA EM CÃES

Paulo Roberto Nunes de Goes<sup>1</sup>; Frederico Martins<sup>2</sup>, Andréa Diniz<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá,

<sup>2</sup> Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá,

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A cetamina (CET) é um anestésico dissociativo utilizado na prática clínica há décadas. Doses subterapêuticas deste medicamento vêm sendo utilizadas para analgesia devido ao seu efeito antagônico em receptores de ácido N-metil-D-aspartato (NMDA). Em cães, os estudos de analgesia com a CET tem como via de administração, a intravenosa (IV). A farmacometria vem sendo empregada para avaliação de adequação de doses. Desta forma, a validação de um modelo farmacocinético fisiológico (PBPK) de cetamina IV ajudará na predição das doses necessárias para utilização da CET como analgésico. **Objetivo:** Validar modelo PBPK de CET IV. **Material e métodos:** Dados plasmáticos de CET em cães (n=4) oriundos de literatura, juntamente com descritores químicos moleculares da CET foram utilizados para estabelecer o modelo PBPK para cães. Foi utilizado o simulador Simcyp® Dog Version 17 (SDV). A população selecionada foi a de cães da raça Beagle, com peso ajustado de 19,1 Kg. **Resultados:** Os parâmetros assumidos para obtenção do modelo IV por PBPK que mais se ajustaram aos dados observados em cães foram: peso molecular (237,7 g/mol); base monoprótica; log P (7,16); pKa (3,35); relação sangue/plasma (0,815); hematócrito (45,4%); fração livre no plasma (0,465), valor de  $k_p$  scalar (0,1); *clearance* IV (615,02 mL/min); o método full PBPK foi assumido. O valor de volume de distribuição no *steady state* foi predito pelo método 1 (Poulin and Theil). Para os testes de simulação selecionou-se a dose de CET 15mg/kg por IV bolus (em 300 segundos). Os resultados preditos de concentração máxima, área sob a curva (ASC) e *clearance* mostraram-se dentro dos limites da variância dos dados observados. **Conclusão:** O modelo PBPK de CET desenvolvido para cães foi preditivo e poderá ser extrapolado para estimativa da exposição plasmática de CET por outras rotas de administração, visando explorar a adequação de doses em protocolos de analgesia em cães.

**Palavras-chave:** analgesia; farmacometria; simulação.

**Financiador (es):** CAPES/CNPq

**Área temática:** Farmacologia





International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Fisiologia

## LOW PROTEIN DIET IN ADOLESCENT RATS PROGRAMS CARDIOVASCULAR DYSFUNCTION IN ADULTHOOD

Anna Rebeka Oliveira Ferreira<sup>1,3</sup>; Laize Peron Tofolo<sup>1</sup>; James Andrew Armitage<sup>2</sup>; Maria Natalia Chimirri Peres<sup>1,4</sup>; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro<sup>1,3</sup>; Paulo Cezar Freitas Matias<sup>1</sup>; Kesia Palma Rigo<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Secretion Cell Biology, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, State University of Maringá - 87020-900 Maringá/PR, Brazil

<sup>2</sup>School of Medicine, Deakin University, Waurn Ponds, Victoria 3216, Australia

<sup>3</sup>Postgraduate Student (master's degree) in Bioscience and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Postgraduate Student (doctorate degree) in Bioscience and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Teaching – Nursing Department, Paraná Adventist College

**Introduction:** Numerous studies have established a relationship between the conditions encountered in early life and the development of hypertension later in life. Although the majority of studies concentrate on the effects of perinatal environmental perturbation, adolescence may also represent a period of susceptibility for the programming of dysfunction in adulthood. **Objective:** To evaluate whether low protein diet during adolescence induces hypertension at adulthood.

**Methods:** After approval of the research ethics committee, filed under CEUA nº 4098231014, Wistar rats of thirty-day-old were fed a low protein (LP) diet (4% protein as casein) for 30 days and subsequently fed a 20.5% normal protein diet for a 60-day recovery period. Control animals were fed a 20.5% protein diet throughout life. At 120 days of age, direct measurements of arterial pressure were recorded from conscious animals. Cardiovascular autonomic activity was derived by spectral analysis of mean arterial pressure and pulse interval. Statistically significant differences were evaluated by T-Student test. **Results:** Systolic and mean arterial pressures (+13% and +12%, respectively;  $p < 0.01$ ) were increased in low protein animals but pulse interval was unchanged. Low protein diet animals showed greater power in the low frequency band of mean arterial pressure increased (+46%;  $p < 0.05$ ), greater low frequency versus high frequency ratio of pulse interval an estimation of cardiac sympathetic activity, was increased (+54%;  $p < 0.05$ ) and reduced high frequency of pulse interval in LP animals (-38%;  $p < 0.05$ ) indicating sympathetic activation and parasympathetic suppression. Baroreflex sensitivity was reduced by exposure to the LP diet during development (-32%;  $p < 0.05$ ). **Conclusions:** Low protein diet during adolescence leads to hypertension later in life, which may be underpinned by elevated sympathetic activity.

**Keywords:** low protein diet; high blood pressure; autonomic nervous system.

**Funding:** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (K.P.R., Fellowship number 500698/2013-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

**Subject Area:** Physiology

## DIETA RICA EM GORDURA OFERTADA A RATOS DURANTE A ADOLESCÊNCIA PROGRAMA PARA SÍNDROME METABÓLICA NA VIDA ADULTA

Maiara Vanusa Guedes Ribeiro<sup>1,2</sup>; Vander Silva Alves<sup>1</sup>; Anna Rebeka Oliveira Ferreira<sup>1,2</sup>; Maria Natalia Chimirri Peres<sup>1,3</sup>; Paulo Cezar Freitas Matias<sup>1</sup>; Kesia Palma Rigo<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular da Secreção (LBSCS) / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

**Introdução:** Exposição à dieta hiperlipídica durante fases susceptíveis do desenvolvimento, como gestação e lactação, aumenta o risco de síndrome metabólica na vida adulta, contudo ainda há poucos estudos que avaliam o impacto desta dieta na adolescência. Hipotetizamos que a dieta hiperlipídica na adolescência induz a ocorrência de síndrome metabólica na vida adulta.

**Objetivo:** Avaliar se a exposição a dieta hiperlipídica durante a adolescência de ratos programa para a síndrome metabólica na vida adulta. **Material e métodos:** O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA nº 1527130815). Ratos Machos Wistar (30 dias) foram expostos à dieta hiperlipídica durante 30 dias (HF; 35% de gordura de porco), e após receberam dieta comercial (NF; 4,5% de gordura) durante mais 60 dias. Animais controle receberam dieta comercial durante toda a vida. Aos 120 dias de vida, 6 a 12 animais por grupo foram utilizados para avaliar os seguintes parâmetros: estoques de gordura corporal, peso corporal, glicemia de jejum, colesterol total, triglicerídeos e pressão arterial. A comparação entre os grupos foi realizada com Test t Student e diferenças significativas foram consideradas com  $p < 0,05$ . **Resultados:** Animais expostos à dieta HF durante a adolescência apresentaram maior peso corporal (+14%;  $p < 0,01$ ); maiores estoques de gordura mesentérica e retroperitoneal (+55% em ambos;  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente); e hipertrigliceridemia (+60%,  $p < 0,001$ ) comparados aos animais tratados com dieta NF. Não houve diferença na glicemia e colesterol total entre os grupos. A pressão arterial sistólica foi maior nos animais HF comparado ao grupo controle ( $125 \text{ mmHg} \pm 1,8$  vs.  $118 \pm 2,0 \text{ mmHg}$ , respectivamente,  $p < 0,01$ ), enquanto que, a pressão arterial diastólica foi similar entre os grupos (HF:  $73 \pm 1,7$  e NF  $69 \pm 2,5 \text{ mmHg}$ ,  $p = 0,08$ ). **Conclusão:** Exposição à dieta HF durante a adolescência de ratos programa para a síndrome metabólica na vida adulta.

**Palavras-chave:** dieta hiperlipídica; hipertensão; adolescência.

**Área temática:** Fisiologia

## INFLUENCE OF CANOLA OR SOYBEAN OIL ON LIVER FATTY ACID COMPOSITION IN MICE FED WITH HIGH-CARBOHYDRATE DIET

Marina Masetto Antunes<sup>1</sup>, Guilherme Godoy<sup>1</sup>, Camila Biesdorf de Almeida-Souza<sup>1</sup>, Luciana Pelissari Manin<sup>2</sup>, Caroline Zappiello<sup>3</sup>, Jesuí Vergílio Visentainer<sup>4</sup>, Roberto Barbosa Bazotte<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos do Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica do Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica do Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Some of the most consumed oils in the Western diet are soybean oil (SO) and canola oil (CO). SO and CO differ in the composition of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Aim:** In this investigation, we evaluated if fatty acids (FAs) from the diet (SO or CO) modulate lipid deposition and enzymes of lipid metabolism in livers of mice fed with high-carbohydrate (HCD). **Materials and Methods:** Male Swiss mice (n=10 per group) were fed with HCD-C or HCD-S during 56 days. The Animal Care and Use Committee of State University of Maringá (3105210717/CEUA) approved the experimental protocols used in this investigation in accordance with international law on protection and use of animals. At the end of the treatment, mice were euthanized and liver was collected for FA composition analysis by gas chromatography. Activities of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1),  $\Delta$ -6 desaturase (D6D), elongase and de novo lipogenesis (DNL) were estimated as the product/precursor ratios of individual FA in lipid esters. The means were compared using Student's t-tests, considering significant  $p < 0.05$ . The results are presented as means  $\pm$  standard error. **Results:** Livers from the HCD-S group showed increased ( $p < 0.05$ ) elongase activity, and stored more ( $p < 0.05$ ) n-6 PUFA. On the other hand, the HCD-C group showed higher ( $p < 0.05$ ) MUFAs and n-3 PUFA levels. The HCD-C also showed increased ( $p < 0.05$ ) DNL and SCD-1 activities that contributed to a more intense ( $p < 0.05$ ) liver deposition in this group. **Conclusion:** Liver lipid accumulation and FA composition were modulated by the dietary composition. CO was more lipogenic than SO as source of fat in HCD.

**Keywords:** fatty liver; canola oil; de novo lipogenesis.

**Financial support:** CNPq/ PRONEX/Araucária Foundation and CAPES

**Thematic area:** Physiology



International Meeting  
of Biosciences  
& Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Imunologia



## TNF- $\alpha$ PROFILE IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Fernanda Formaggi Lara Armi<sup>1</sup>; Matheus Braga<sup>2</sup>; Josiane Bazzo de Alencar<sup>1</sup>; Marco Antônio Rocha-Loures<sup>1</sup>; Janisleya Silva Ferreira Neves<sup>1</sup>; Ricardo Alberto Moliterno<sup>3</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>3</sup>; Ana Maria Sell<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate student (doctorate), Post Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Postgraduate student (master), Post Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup> Professor, Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR

**Introduction:** Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory disease. Inflammatory cytokines like tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) are involved in the pathogenesis of AS by promoting bone resorption and joint damage, which results in disease progression. Anti-TNF drugs are used to treat this disease, but some patients do not respond to this treatment.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate TNF- $\alpha$  levels in the serum of AS patients after anti-TNF therapy. **Materials and methods:** The study was approved by the Ethics Committee of the UEM. Thirty six patients with AS were include in this study and were classified as responder (BASDAI < 4 after anti-TNF therapy), non responder (BASDAI  $\geq$  4 after six months using anti-TNF therapy) and AS control (BASDAI < 4 without drugs). Fifteen individuals without AS were included as controls. Serum levels of TNF- $\alpha$  were determined using the Human Cytokine 10-Plex Panel Immunoassay Kits (Life Technologies, Carlsbad, CA). Therefore, the levels of cytokine were compared between the groups. The data were analyzed by the BioEstat 5.0 program utilizing Mann-Whitney test. **Results:** The non responder group (median=4.69 pg/ml) presented higher levels of TNF- $\alpha$  than AS control (median=1.39 pg/ml) ( $p=0.02$ ) and healthy control (median=1.39 pg/ml) ( $p=0.03$ ). The serum levels of TNF- $\alpha$  were similar in the AS responder group (median=1.77 pg/ml), AS controls and control group. The results suggest that the TNF- $\alpha$  could be involved in immunopathogenesis of the disease because higher levels were found in patients with worse disease activity. Added to this fact, anti-TNF therapy could be involved in reducing TNF- $\alpha$  levels in some patients but not in all of them. In non responders the anti-TNF therapy did not reduce the levels of TNF- $\alpha$ . **Conclusion:** TNF- $\alpha$  levels are increased in patients with higher disease activity index even after anti-TNF therapy.

**Keywords:** therapy; spondyloarthritis; cytokines.

**Financial support:** Laboratório de Imunogenética da UEM, CAPES, CNPq e Fundação Araucária do Estado do Paraná

**Thematic area:** Immunology

## ZIKA VIRUS DIAGNOSIS: A SISTEMATIC REVIEW

Fernando Américo Jorge<sup>1</sup>; Mateus Vailant Thomazella<sup>2</sup>; Deborah de Castro Moreira<sup>1</sup>; Luciana Dias Ghiraldi Lopes<sup>3</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>3</sup>; Dennis Armando Bertolini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Alergia e Imunopatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Zika virus (ZIKV) is an enveloped, positive single-strand sense RNA virus and it is transmitted by *Aedes* species mosquitoes. Due to its cross-reactivity with others flavivirus, many efforts have been made to find a good, reliable and cost-effectiveness test to ZIKV diagnosis. Diagnosis is still imprecise, expensive and there is no standard model. The timing and the test performed could be crucial for detecting ZIKV infection. **Objective:** Review publications of ZIKV diagnostic, identify and analyze varieties of diagnostic methods, sensibility, specificity and evolutions of new methodologies. **Material and methods:** A systematic review was conducted in accordance with the PRISMA-P for Zika diagnostic methodologies. Three blocks of MeSH terms were assembled. Group I: virus infection; group II: diagnostic methodologies; group III: characteristics and varieties on diagnostic methods. Search was performed on PubMed, Web of Science and SCOPUS databases. We included studies only in humans. Were excluded validation studies of commercial kits, animal model, reviews and case reports. **Results:** Merging results of crossing MeSH's and free terms searches, 19 articles of serological and molecular diagnostic techniques were found. Serology methods remain a problem to flaviviruses due to cross reactions. Serum was used as the biological material in the serological diagnosis, but urine and sperm have been shown to be an alternative. Combination of IgG and IgM showed excellent results, reaching up to 100% sensitivity and 99,8% specificity. Molecular methods used almost all ZIKV genome regions, from structural to nonstructural regions. New methodologies used an amplification primer and a sensor design process using *in silico* algorithms more efficiently, faster and cheaper, with ZIKV detection within 30 seconds. **Conclusion:** Serological tests are faster and less expensive than molecular assays; but molecular assays are more specific. The use of both methodologies would be the most indicated and reliable way to obtain correct diagnostic results.

**Palavras-chave:** zika virus; diagnosis; flavivirus.

**Financiador(es):** Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná

**Área temática:** Imunologia

## PERFIL DE CITOCINAS TH17 NAS DIFERENTES FASES DO LEITE HUMANO

Joana Maira Valentini Zacarias<sup>1</sup>; Josiane Bazzo de Alencar<sup>1</sup>; Francieli Silva de Oliveira Trombelli<sup>2</sup>; Sueli Mutsumi Tsukuda Ichisato<sup>3</sup>; Christyna Beatriz Genovez Tavares<sup>4</sup>; Vanessa Javera Castanheira Neia<sup>5</sup>; Jeane Eliete Laguila Visentainer<sup>6</sup>; Jesuí Vergílio Visentainer<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Enfermeira – Banco de Leite do Hospital Universitário de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Ciência de Alimentos e Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O leite humano além de ser rico em compostos nutritivos é uma fonte de moléculas bioativas, como as citocinas. As citocinas presentes no leite podem atravessar a barreira intestinal do recém-nascido (RN) e atuar na modulação da resposta imune garantindo a proteção contra diversas doenças. **Objetivo:** Avaliar as citocinas da resposta Th17: interleucina 17A/F (IL-17A/F), IL-21 e IL-22, nas diferentes fases do leite (coloostro, transição e maduro), assim como, entre os tempos de mamada (início da mamada, após 15 minutos e após 30 minutos) em cada fase de lactação. **Material e métodos:** Este Estudo de Coorte foi aprovado pelo COPEP n° 3.098.157. Foram avaliados leites de 5 mães de bebês saudáveis, nascidos após 37 semanas de gestação e sem complicações no parto. As concentrações das citocinas IL-17A/F, IL-21, IL-22 foram mensuradas por citometria de fluxo utilizando a tecnologia Luminex. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney e foi considerado significativo *P*-valor <0,05. **Resultados:** Quando avaliamos as fases do leite, observamos que a IL-21 estava aumentada no colostro em relação ao leite de transição (média  $\pm$  desvio padrão: 756 pg/mL  $\pm$  282 vs. 353 pg/mL  $\pm$  40, respectivamente, *P*=0,046) e ao leite maduro (222 pg/mL  $\pm$  62, *P*=0,011). No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para IL-17A/F e IL-22 nas fases de lactação. Não foram observadas diferenças entre as concentrações das citocinas avaliadas nos diferentes tempos de mamada. A IL-21 é uma citocina pleiotrópica importante para o RN por proporcionar proteção aos tecidos mucosos, sendo uma citocina com papel chave no desenvolvimento da resposta Th17. **Conclusão:** O colostro apresentou níveis mais elevados de IL-21 do que as demais fases de lactação enquanto que IL-17A/F e IL-22 não foram diferentes entre as fases. Também não houve variação entre as citocinas avaliadas nos distintos tempos de mamada.

**Palavras-chave:** leite humano; Th17; citocinas.

**Financiador (es):** Capes, CNPq, Fundação Araucária, Aple-A-UEM e LIG-UEM

**Área temática:** Imunologia

## QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE INTERLEUCINA 5 EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Matheus Braga<sup>1</sup>; Fernanda Formaggi Lara Armi<sup>2</sup>; Marco Antonio Rocha-Loures<sup>2</sup>; Janisleya Silva Ferreira Neves<sup>2</sup>; Ana Maria Sell<sup>3</sup>; Ricardo Alberto Moliterno<sup>3</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença reumática inflamatória crônica e progressiva que envolve principalmente articulações sacroilíacas. Embora sua fisiopatologia não seja bem esclarecida, estudos demonstraram um aumento nos níveis de produção de algumas citocinas, entre elas a Interleucina 5 (IL-5). A IL-5 é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por linfócitos Th<sub>2</sub> e mastócitos, cuja função é estimular a produção linfócitos B.

**Objetivo:** Avaliar os níveis séricos de IL-5 em pacientes com EA e controles. **Material e métodos:** Este estudo de caso-controle foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade estadual de Maringá (UEM) n° CAAE 27723114 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento. Foram selecionados 51 indivíduos, destes 36 pacientes com EA e 15 controles saudáveis. A determinação dos níveis séricos de IL-5 foi realizada utilizando o Kit de Imunoensaio HumanCytokine 10-Plex Panel (Life Technologies, Carlsbad, CA). As análises estatísticas foram realizadas através do programa BioEstat 5.0, utilizando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e o teste de análise entre duas amostras independentes Mann Whitney.

**Resultados:** As amostras não estavam em distribuição normal de acordo o teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ), portanto foi utilizado o teste de Mann Whitney para avaliar se havia diferença estatística entre as medianas dos níveis de IL-5 entre os grupos. O teste mostrou que não houve diferença entre pacientes (2,95pg/ml) e controles (1,97pg/ml),  $p = 0,07$ . **Conclusão:** Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de IL-5 entre os grupos EA e controles, no entanto sugerimos que novos estudos sejam realizados com um número maior de indivíduos.

**Palavras-chave:** interleucina; espondiloartrite; análise quantitativa.

**Financiador (es):** CAPES; CNPq; Laboratório de Imunogenética

**Área temática:** Imunologia

## DIFERENÇAS NOS NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-16 DE HOMENS E MULHERES EM UM ESTUDO COM PERIODONTITE

Victor Hugo de Souza<sup>1</sup>; Josiane Bazzo de Alencar<sup>2</sup>; Joana Maira Valentini Zacarias<sup>2</sup>; Aleia Harumi Uchibaba Yamanaka<sup>3</sup>; Cléverson de Oliveira e Silva<sup>4</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>5</sup>; Ana Maria Sell<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de pós-doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

**Introdução:** A periodontite é uma doença altamente prevalente, caracterizada pela destruição progressiva do periodonto e osso alveolar. A Interleucina-16 (IL-16) é uma citocina quimiotática para leucócitos associada com resposta inflamatória em doenças. Sua presença, em níveis alterados, pode indicar modulações na resposta imune e patogênese em doenças como a periodontite. **Objetivo:** Investigar os níveis séricos de IL-16 em indivíduos, nos parâmetros idade, sexo e periodontite. **Material e métodos:** Foram selecionados para o estudo 39 indivíduos atendidos em clínicas odontológicas em Maringá, noroeste do Paraná, sendo 30 indivíduos diagnosticados com periodontite e 9 controles. Todos esses adultos maiores que 30 anos, não fumantes, compostos por 20 mulheres e 19 homens. Grávidas, indivíduos com doenças inflamatórias crônicas, autoimunes e diabetes não foram incluídos no estudo. O estudo foi realizado conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá – UEM (Nº 719/2011, 2011 e 1.866.509, 2016). A dosagem sérica foi realizada pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando kit ELISA IL16-RAB0261 Sigma-Aldrich™. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste U de Mann-Whitney, considerando significativo  $p < 0,05$ . **Resultados:** Para o parâmetro sexo, maior concentração de IL-16 foi observada entre mulheres (média de 257,7 pg/ml  $\pm$ 79,9) quando comparadas aos homens (74,0 pg/ml  $\pm$ 11,0),  $p < 0,00001$ . Quando comparados pacientes e controles, não foram observadas diferenças significativas entre tais grupos ( $p = 0,87$ ). Ausência de significância também foi observada após análise estratificada de casos e controles dentro dos grupos de mulheres ( $p = 0,29$ ) e homens ( $p = 0,13$ ). A média de idade dos indivíduos foi de  $47 \pm 8,4$  anos, e não foram observadas diferenças significativas entre idade e níveis de IL16 ( $p = 0,05$ ). **Conclusão:** Neste estudo, mulheres apresentaram níveis mais elevados de IL-16 no soro comparadas aos homens, entretanto, alterações significativas dos níveis dessa citocina não foram observadas na periodontite ou com a idade dos indivíduos.

**Palavras-chave:** citocinas; inflamação; ELISA.

**Financiador (es):** CNPq e LIG-UEM

**Área temática:** Imunologia



## INFLUÊNCIA DO IFN-GAMA E IL-4 NO CURSO DA PERIODONTITE

Josiane Bazzo de Alencar<sup>1</sup>; Joana Maira Valentini Zacarias<sup>1</sup>; Victor Hugo de Souza<sup>2</sup>; Fernanda Formaggi Lara<sup>2</sup>; Cléverson de Oliveira e Silva<sup>3</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>4</sup>; Ana Maria Sell<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A periodontite (PD) é caracterizada pela ativação da resposta imune contra periodontopatógenos. As citocinas estão envolvidas na modulação da resposta e podem contribuir para a destruição do tecido periodontal e a reabsorção óssea. **Objetivo:** Avaliar a influência do IFN- $\gamma$  e IL-4 na modulação da resposta imune nos pacientes com PD da região noroeste do Paraná. **Material e métodos:** O estudo caso-controle foi aprovado pelo comitê de ética da UEM (COPEP-UEM, No. 1.866.509, 14/12/2016). Trinta pacientes e 8 controles foram selecionados, todos com idade maior que 30 anos, não fumantes, sem PD agressiva e doenças como diabetes, doenças infecciosas e osteoartrites, sem uso de drogas anti-inflamatórias e antibióticos e não fizeram tratamento periodontal nos últimos 6 meses. Os pacientes foram classificados de acordo com a extensão (localizada e generalizada) e severidade (leve, moderada e severa) da PD. As citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-4 (IL-4) foram quantificadas no soro dos indivíduos utilizando o kit *human cytokine 10-plex panel* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Canada), tecnologia Luminex. A concentração de citocinas foi comparada entre os grupos utilizando o teste Mann-Whitney. O valor de *P* menor que 5% foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Os níveis das citocinas avaliadas não foram estatisticamente diferentes entre pacientes e controles, apesar da IL-4 estar diminuída nos pacientes ( $P=0,057$ ). Quando os pacientes foram classificados de acordo com a severidade, o IFN- $\gamma$  estava aumentado no grau moderado da PD comparado ao severo (22,99 vs. 14,15 pg/mL;  $P=0,04$ ) e a IL-4 estava diminuída no grau leve comparado aos controles (42,9 vs. 69,43 pg/mL;  $P=0,02$ ). **Conclusão:** O IFN- $\gamma$ , citocina com perfil Th1, e a IL-4, Th2, estão relacionadas à modulação da resposta imune na PD ao influenciar no grau de severidade da doença.

**Palavras-chave:** citocinas; doenças periodontais; periodontite.

**Área temática:** Imunologia



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Microbiologia

## GENOTYPICAL PROFILE OF HEPATITIS B VIRUS IN CHRONIC CARRIERS PATIENTS OF CASCAVEL CITY, PARANÁ, BRAZIL

Alex Sandro Jorge<sup>1,2</sup>, Cláudia Ariati<sup>3</sup>, Bárbara Sackser Horvath<sup>3</sup>, Barbara Gimenez Sartor<sup>4</sup>, Josana Aparecida Dranka Horvath<sup>5</sup>, Deborah de Castro Moreira<sup>2</sup>, Fernando Américo Jorge<sup>2</sup>, Gabriele do Nascimento Oliveira<sup>6</sup>, Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>7</sup>, Dennis Armando Bertolini<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Professor – Medical and Pharmaceutical Sciences Centre, State University of West Parana, Cascavel/PR

<sup>2</sup>Pos-Graduate Academic (PhD) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Pharmacy Student, State University of West Paraná, Cascavel/PR

<sup>4</sup>Biomedicine Student, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Nurse, Specialized Centre in Infectious and Parasitary Diseases (CEDIP), Cascavel/PR

<sup>6</sup>Pos-Graduate Academic (MSc) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Hepatitis B virus (HBV) is currently classified into at least 10 genotypes (A-J) and previous studies have shown that genotypes D and A were most prevalent in Paraná State.

**Objective:** To identify the HBV genotype in chronic hepatitis B patients undergoing treatment in the municipality of Cascavel, Paraná. **Material and methods:** This study was as approved by the Committee of Ethics in Research with Human (Nº 2191947) and included 27 samples of patients with chronic hepatitis B in the municipality of Cascavel, who are undergoing treatment at the Specialized Centre in Infectious and Parasitary Diseases of Cascavel-PR (CEDIP). HBV DNA was extracted of blood plasma using PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, USA), amplified by nested-PCR for the complete HBV Pol/S gene region and sequenced with the AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The genotypes were obtained with phylogenetic analysis (*Maximum Likelihood and Neighbor-Joining Trees* methods) comparing the amplified S gene DNA fragments with DNA sequences from different HBV genotypes and subgenotypes obtained from the GenBank. **Results:** Among 27 samples collected, viral DNA was recovered in 18 samples. Two genotypes and four subgenotypes were identified: 14 (77.8%) samples were characterized as genotype D, among which 4 samples characterized as subgenotype D1 (HBV/D1) and 10 samples as subgenotype D3 (HBV/D3); 4 (22.2%) were classified as genotype A, of which 3 as subgenotype A1 (HBV/A1) and 1 as subgenotype A2 (HBV/A2). **Conclusion:** The genotypes found in Cascavel city are compatible with those found in the European continent. This pattern was expected and probably was introduced in this region by the large colonization of European immigrants.

**Keywords:** genotype; hepatitis B; hepatitis B virus.

**Financial support:** Fundação Araucária, CNPq/CAPES

**Thematic area:** Microbiology

## ANÁLISE PRELIMINAR DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS ISOLADAS EM SUPERFÍCIES INANIMADAS DA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA (UTI) DE UM HOSPITAL DE TRÊS LAGOAS, MS

Aline Rafaela da Silva Rodrigues Machado<sup>1</sup>; Miriam Daiane de Oliveira<sup>2</sup>; Joyce Caroline Resende Moraes<sup>2</sup>; Rachid Figueirôa Souza<sup>2</sup>; Luiz Gustavo Bernardes<sup>3</sup>; Alex Martins Machado<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Docente de Graduação em Medicina, Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS  
<sup>2</sup>Acadêmicos do curso de Medicina, Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS  
<sup>3</sup>Farmacêutico – Técnico de Laboratório – Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS  
<sup>4</sup>Docente de Graduação em Medicina, Imunologia e Virologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

**Introdução:** Ambientes hospitalares possuem uma variedade de microrganismos patogênicos, muitos deles resistentes a um amplo espectro de antibióticos, tornando-os potencialmente perigosos. **Objetivo:** Investigar o perfil de resistência a antimicrobianos em microrganismos isolados em superfícies inanimadas do setor de UTI de um hospital de Três Lagoas, MS. **Material e métodos:** Amostras da superfície de 5 leitos (biombo, maca, painel, esfigmomanômetro e bomba de infusão), equipamentos e instrumentos do interior da UTI (teclado e mouse de computador, telefone e portas de acesso) foram recolhidas utilizando swab estéril embebido em solução fisiológica. As amostras (134) foram semeadas em ágar sangue e as colônias obtidas foram isoladas em meio *Mueller Hinton*, e identificadas seguindo protocolo padrão. O antibiograma foi realizado seguindo especificações do CLSI M2-A8. **Resultados:** Foram isoladas 267 colônias, sendo 198 pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (74,15%), onde o *Staphylococcus epidermidis* foi o mais prevalente (62,6%), seguido do *Staphylococcus aureus* (31,3%) e *Staphylococcus saprophyticus* (6,1%). Identificamos 11 bacilos Gram negativos (4,11%), sendo 1,87% *Pseudomonas* spp e 2,24% *Klebsiella* spp. Também foram isolados 32 bacilos Gram positivos (11,98%), com a presença de morfologia e esporos sugestivos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* entre outros. Entre os cocos Gram positivos, 26,84% mostraram perfil de resistência a um ou mais antibióticos, sendo a Eritromicina o antibiótico que mostrou a maior resistência e a Estreptomicina com menor resistência. Entre as bactérias Gram negativas observamos maior porcentagem de resistência (36,11%), onde o Aztreonam mostrou ser o antibiótico com maior resistência e o Imipinem o com menor resistência. Ainda, entre os bacilos Gram positivos, 24,29% mostraram resistência a um ou mais antibióticos, sendo a Ampicilina o antibiótico com maior resistência. **Conclusão:** As bactérias isoladas mostraram uma alta taxa de resistência a antibióticos sendo imprescindível o monitoramento constante de cepas patogênicas e multirresistentes no ambiente hospitalar.

**Palavras-chave:** antimicrobianos; resistência microbiana a medicamentos; unidade de terapia intensiva

**Financiador (es):** CNPq e UFMS

**Área temática:** Microbiologia

## SELEÇÃO DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO PARA GERAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DENGUE

Amauri Donadon Leal Junior<sup>1</sup>; Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>2</sup>; Erika Seki Kioshima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** No primeiro trimestre de 2019, a infecção pelo vírus da Dengue (DENV) aumentou em 28,2% comparado ao mesmo período de 2018. Associado aos surtos por outras Arboviroses (Zika e Chikungunya) nos anos anteriores e a similaridade dos sintomas causados pelos três patógenos, o diagnóstico diferencial entre eles se tornou um desafio ainda maior.

**Objetivo:** Selecionar sequências de aminoácidos do DENV para produção de proteínas heterólogas a fim de desenvolver um teste diagnóstico capaz de distinguir os quatro sorotipos do DENV, vírus Zika (ZIKV) e vírus Chikungunya (CHIKV). **Material e métodos:** As sequências de aminoácidos dos arbovirus: ZIKV, CHIKV e dos quatro sorotipos de DENV, depositadas na plataforma *Virus Variation* desde 2010, foram alinhadas. As regiões com baixa identidade foram selecionadas para os próximos passos. A disposição destas regiões na estrutura tridimensional das proteínas do DENV foi identificada. As sequências de nucleotídeos destas regiões foram obtidas e validadas após análise no banco de dados BLAST, para avaliar a especificidade das regiões selecionadas. **Resultados:** As análises de bioinformática permitiram a seleção de somente três regiões específicas para DENV: uma na proteína M e duas na proteína E. Para distinção entre os quatro sorotipos de DENV, foram identificados pelo menos dois epítomos com grau de identidade <30 cada para um dos sorotipos. As duas regiões da proteína E foram localizadas na porção superficial do DENV. Por outro lado, a região da proteína M está localizada em uma porção mais interna da proteína do DENV. Estas regiões foram selecionadas para construção das quimeras específicas para cada um dos sorotipos do DENV. **Conclusão:** As regiões do DENV selecionadas para desenho das proteínas quiméricas apresentaram baixo grau de identidade entre seus diferentes sorotipos e demais membros da família dos arbovirus. Estas diferenças possivelmente possibilitarão a diferenciação entre DENV, ZIKV e CHIKV no diagnóstico sorológico.

**Palavras-chave:** sorologia diferencial; proteína recombinante; bioinformática.

**Área temática:** Microbiologia



## EFICÁCIA DA COMBINAÇÃO DE EUGENOL E SORBATO DE POTÁSSIO NO CONTROLE DE *Escherichia coli*

Andreia Farias Pereira Batista<sup>1</sup>; Daliah Alves Coelho Trevisan<sup>2</sup>; Adriele Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>; Maíra Dante Formagio<sup>3</sup>; João Vitor de Oliveira Silva<sup>3</sup>; Lorena Fortunato Prohmann<sup>4</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Doutorado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmica(o) de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmica de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** *Escherichia coli* é uma bactéria capaz de viver inofensivamente no cólon, porém algumas cepas podem causar doenças. Entre os patótipos encontram-se as *E. coli* diarreio gênicas que são uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, afetando todas as faixas etárias. Para evitar que este problema ocorra uma opção é o uso de compostos com atividade antibacteriana. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana de eugenol (EUG) e sorbato de potássio (SP) sozinhos e em combinação contra *E. coli* ATCC 25922 em pH 4,5. **Material e métodos:** A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de EUG e SP foram determinadas pelo ensaio de microdiluição em caldo. A interação entre EUG e SP foi determinada pelo método de *checkerboard*. O ensaio de curva de morte foi realizado com os compostos isolados e combinados em concentrações subinibitórias nos intervalos 0, 3, 6, 12, 24 e 48h. **Resultados:** EUG e SP apresentaram valores de CIM de 1250 e 2500 µg/mL, enquanto os valores de CBM foram de 1250 e 10.000 µg/mL, respectivamente. A combinação entre EUG e SP apresentou efeito sinérgico e essa combinação reduziu a CIM de EUG para 156 µg/mL (1/8) e de SP para 78 µg/mL (1/32). Após 48 h de incubação no ensaio de curva de morte, *E. coli* atingiu uma população de 8,6 log<sub>10</sub> UFC/mL e EUG a 156 µg/mL não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Entretanto, nenhuma célula viável foi recuperada com SP a 78 µg/mL após 24 h e a combinação de EUG e SP foi capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano dentro de 12 h. **Conclusão:** Estes resultados demonstraram atividade sinérgica entre EUG e SP e o uso destes compostos combinados em concentrações subinibitórias apresentou efetividade no controle de *E. coli*.

**Palavras-chave:** atividade antibacteriana; eugenol; sinergismo.

**Financiador:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

**Área temática:** Microbiologia

## FORMAÇÃO DE BIOFILME FÚNGICO EM BALÃO INTRAGÁSTRICO

Andressa Cristina do Prado<sup>1</sup>; Elton da Cruz Alves Pereira<sup>1</sup>; Jakeline Luiz Corrêa<sup>1</sup>; Rubens de Oliveira Brito<sup>2</sup>; Melyssa Negri<sup>3</sup>; Terezinha Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência da Saúde, UEM - Universidade Estadual de Maringá. Brasil - Maringá/PR

<sup>2</sup>Médico pela Universidade Estadual de Maringá; Especializado em Cirurgia Geral pelo Bom Samaritano e Endoscopia Digestiva pelo IGECAD. Brasil - Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, UEM - Universidade Estadual de Maringá. Brasil - Maringá/PR

**Introdução:** Balão intragástrico (BIG), usado para o tratamento da obesidade, permanece no estômago por longos períodos e, assim como outros dispositivos médicos, é confeccionado em biomaterial (silicone), superfície propícia para formação de biofilmes, porém, esse contexto ainda é pouco conhecido. **Objetivo:** Caracterizar microbiologicamente biofilme formado sobre um BIG explantado, apresentando hiperinsuflação. **Material e métodos:** Paciente sexo feminino, 38 anos, 99,8 kg, IMC 32,5kg/m<sup>2</sup>, iniciou o tratamento com BIG de seis meses para tratamento da obesidade grau I. Durante o tratamento a paciente apresentava eructações fétidas e halitose. No 129º dia após a inserção, a paciente apresentou dores abdominais e vômitos, sem melhoras do quadro com medicação sintomática, à radiografia foi evidenciada uma hiperinsuflação fazendo-se necessário o explante precoce. Durante a endoscopia para remoção do dispositivo, foram observadas pequenas massas amareladas na válvula e corpo do balão. A remoção seguiu os protocolos convencionais de retiradas e não houve nenhuma intercorrência no procedimento. Após a remoção, as massas vistas endoscopicamente foram criteriosamente observadas, eram fixas, não removidas mecanicamente, sugerindo biofilme microbiano. O balão explantado foi encaminhado ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá. Análise microbiológica foi realizada no Departamento de Micologia Médica, utilizando-se alça microbiológica para cultivo em Ágar Sabouraud Dextrose 35°C por 48 horas. **Resultados:** Após dois dias houve crescimento de pequenas colônias branco-amareladas, cuja triagem em CHROMagar Candida® sugeriu dois tipos macroscópicos que sob os aspectos micromorfológicos foram identificados como *Candida albicans* e *C. glabrata*. **Conclusão:** Mesmo em ambiente inóspito como o estômago, as leveduras foram capazes de formar biofilme polimicrobiano na superfície do BIG. Essa é uma problemática nova, mais estudos são necessários para melhor compreensão das implicações desses achados ao dispositivo e ao paciente, diretamente ligados à segurança e qualidade de vida dos portadores de BIG.

**Palavras-chave:** balão intragástrico; biofilme fúngico; *Candida* spp.

**Área temática:** Microbiologia

## PROMISING SYNERGISTIC ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEW OXADIAZOLE-AMPHOTERICIN B ASSOCIATIONS

Bruna Lauton Simões<sup>1</sup>; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues Vendramini<sup>2</sup>; Vanessa Matsumoto Venâncio<sup>3</sup>; Daniella Renata Faria<sup>2</sup>; Raquel Cabral Melo<sup>1</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>2</sup>; Gláucia Sayuri Arita<sup>2</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>4</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (Master's degree) in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Graduate student (Doctoral degree) in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Undergraduate student in Biomedicine, State University of Maringá

<sup>4</sup>Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá

**Introduction:** Paracoccidioidomycosis (PCM) is an important neglected infection disease in Latin America. Due to long periods of treatment, the conventional antifungals present problems related to toxicity and residual sequelae. Therefore, *in silico* methods have been used to develop new drugs against specific fungal target. Recently, LMM6 was selected by virtual screening as potential inhibitor of thioredoxin reductase. This compound were presented promising antifungal activity against many pathogenic fungal. **Objective:** Evaluate the synergic interaction between amphotericin B (AmB) and LMM6, a new oxadiazole selected by *in silico* approaches. **Material and methods:** Five clinical isolates from *Paracoccidioides* spp. were analyzed by checkerboard assay. Briefly, LMM6 (starting at 4x MIC, with MIC values 0,5, 1 - for three isolates - and 2) were distributed vertically while AmB (4x MIC, being MIC = 2) was added horizontally. Yeast was added to 96-well plates and incubated at 35°C for 7 days. The interaction profile was determined by resazurin-reduction assays. The fractional inhibitory concentration (FIC) was obtained by the formula  $\Sigma FIC = FIC A + FIC B$ , where FIC A is the combination MIC / MIC of the compound LMM6 alone, and FIC B is the combination MIC / MIC of the AmB alone. For a strongly synergistic effect,  $FIC < 0.5$ ; a synergistic effect,  $FIC < 1$ ; an additive effect,  $FIC = 1$ ; no effect,  $1 < FIC < 2$ ; and an antagonistic effect,  $FIC > 2$ . **Results:** The FIC values ranged from 0.312 to 0.62. Among the five clinical isolates from *Paracoccidioides* spp, three isolates presented a strongly synergistic effect between LMM6 and AmB. Others two presented a synergistic effect when combined with AmB. **Conclusion:** LMM6 shows promising action against most clinical isolates from *Paracoccidioides* spp. Moreover, the synergistic effect with amphotericin B may provide beneficial attributes for new therapeutic strategies against PCM.

**Keywords:** paracoccidioidomycosis; antifungal agents; checkerboard assay.

**Financial support:** CNPq, Fundação Araucária

**Thematic area:** Microbiology

## ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus urograndis* SOBRE *Candida* spp.

Bruna Leticia do Monte<sup>1</sup>; Raquel Cabral Melo<sup>2</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>3</sup>, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>3</sup>; Alessandra Barrochelli da Silva Ecker<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Centro Universitário Ingá - Uningá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente - Centro Universitário Ingá - Uningá, Maringá/PR

**Introdução:** Fungos do gênero *Candida* são frequentemente encontrados em infecções fúngicas. *Candida albicans* é a espécie mais frequente, entretanto, nas últimas décadas as espécies *Candida* não-*C. albicans* têm emergido. A resistência dessas espécies aos antifúngicos convencionais desperta interesse para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Neste contexto, destacam-se, entre os compostos naturais, as espécies de *Eucalyptus* que têm apresentado vantagens na área medicinal. **Objetivo:** Avaliar atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus urograndis* sobre espécies de *Candida*. **Material e métodos:** O óleo de *E. urograndis* foi extraído das folhas jovens pelo método de Clevenger. O teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro* foi realizado através do método de microdiluição em caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M27-A3), com modificações para produtos naturais. Foram testadas três cepas padrão, sendo *C. albicans* (ATCC 90028), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). O óleo foi avaliado em seis concentrações diferentes variando de 0,39 a 0,012%. Após 48h de incubação, alíquotas foram coletadas e plaqueadas em *Sabouraud Dextrose Agar* para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), e diluições seriadas foram realizadas para avaliação quantitativa das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL). A CFM foi considerada quando houve redução na viabilidade celular de 100% em relação ao controle positivo (leveduras na ausência do óleo avaliado). **Resultados:** Menor CFM foi encontrada para *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, nas concentrações de 0,04%, 0,09% e 0,19%, respectivamente. A UFC/mL mostrou redução quantitativa de 6 log da viabilidade celular na concentração de 0,04% para *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis* com redução de 5 log em 0,19% e *C. parapsilosis* com redução de 2,5 log em 0,09%. **Conclusão:** O óleo de *E. urograndis* demonstrou importante atividade antifúngica sobre diferentes espécies de *Candida*, sendo promissor para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

**Palavras-chave:** atividade antifúngica; *Candida* spp.; *Eucalyptus urograndis*.

**Área temática:** Microbiologia

## ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* E CITOTOXICIDADE DE PIPERINA ENCAPSULADA EM NANOPARTÍCULAS

Carolina Trevisolli Palomo<sup>1</sup>; Carla Maria Mariano Fernandez<sup>2</sup>; João Vítor Perez de Souza<sup>1</sup>; Letícia Sayuri Murase<sup>3</sup>; Thaysa Ksiaskiewicz Karam<sup>2</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>5</sup>; Vera Lúcia Dias Siqueira<sup>5</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>5</sup>; Benedito Prado Dias Filho<sup>6</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A nanotecnologia é uma alternativa promissora para resolver baixa biodisponibilidade, melhorar a citotoxicidade e eficácia de fármacos. A piperina já foi relatada por aumentar a biodisponibilidade de fármacos, ter propriedades imunomoduladora e antimicrobiana, incluindo atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*. **Objetivo:** Preparar nanopartículas de piperina, avaliar a atividade em cepa padrão H<sub>37</sub>Rv de *Mtb* e a citotoxicidade destes compostos. **Material e métodos:** As nanopartículas (NP) poliméricas de poli (ácido-lático) (NPLA) foram preparadas por precipitação através do método de gotejamento. As NP poli (ácido láctico-ácido glicólico) (NPLGA) contendo piperina revestida com quitosana foram preparadas pela técnica de emulsificação-evaporação do solvente. As NP de  $\beta$ -ciclodextrina (N $\beta$ CD) contendo piperina foram preparadas por precipitação e secas em Nano Spray Dryer. Foram analisadas visualmente quanto a cor, aparência, consistência e separação de fase. A determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das NP foram obtidas pelo método de espalhamento de luz e o potencial Zeta por mobilidade eletrostática. A morfologia e homogeneidade das NP foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão. A concentração inibitória mínima (CIM) das NP para H<sub>37</sub>Rv foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Assay Plate* em triplicata. A avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando células VERO (ATCC CCL81), pelo método MTT e a concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) foi calculada. **Resultados:** A CIM foi de 62,5 $\mu$ g/mL e 500 $\mu$ g/mL para NPLGA e N $\beta$ CD, respectivamente. NPLA e as NP sem piperina não apresentaram atividade anti-*Mtb*. A CIM da piperina isolada foi de 62,5 $\mu$ g/mL em *Mtb*. O CC<sub>50</sub> encontrado para todas as NP foi >1000  $\mu$ g/mL, exceto para piperina. N $\beta$ CD está em testes. **Conclusão:** A CIM de NPLGA foi similar à da piperina isolada em de *Mtb* H<sub>37</sub>Rv, mas com uma citotoxicidade promissora. Desta forma, é importante ressaltar a necessidade da continuidade dos estudos de encapsulação de fármacos em NP a fim de melhorar sua eficácia e citotoxicidade.

**Palavras-chave:** nanopartículas poliméricas; piperina; *Mycobacterium tuberculosis*.

**Financiador (es):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

**Área temática:** Microbiologia



## FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Daliah Alves Coelho Trevisan<sup>1</sup>; Andreia Farias Pereira Batista<sup>2</sup>; Adriele Rodrigues dos Santos<sup>2</sup>; Maíra Dante Formagio<sup>3</sup>; João Vitor do Oliveira Silva<sup>3</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá<sup>4</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

<sup>2</sup>Acadêmicas de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

<sup>3</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

<sup>4</sup>Docentes – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

**Introdução:** Na indústria alimentícia, a formação de biofilmes bacterianos pode ser uma fonte contínua de contaminação cruzada, uma vez que os alimentos podem entrar em contato com as superfícies. Conseqüentemente pode ocorrer deterioração ou doenças transmitidas por alimentos (DTAs), resultando em perdas econômicas e problemas de saúde pública. *Staphylococcus aureus* tem sido relatado em vários surtos de DTAs e com a capacidade de formar biofilmes. **Objetivo:** Avaliar a capacidade de formação de biofilme de diferentes isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos envolvidos em surtos de DTAs. **Materiais e métodos:** Cinco cepas de *S. aureus* isolados de alimentos envolvidos em surtos foram utilizadas neste trabalho. A habilidade de formar biofilmes foi avaliada pela contagem de colônias sobre polipropileno, e os resultados foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>. A quantificação da biomassa foi determinada pelo ensaio de cristal violeta, com leitura da densidade óptica (DO) a 550nm. Neste ensaio, a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo para formação de biofilme, e o meio *Tryptic Soy Broth* sem bactéria foi utilizado como controle negativo (C-). Para determinar a produção de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não produtor de biofilme ( $DO \leq DO$  C-); fraco produtor de biofilme ( $DO$  C-  $< DO \leq 2 \times DO$  C-); formador de biofilme moderado ( $2 \times DO$  C-  $< DO \leq 4 \times DO$  C-) e forte formador de biofilme ( $4 \times DO$  C-  $< DO$ ). **Resultados:** Pela determinação da contagem das colônias, observou-se que a população dos isolados de *S. aureus* sobre polipropileno variou de 7,04 a 7,95  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>. O ensaio de cristal violeta determinou que *S. aureus* ATCC apresentou DO de 0,92 e o C-, DO de 0,05. Nos isolados de *S. aureus* a DO variou de 0,27 a 1,31. **Conclusão:** Os resultados comprovam que todos os isolados são capazes de formar biofilme.

**Palavras-chave:** biofilme; intoxicação alimentar; *Staphylococcus aureus*.

**Financiador (es):** CAPES, CNPq

**Área temática:** Microbiologia

## SYNERGISTIC EFFECT OF AN OXADIAZOLE AND CONVENTIONAL ANTIFUNGALS AGAINST *Candida albicans*

Daniella Renata Faria<sup>1</sup>; Raquel Cabral Melo<sup>2</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>1</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>1</sup>; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini<sup>1</sup>; Bruna Lauton Simões<sup>2</sup>; Camila Barros Galinari<sup>2</sup>; Isis Regina Grenier Capoci<sup>3</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>3</sup>; Erika Seki Kioshima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Graduate student (Master's degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

**Introduction:** Resistance in *Candida albicans* to conventional antifungal has been described, increasing the need for new therapeutic approaches. Combination therapy may be an alternative to overcome the challenges of treating patients with invasive candidiasis. **Objective:** Evaluate the synergistic interaction between the oxadiazole (LMM6; Process number BR 102018 0090208) and conventional antifungals (amphotericin: AmB; caspofungin: CASP) against *C. albicans* ATCC 90028. **Material and methods:** The combined effect of AmB (0.004 - 0.5µg/mL) and CASP (0.004 - 0.5µg/mL) with LMM6 compound (0.5-32µg/mL) was evaluated by checkerboard method. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by measuring the absorbance at 405nm and the synergistic effect by fractional inhibitory concentration (FIC), calculated as the sum of (MIC combined<sub>AmB or CASP</sub>/MIC alone<sub>AmB or CASP</sub>) + (MIC combined<sub>LMM6</sub>/MIC alone<sub>LMM6</sub>). FIC values < 0.5 indicate strongly synergistic effect, FIC < 1 synergistic effect, FIC = 1 additive effect, 1 < FIC < 2 no effect and FIC > 2 antagonistic effect. The Bliss-independent interactions were analyzed by Combeneft software. **Results:** AmB combined with LMM6 showed better antifungal activity than alone, reducing the MIC value and resulting in a FIC of 0.53. The same pattern was observed for CASP and LMM6 with FIC of 0.56. These results indicate a synergistic effect of both conventional drugs with LMM6. The Bliss independence surface analysis revealed a predominance of blue areas, indicating a positive  $\Delta E$ , validating the FIC results and confirming the synergic effect. **Conclusion:** Compound combination can increase activity effectiveness due to the possibility of action on more than one target, reducing the need for high doses and minimizing adverse effects. The synergistic action observed between conventional drugs and the LMM6 compound is promising and may have its use in future applications for the treatment of candidemia caused by species that are less sensitive or resistant to conventional drugs.

**Keywords:** *Candida albicans*; synergistic; oxadiazole.

**Financial support:** Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

**Thematic area:** Microbiology

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE UMA SÉRIE DE DERIVADOS ACILHIDRAZÔNICOS DO ÁCIDO TIOFÊNICO FRENTE A *Mycobacterium tuberculosis*

Dayane Cristina Batista Leal<sup>1</sup>; Débora Cássia Montaholi<sup>1</sup>; Eloísa Gibin Sampiron<sup>2</sup>; Fábio Vandresen<sup>3</sup>; Rafaela Yukari<sup>4</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>5</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>5</sup>; Gabrielle Vaz da Silva<sup>6</sup>; Vanessa Guimarães Alves Olher<sup>7</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>5</sup>  
<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR  
<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR  
<sup>3</sup>Docente – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná Londrina/PR  
<sup>4</sup>Acadêmica – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina/PR  
<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR  
<sup>6</sup>Acadêmica de Biomedicina – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá Maringá/PR  
<sup>7</sup>Docente – Departamento de Química, Instituto Federal do Paraná, Paranavaí/PR

**Introdução:** A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que, apesar de antiga, continua sendo um importante problema de saúde pública no mundo; ainda mais com o advento global do aumento da resistência antimicrobiana. Hoje, o principal foco da descoberta de novos fármacos anti-TB reside no desenvolvimento de substâncias capazes de diminuir e simplificar o tratamento, com potencial para diminuir efeitos colaterais, além de eliminar interações entre os principais fármacos utilizados no tratamento de TB/HIV. **Objetivo:** Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de uma série de derivados sintéticos acilhiazônicos do ácido tiofênico sobre a cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294). **Material e Métodos:** A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica *resazurin microtiter assay plate* (REMA). Cada substância teste foi diluída de forma seriada na concentração de 250 a 1,95 µg/mL. A isoniazida foi usada como fármaco controle. O crescimento bacteriano foi padronizado segundo a escala 1 de McFarland e diluído na proporção 1:20. A placa foi incubada a 35 °C por 7 dias. Ao final desse período adicionou-se 30 µL de resazurina 0,01% às cavidades e procedeu-se a leitura visual em 24 e 48 horas. **Resultados:** Dentre os sete derivados sintéticos acilhiazônicos do ácido tiofênico testados, duas substâncias (TIOF03 e TIOF09) apresentaram os melhores resultados frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, com valores de CIM de 7,8 µg/mL e 15,6 µg/mL, respectivamente. Os outros derivados (TIOF01, TIOF02, TIOF04, TIOF05 e TIOF10) apresentaram CIM variando de 62,5 µg/mL a ≥ 250 µg/mL. **Conclusão:** Das substâncias analisadas, três demonstraram resultados promissores (TIOF03, TIOF04 e TIOF09) frente ao bacilo da tuberculose. No entanto, outros estudos são necessários para confirmar o potencial antimicrobiano desses derivados, bem como sua toxicidade.

**Palavras-chave:** tuberculose; concentração inibitória mínima; hidrazonas.

**Financiador:** CNPq, CAPES

**Área temática:** Microbiologia

## FIRST GENETIC CHARACTERIZATION OF THE CHIKUNGUNYA VIRUS CIRCULATING IN SOUTHERN BRAZIL

Deborah de Castro Moreira<sup>1</sup>; Francisco Ferreira Duarte Junior<sup>2</sup>; José Renato Pattaro Junior<sup>2</sup>; Fernando Américo Jorge<sup>1</sup>; Henrique Pereira dos Santos<sup>3</sup>; Mayra Marinho Presibella<sup>4</sup>; Irina Nastassja Riediger<sup>4</sup>; Maria Aparecida Fernandez<sup>5</sup>; Luciana Dias Ghiraldi Lopes<sup>6</sup>; Dennis Armando Bertolini<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Doctorate in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup> Postgraduate in Biological Sciences (Concentration Area – Cellular and Molecular Biology), State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup> Undergraduate in Medicine, State University of Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup> Central Laboratory of the State of Paraná – LACEN-PR, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>5</sup> Docent – Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology

<sup>6</sup> Docent – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emergent arbovirus belonging to the *Alphavirus* genus of the *Togaviridae* Family, whose causes an acute febrile syndrome with debilitating arthralgia. Phylogenetic studies characterize CHIKV in three major genotypes, according to the geographic region of their isolation: West African (WA), East, Central and South African (ECSA) and Asian. Until now, we did not found phylogenetic studies using CHIKV strains circulating in southern Brazil. Actually, we know, is that the first autochthonous cases of CHIKV in the country occurred on 2013, and that phylogenetic studies confirmed the entry of the virus in two distinct ways: ECSA genotype in Bahia, from Central Africa, and the Asian genotype in Amapá, from the Caribbean. **Objective:** Therefore, we aimed here to perform a genetic characterization of CHIKV based on the Envelope E1 gene, using samples recovered in the state of Paraná (PR), in the 2016-2017 biennium. **Material and Methods:** For this, were sequenced five serum samples by automatic sequencer AB 3500 Genetic Analyzer. Maximum Likelihood and Neighbor-joining trees were built with partial sequences of E1 gene and comparative analysis were performed to identify mutations already described. The Permanent Research Ethics Committee State of Maringá approved this study (no. 1.618.106). **Results:** All sequences obtained in this study grouped in the ECSA genotype and the molecular characterization of the E1 gene fragment did not show the E1-A226V mutation, but in one sample observed an E1-K211T amino acid substitution. **Conclusion:** The results showed the circulation of the ECSA genotype of CHIKV in southern Brazil, and did not show E1-A226V mutation. However, we identified E1-K211T amino acid substitution in a single sample, demonstrating the probable dispersion of mutant strains in the country.

**Keywords:** chikungunya; sequence analysis; southern.

**Financial Support:** Capes and Fundação Araucária

**Thematic Area:** Microbiology

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* DE UMA SÉRIE DE *N*-ACILHIDRAZONAS DERIVADAS DA ISONIAZIDA

Eloísa Gibin Sampiron<sup>1</sup>; Leonora Lacerda Calsavara<sup>2</sup>; Nathally Claudiane de Souza Santos<sup>3</sup>; Andressa Lorena Ieque<sup>4</sup>; Fabio Vandresen<sup>5</sup>; Vanessa Guimarães Alves Olher<sup>6</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli<sup>7</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>7</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>7,8</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina/PR

<sup>6</sup>Docente - Instituto Federal do Paraná, Paranavaí/PR

<sup>7</sup>Docente – Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>8</sup>Docente - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A tuberculose (TB) é uma doença de caráter infectocontagioso, causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Embora seja uma doença antiga, ainda hoje continua sendo um grave problema de saúde pública no mundo. O tratamento é realizado utilizando-se um esquema poliquimioterápico, no qual os fármacos isoniazida (INH), etambutol, rifampicina e pirazinamida, atuam em conjunto. Embora o tratamento seja muitas vezes eficaz, em muitos casos causa intensos efeitos colaterais que acabam levando à evasão do tratamento. Desse modo, a busca por novos compostos que possam diminuir o tempo de tratamento e os efeitos colaterais, é imprescindível. As *N*-acilhidrazonas, são substâncias conhecidas por possuírem propriedades biológicas importantes, como ação antimicobacteriana.

**Objetivo:** Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de uma série de cinco *N*-acilhidrazonas derivadas da isoniazida frente a *Mtb* H<sub>37</sub>Rv. **Material e métodos:** A CIM das substâncias foi determinada pelo método resazurin microtiter assay plate. As *N*-acilhidrazonas foram diluídas seriadamente em uma microplaca de 96 poços contendo meio 7H9. A bactéria foi padronizada utilizando escala 1 de McFarland, diluída 1:20 e adicionada à microplaca. Após incubação de 7 dias a 35 °C, foram adicionados 30 µL de resazurina (indicador de viabilidade celular) em cada poço e incubado por 24h. A CIM foi determinada como a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano visível. **Resultados:** As CIMs das *N*-acilhidrazonas testadas variaram entre 0,12 a 3,9 µg/mL. O maior valor de CIM foi observado para a substância (5) (CIM 3,9 µg/mL), seguido das substâncias (1) e (4), cujas CIMs foram equivalentes a 0,48 µg/mL. O melhor resultado foi obtido para a *N*-acilhidrazona (2), com CIM de 0,12 µg/mL, muito próxima a CIM da INH (CIM 0,06 µg/mL). **Conclusão:** Todas as substâncias testadas podem ser consideradas promissoras para o tratamento da TB e nos encorajam a seguir com os estudos *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** tuberculose; *N*-acilhidrazonas; isoniazida.

**Financiadores:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq

**Área temática:** Microbiologia



## **ELECTROSPINNING: UMA FERRAMENTA NA ELABORAÇÃO DE POLÍMEROS NANOESTRUTURADOS APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE TECIDOS BIOLÓGICOS**

Elton da Cruz Alves Pereira<sup>1</sup>; Larissa Miwa Kikuchi Ochikubo<sup>2</sup>; Thaís Emiko Kawasaki<sup>2</sup>; Beatriz Vesco<sup>2</sup>; Flavia Veiga<sup>1</sup>; Gabriel Batista Cesar<sup>3</sup>; Melyssa Negri<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico(a) de Pós-Graduação (Mestrado/Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A técnica de *electrospinning* está sendo amplamente aplicada no desenvolvimento de polímeros de origem sintética e natural à produção de *scaffolds* que mimetizam a matriz extracelular de um tecido vivo. **Objetivo:** Desenvolver polímeros nanoestruturados utilizando o *electrospinning* com aplicabilidade na engenharia tecidual. **Material e métodos:** Para o desenvolvimento dos polímeros nanoestruturado, foi realizada uma solução polimérica, contendo apenas policaprolactona (PCL) e outra solução (PCL+QHI) contendo 12% de PCL com 5% de quitosana (QHI). Ambas as soluções dissolvidas em ácido acético 90% (v/v) durante 48h. Um volume de 10ml de cada solução, PCL e PCL+QHI foram aspirados em seringas distintas com agulha sem ponta e acoplado ao eletrofiador, formalizando os polímeros nanoestruturados sob uma folha de alumínio fixada no coletor. Parâmetros como distância entre coletor e agulha, taxa de fluxo de infusão, tensão elétrica e rotação do coletor foram ajustados conforme a necessidade de se obter a melhor eletrofiação. Para análise estrutural dos polímeros nanoestruturados, foi cortado uma área aproximada de 1,0 cm<sup>2</sup> e realizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV). **Resultados:** PCL e PCL+QHI apresentam características de um fino tecido, sensível, leve, de coloração esbranquiçada e fácil manipulação. Os melhores parâmetros ajustados, para ambos os polímeros, como distância entre coletor e agulha foi de 15 cm, para taxa de fluxo de infusão igual 0,5 mL/h, na tensão elétrica de 20 kV e a rotação do coletor de 30 rpm. A análise morfológica dos polímeros nanoestruturados pela MEV, demonstraram uma conformidade estrutural dos nanofios, apresentando espessura entre 200 nm a 2000 nm de distribuição aleatórias e superfícies lisas, formando uma rede nano-tridimensional densa. **Conclusão:** O desenvolvimento dos polímeros nanoestruturados é reprodutível pela técnica de *electrospinning*, pois, parâmetros ajustados padronizam a conformidade estrutural dos nanofios, formalizando um tecido nanoestruturado que pode mimetizar a matriz extracelular no desenvolvimento de tecidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** quitosana; blenda polimérica; *scaffold*.

**Financiador (es):** Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018, processo: 421620/2018-8

**Área temática:** Microbiologia

## ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS EM BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Felipe Gutierrez Tormena<sup>1</sup>; Júlia Machado Ariozi<sup>1</sup>; Daliah Alves Coelho Trevisan<sup>2</sup>; Maíra Dante Formagio<sup>3</sup>; Nicole Lohana de Souza<sup>3</sup>; Daniela Cristina de Medeiros<sup>4</sup>; João Carlos Palazzo de Mello<sup>5</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>6</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Apesar do frequente uso dos conservantes químicos em alimentos, infelizmente os surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e a deterioração de alimentos ainda geram um enorme prejuízo, não só para a indústria alimentícia mas também para a saúde de milhares de brasileiros. Dessa forma, o uso de substâncias naturais, principalmente, as disponíveis em nosso país, tem sido proposto como uma forma de controlar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis em alimentos, tornando-os mais microbiologicamente seguros.

**Objetivo:** Avaliar a ação de extratos vegetais de plantas brasileiras (catuaba, barbatimão, mutamba e espinheira santa) em microrganismos de importância em alimentos. **Material e métodos:** A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de *Trichilia catiguá* (catuaba), *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), *Guazuma ulmifolia* (mutamba) e *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) foram avaliados contra *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Aeromonashydrophila* ATCC 7960, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Bacillus cereus* ATCC 11778 pelo método de microdiluição em caldo segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. **Resultados:** A fração aquosa de *S. barbatiman* (barbatimão) apresentou melhor atividade contra *S. aureus*, sendo a CIM de 62,5 µg/ml. Enquanto as outras frações de barbatimão e também os outros compostos testados demonstraram fraca ação antimicrobiana. **Conclusão:** Conclui-se então, que a fração aquosa de barbatimão apresentou atividade contra *S. aureus* e merece atenção e maiores estudos para avaliação da sua aplicação em alimentos como alternativa segura e eficaz na conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** microrganismos; compostos naturais; *Staphylococcus aureus*.

**Área temática:** Microbiologia

## PRESENÇA DE FUNGOS DERMATÓFITOS EM ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS ENCAMINHADOS AO CENTRO DE CONTROLE DE ZOOSE DE MARINGÁ

Fernanda Leghi Garcia<sup>1</sup>; Thiago de Paula Bianchi<sup>1</sup>; Eduardo Alcantara Ribeiro<sup>3</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>2</sup>; Erika Seki Kioshima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Médico Veterinário - Centro de Controle de Zoonoses de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** As dermatomicoses são infecções fúngicas superficiais dos tecidos queratinizados e que podem acometer a pele, pelos e unhas de cães, gatos e seres humanos, sendo os animais possíveis portadores assintomáticos. Os dados epidemiológicos referentes às dermatofitoses nos animais indicam que a sua ocorrência é bastante comum em cães e gatos no meio urbano. Para os felinos, as condições de moradia podem influenciar, dependendo se estes vivem isoladamente ou em grupo, e se são domiciliares ou errantes. **Objetivos:** Triar os animais recebidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e Diretoria do bem-estar animal de Maringá quanto à presença de fungos causadores de dermatomicoses. **Material e métodos:** Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob o nº 9169040419. A coleta dos pelos dos animais foi realizada com auxílio de escovas estéreis. Os pelos foram imediatamente semeados em placas de Agar Mycosel e o excedente foi armazenado em salina estéril, para posterior preparo do Exame Micológico Direto (EMD). As placas foram incubadas a 25°C e acompanhadas diariamente. As unhas dos gatos também foram coletadas para semeadura em Agar Mycosel. **Resultados:** No total foram triados 35 animais, sendo 25 cachorros e 10 gatos. No EMD, foi possível observar a presença de estruturas fúngicas em 14 amostras. Cerca de 40 colônias de fungos foram isoladas e identificadas como pertencentes à espécie *Microsporum canis* ou aos gêneros *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. A espécie mais isolada das unhas dos gatos foi *Microsporum canis*. **Conclusão:** Considerando que os animais de pequeno porte podem ser portadores assintomáticos de fungos dermatófitos, a vigilância e a triagem destes animais de companhia, como os acolhidos pelo CCZ, é essencial como medida de contenção da dispersão destas espécies de fungo.

**Palavras-chave:** diagnóstico; dermatomicose; *Microsporum canis*.

**Área temática:** Microbiologia

## N-ACYLIDRAZONE-DERIVED IMPROVES THE ACTION OF AMPHOTERICIN B AGAINST *Paracoccidioides* spp

Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini<sup>1</sup>; Andrew Rozada<sup>2</sup>; Vanessa Matsumoto Venâncio<sup>3</sup>; Bruna Lauton Simões<sup>4</sup>; Pollyanna Cristina Vicenzi Conrado<sup>4</sup>; Daniella Renata Faria<sup>1</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>1</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>5</sup>; Gisele Freitas Gauze<sup>6</sup>; Erika Seki Kioshima Cotica<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduate student (PhD degree) – Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Graduate student (Master's degree) – Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Graduate student in Biomedicine – Department of Clinical Analyzes and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Graduate student (Master's degree) – Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Professor – Department of Clinical Analyzes and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Professor – Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, PR

**Introduction:** Paracoccidioidomycosis (PCM) caused by *Paracoccidioides* species has long and compelling treatments. Since 1940, only three antifungal classes have been discovered, amphotericin B (AmB) being the most efficient for PCM. AmB toxicity represents its major limiting factor. Therefore, the search for new antifungals is imperative. **Objective:** This work aims to prove a new compound N'-(2-hydroxy-5-nitrobenzylidene)-4-methoxy-1-naphthohydrazide (AON3) as antifungal potential *in vitro*. **Material and methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) of the AON3 was evaluated by the broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - M27-A3) against 5 clinical isolates of *Paracoccidioides* spp (Pb18, Pb01, Pb0113, Pb0116 and Pb0117). The compounds were evaluated at concentrations from 0.5 to 256 µg/mL. The plate was incubated at 35°C / 6 days. Resazurin was incorporated after 24h. The MIC was considered at the lowest concentration without color change (no growth) in the microplate. Aliquots from each well were subcultured on Brain Heart Infusion agar for 7 days to determine the minimum fungicidal concentration (MFC). AmB was chosen to test in combinations with AON3. The compound (starting at 4× MIC) were distributed vertically while AmB (2× MIC) was added horizontally. The fractional inhibitory concentration (FIC) was determined by calculating  $\sum FIC = FICA + FICB = (CombAmB/MIC_{AmB}) + (CombAON3/MIC_{AON3})$ . The Bliss-independent interactions were analyzed by Combenefit software. **Results:** The MIC ranges from 1 to 8 µg / mL, and the same variation was found for the MFC of the isolates tested. Synergism showed a 2-fold reduction for AmB concentration and 2 to 3-fold reduction for AON3 concentration being confirmed by Bliss analysis for the 5 clinical isolates. **Conclusion:** The present study confirms that n-acylidrazone-derived has antifungal activity for the isolates tested. In addition, AON3 may act by reducing AmB concentration in PCM treatment because of the synergistic action between them.

**Keywords:** new antifungal; amphotericin B; synergism.

**Financial support:** CAPES and CNPq

**Thematic area:** Microbiology

## **AValiação da frequência de mortalidade em bacteremias causadas por bactérias Gram positivas e Gram negativas do Hospital Universitário de Maringá**

Iara de Matos Lessa<sup>1</sup>; Daniela Dambroso Altafini<sup>2,3</sup>; Cecília Saori Mitsugui<sup>3</sup>; Nathália de Oliveira Bizetto Cano<sup>1</sup>; Monica de Souza Ferreira de Mattos<sup>4</sup>; Franciele Viana Fabri<sup>2</sup>; Josmar Mazucheli<sup>5</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina, Laboratório de Microbiologia Básica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutoranda), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Hospital Universitário Regional de Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Laboratório de Microbiologia Básica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Professor do Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Professor do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

**Introdução:** Infecções da corrente sanguínea (ICS) são definidas pela presença de microrganismos viáveis no sangue podendo ser confirmados pela hemocultura. As ICS estão entre as principais causas de morbimortalidade com taxas cada vez mais elevadas em todo mundo. Nas unidades de terapia intensiva a mortalidade pode chegar a 30% visto que a antibioticoterapia correta deve ser rapidamente iniciada e a demora na liberação do laudo da hemocultura pode comprometer sobrevida dos pacientes, principalmente diante do quadro atual de multirresistência das bactérias Gram-positivas (GP) e Gram-negativas (GN). **Objetivo:** Comparar frequência de mortalidade em pacientes com ICS causadas por bactérias GP (ICS-GP) com aquelas causadas por GN (ICS-GN) isoladas em hemoculturas. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo com análise de prontuários de pacientes com ICS-GP e ICS-GN internados no Hospital Universitário de Maringá (HUM) entre 2013 e 2018. Estes dados foram organizados no software Excel 2007 e p-valor foi calculado pelo teste do qui-quadrado. O estudo foi aprovado na COREA-HUM, resolução 466/12 e COPEP-UEM, 0447/2017-HUM. **Resultados:** 13574 hemoculturas foram coletadas de 6787 pacientes. Após aplicados critérios de inclusão e exclusão, 455 pacientes foram analisados sendo 238 com hemoculturas positivas por GN (52,3%) e 217 por GP (47,7%). A mortalidade no período, das ICS-GN, foi de 37,3% (89/238) enquanto, a mortalidade das ICS-GP foi de 30% (65/217). Embora tenha sido verificado maior frequência de óbitos entre ICS-GN, esta não apresentou significância estatística ( $p=0.09$ ). Estratificando-se a mortalidade em anos, é possível apontar que, as bactérias GN foram responsáveis pelo maior número de óbitos em todo o período, com exceção do ano de 2017. **Conclusão:** Os resultados apontaram maior mortalidade entre as ICS-GN o que pode ser devido a falta de novas opções terapêuticas e o aumento da resistência verificado para este grupo bacteriano nos últimos anos.

**Palavras-chave:** bactérias Gram-positivas; bactérias Gram-negativas; mortalidade.

**Área temática:** Microbiologia Básica



## PROTEOME OF *Staphylococcus aureus* AFTER ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY ROSE BENGAL

João Vitor de Oliveira Silva<sup>1</sup>; Jean Eduardo Meneguello<sup>2</sup>; Máira Dante Formagio<sup>1</sup>; Daliah Alves Coelho Trevisan<sup>3</sup>; Andreia Farias Pereira Batista<sup>4</sup>; Nicole Lohana de Souza<sup>1</sup>; Lorena Fortunato Prohmann<sup>5</sup>; Rogério Marchiosi<sup>6</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá<sup>7</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Acadêmico de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introduction:** Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been proposed as an effective method for inactivation of micro-organisms. This technique produces reactive oxygen species that has multiple targets within the biological system. Rose bengal (RB) is a xanthene dye that has been used as photosensitizer in aPDT, demonstrating the efficacy of this approach in inactivating *Staphylococcus aureus*. Until the present time, no proteomic studies were performed with aPDT mediated by RB. **Aim:** In this study, we applied the label-free quantitative proteomic to characterize the proteome of *S. aureus* after aPDT mediated by RB. **Material and methods:** The experiments were performed with *S. aureus* ATCC 25923. The bacterial inoculum was standardized in optical density value at 625 nm of 0.08-0.1 to contain approximately  $10^8$  cells/ml for use aPDT assays. Bacterial suspension was treated with RB at concentration 10 nmol/l and irradiated by green LED for 49 min ( $0.17 \text{ J/cm}^2$ ). Positive control (bacteria and phosphate buffered saline) have also been tested. The protein extraction was performed through sonicated in lysis solution and protein concentrations were estimated by the Bradford method. The protein digest was performed in 250  $\mu\text{g/ml}$  of proteins. The peptide identification was performed in Liquid Chromatography Electrospray (LC-MS<sup>E</sup>) and the MS data were processed and searched using the ProteinLynx Global Server. **Results:** Our proteomic analysis identified a total of 174 proteins of sample treated and 171 proteins of positive control. When we compared the two groups, five proteins showed difference in level of abundance (Copper chaperone CopZ, Probable transglycosylase IsaA, 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ, UPF0473 protein SAOUHSC\_01719 and Carbamate kinase 1). Proteins are involved in metabolic pathways that carry  $\text{Cu}^+$  (chaperone), with capable of cleaving peptidoglycan (probable transglycosylase IsaA). Participating in synthesizes  $\text{CO}_2$  and  $\text{NH}_3$  (Carbamate kinase 1). **Conclusion:** Data show a set of proteins involved in different cellular processes after aPDT.

**Keywords:** antimicrobial photodynamic therapy; *Staphylococcus aureus*; proteomics.

**Thematic area:** Microbiology

## SELEÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS CONTRA MICOBACTÉRIAS

João Vítor Perez de Souza<sup>1</sup>; Diego de Souza Lima<sup>2</sup>; Letícia Sayuri Murase<sup>3</sup>; Carolina Trevisolli Palomo<sup>4</sup>; Renata Alexandre de Oliveira<sup>5</sup>; Giulienne Karla Pereira da Silva<sup>5</sup>; Flávio Augusto Vicente Seixas<sup>6</sup>; Erika Seki Kioshima<sup>7</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama/PR

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O gênero *Mycobacterium* possui mais de 100 espécies descritas, contendo microrganismos inócuos e outros altamente patogênicos. Dentre as doenças causadas por este gênero, podemos citar a tuberculose, a hanseníase e as micobacterioses. Características intrínsecas ao gênero *Mycobacterium* como sua espessa parede celular e, adquiridas como o aparecimento de mutações, que culminam em resistência aos antimicrobianos, posam como um grave problema no tratamento dessas doenças. Assim, a busca e desenvolvimento de novos fármacos torna-se uma necessidade primária. **Objetivo:** Realizar uma busca por novos alvos para desenvolvimento de fármacos antimicobacterianos, utilizando bancos de dados (BD) disponíveis na web. **Material e métodos:** A estrutura de busca “Targets” do BD “TDR Targets” (disponível em: [tdrtargets.org](http://tdrtargets.org)) foi utilizada neste estudo. Para seleção das proteínas alvo foram utilizados os seguintes critérios: 1) presente em *M. tuberculosis*; 2) ausente em *Escherichia coli*, *Homo sapiens* e *Mus musculus*; 3) peso molecular <100 kDa; 4) reação enzimática descrita; e 5) estrutura cristalográfica disponível. Após os resultados iniciais, cada um dos alvos recuperados foi avaliado individualmente quanto à essencialidade do gene, qualidade dos modelos cristalográficos disponíveis, tipo de inibidor descrito e etc. **Resultados:** A busca inicial revelou 26 proteínas que atendiam aos critérios estabelecidos. Cada proteína foi avaliada minuciosamente, sendo classificada de acordo com sua aplicabilidade como alvo terapêutico. Em seguida, os 10 primeiros colocados foram avaliados novamente e os quatro mais promissores foram selecionados (EchA6, DprE1, AroD e PknG). **Conclusão:** O uso de ferramentas computacionais apresenta vantagens na busca por novos alvos terapêuticos em micobactérias, pois permitiu a avaliação combinada de milhares de proteínas, considerando vias metabólicas descritas, ontologia de genes, dados proteômicos e transcriptômicos, dentre outros. Os quatro alvos selecionados serão utilizados para varrer quimiotecas e encontrar moléculas candidatas a antimicobacterianos.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium* spp.; alvos terapêuticos; bioinformática.

**Financiador (es):** Fundação Araucária (FA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Área temática:** Microbiologia

## MONITORAMENTO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Acinetobacter* spp. RECUPERADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA NO PERÍODO DE DEZ ANOS

Larissa dos Santos Fávoro<sup>1</sup>; Suelen Balero de Paula-Petroli<sup>2</sup>; Camila Felipe de Moura<sup>3</sup>; Joyce Karoline Coimbra<sup>3</sup>; Floristher Elaine Carrara-Marroni<sup>4</sup>; Emerson José Venâncio<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>2</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>4</sup> Doutora, Docente - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>5</sup> Orientador, Doutor, Docente - Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

**Introdução:** *Acinetobacter* spp. é um importante patógeno responsável por infecções hospitalares. Estas infecções são de difícil tratamento devido a prevalência de isolados multirresistentes (MR) e extensivamente resistentes (ER) aos antimicrobianos nestes ambientes. O monitoramento das taxas de resistência aos antimicrobianos norteiam as terapias empíricas, aprimorando o tratamento e diminuindo o tempo de permanência do paciente no hospital. **Objetivo:** Determinar as taxas de resistência aos antimicrobianos e classificar o perfil de resistência de isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. recuperados no Hospital Universitário (HU) de Londrina no período de agosto de 2009 a julho de 2019. **Material e métodos:** Foram analisados dados referentes às culturas positivas para *Acinetobacter* spp. quanto ao sexo do paciente, tipo de amostra biológica, setor de internação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. **Resultados:** Um total de 2865 *Acinetobacter* spp. foram incluídos no estudo. A maioria (64,7%) foi recuperada de pacientes do sexo masculino e de pacientes internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (53,2%), Pronto Socorro (19,1%) e Enfermaria Masculina (11,2%). As secreções do trato respiratório (40,6%), swab de vigilância (31,0%) e urina (9,8%) foram às amostras clínicas com maior frequência de isolamento destes microrganismos. Do total de isolados incluídos no estudo, 10,4% foram classificados MR e 39,7% como ER. Altas taxas de resistência foram verificadas para os carbapenêmicos (92,7%), fluoroquinolonas (>89,8%) e aminoglicosídeos (>62,5%). Menores taxas foram observadas para colistina (3,6%). **Conclusão:** As altas taxas de resistência observadas demonstram as limitações terapêuticas em infecções sérias causadas por estes microrganismos no HU, enfatizando a importância no monitoramento da resistência, adequação de medidas efetivas de controle de infecção, bem como a necessidade de se estabelecer programas *stewardship* para o uso racional dos antimicrobianos neste hospital.

**Palavras-chave:** epidemiologia; *Acinetobacter* spp.; resistência aos antimicrobianos.

**Financiadores:** Fundação Araucária, CAPES

**Área temática:** Microbiologia

## PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE DE POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS NANOESTRUTURADOS APLICADOS À ENGENHARIA DE TECIDOS

Larissa Miwa Kikuchi Ochikubo<sup>1</sup>; Thaís Emiko Kawasaki<sup>1</sup>; Elton da Cruz Alves Pereira<sup>2</sup>; Beatriz Vesco<sup>1</sup>; Terezinha Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>; Melyssa Negri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A engenharia de tecido pesquisa métodos de regeneração e reconstrução tecidual através do cultivo celular sobre polímeros. Neste sentido, diversos polímeros estão sendo desenvolvidos *in vitro* a fim de mimetizar a estrutura tridimensional tecidual no intento de prover a regeneração celular. **Objetivo:** Padronizar métodos para avaliar a citotoxicidade de polímeros nanoestruturados, bem como a viabilidade e colonização celular sobre estes materiais. **Material e métodos:** Foram testados polímeros sintéticos e biopolímeros semi-sintéticos desenvolvidos por *electrospinning* nas linhagens celulares HeLa, HaCat e L929. As metodologias padronizadas foram a atividade mitocondrial por MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) sendo avaliado o efeito citotóxico sobre diferentes linhagens e concentrações celulares; viabilidade celular por LIVE/DEAD® em diferentes tempos de incubação e microscopia eletrônica de varredura (MEV) padronizando cada etapa sem e com células para verificar a capacidade de colonização celular sobre os materiais. **Resultados:** Para MTT, a melhor concentração inicial celular foi  $2 \times 10^5$  células/mL, com índice de citotoxicidade abaixo de 50%, indicando que os materiais foram atóxicos. Para LIVE/DEAD®, foi observado a autofluorescência em apenas um biopolímero e após o cultivo celular sobre os materiais, a colonização foi avaliada com tempo de incubação foi de 45 min, três lavagens com solução tampão, verificando a prevalência de célula vivas, principalmente sobre os biopolímeros. Para a MEV houve diferença na padronização do preparo, sem e com células. Os materiais sem células, as imagens com maior qualidade, foram aquelas em que as amostras foram diretamente metalizadas. Já os materiais colonizados por células, foram fixados, por 24h, seguida da desidratação alcoólica seriada, ponto crítico e metalização. **Conclusão:** Independente das características dos materiais (polímero ou biopolímero), os ensaios de MTT, LIVE/DEAD® e MEV foram reprodutíveis e capazes de indicar a citotoxicidade e viabilidade para colonização e proliferação de linhagens de células humanas.

**Palavras-chave:** polímeros e biopolímero; padronização metodológica; engenharia tecidual.

**Financiador (es):** Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018, processo: 421620/2018-8

**Área temática:** Microbiologia



## SINERGISMO ENTRE PIPERINA E RIFAMPICINA EM MICOBACTÉRIAS

Letícia Sayuri Murase<sup>1</sup>; João Vítor Perez de Souza<sup>2</sup>; Diego de Souza Lima<sup>3</sup>; Carolina Trevisolli Palomo<sup>4</sup>; Débora Cássia Montaholi<sup>5</sup>; Katianny Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>6</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>6</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>6</sup>; Flávio Augusto Vicente Seixas<sup>7</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama/PR

**Introdução:** Dentre as espécies do gênero *Mycobacterium*, temos os patógenos *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e as micobactérias não tuberculosas (MNT). As doenças causadas por micobactérias têm limitado número de opções terapêuticas e tratamento prolongado. Assim, o desenvolvimento de novos fármacos torna-se uma necessidade urgente. Recentemente, a atividade sinérgica entre piperina (PIP) e rifampicina (RIF) em *M. tuberculosis* foi descrita, porém, evidências dessa combinação em outras micobactérias ainda não foram reportadas. **Objetivo:** Avaliar a ação combinatória de PIP e RIF *in vitro* e por meio de *molecular docking* em MNTs e em *M. leprae*, respectivamente. **Material e métodos:** A avaliação da combinação foi realizada pelo método *resazurin drugs combination assay* (REDCA). O fator modulador (FM) foi calculado para evidenciar quantas vezes a combinação dos fármacos foi capaz de reduzir a concentração mínima inibitória (CIM) de RIF, e FM>4 foi considerado como sinérgico. Com base em estudos anteriores e no mecanismo de ação de RIF, foi realizado *docking* molecular da PIP na RNA-polimerase (RNAP) de *M. leprae* através dos programas Autodock-4.2.3 e Molegro-6.0. A estrutura da RNAP de *M. leprae* foi modelada a partir da estrutura de *M. tuberculosis* (pdbid: 5uhg). **Resultados:** O ensaio REDCA mostrou resultados positivos para *M. abscessus*, *M. smegmatis* e *M. massiliense* com redução na CIM de RIF em razões de 16, 32 e 4 vezes, respectivamente. O *docking* da PIP mostrou scores semelhantes ao ligante de referência (88G) na RNAP de *M. leprae*, o que sugere alta probabilidade de ligação no mesmo sítio. **Conclusão:** Apesar de preliminar, nosso estudo reforça como a PIP se mostra um candidato a fármaco antimicobacteriano promissor, evidenciando sua ação sinérgica com RIF em MNTs *in vitro*. Além disso, sugere um possível sítio de ligação de PIP na RNAP micobacteriana, o que pode justificar o sinergismo entre PIP e RIF em micobactérias.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium* spp.; piperina; *docking* molecular.

**Financiador (es):** Fundação Araucária (FA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Área temática:** Microbiologia



## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Palicourea crocea*

Maíra Dante Formagio<sup>1</sup>; João Vitor de Oliveira Silva<sup>1</sup>; Daliah Alves Coelho Trevisan<sup>2</sup>; Andreia Farias Pereira Batista<sup>3</sup>; Felipe Gutierrez Tormena<sup>4</sup>; Lorena Fortunato Prohmann<sup>5</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá<sup>6</sup>; Anelise Samara Nazari Formagio<sup>7</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) Ciências de Alimento, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Acadêmico de Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Docente da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS

**Introdução:** A espécie *Palicourea crocea* (Rubiaceae) apresenta atividade anticolinesterásica, antiproliferativa em células tumorais humana, anti-inflamatória e antihiperalgésica. No entanto, não há dados sobre a atividade antimicrobiana em bactérias patogênicas de origem alimentar.

**Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana do extrato metanólico de folhas de *P. crocea* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* e *Aeromonas hydrophila*. **Material e métodos:** O extrato foi obtido através de maceração das folhas com metanol, durante 20 dias, e rotaevaporação a 50 °C. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o método em caldo em placas de 96 poços. Foram testadas concentrações de 1000 a 1,95 µg/ml. A suspensão padronizada do inóculo (McFarland 0,5) foi adicionada em cada poço. Após 24 h de incubação a 35 °C, a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento de bactérias pela leitura visual. A concentração bactericida mínima (MBC) foi realizada inoculando 10 µL de poços sem crescimento bacteriano, em meio de cultura específico para cada bactéria. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h e a MBC foi definida como a menor concentração de compostos nos quais não se visualizou crescimento bacteriano em placas de ágar. **Resultados:** O extrato metanólico de *P. crocea* apresentou valor de CIM de 250µg/ml e MBC de 500µg/ml para *S. aureus* e não inibiu o crescimento dos demais patógenos na maior concentração avaliada. **Conclusão:** O extrato de *P. crocea* apresentou potencial antibacteriano contra um potencial patógeno de origem alimentar.

**Palavras-chave:** *Palicourea crocea*; atividade antimicrobiana; composto natural.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Microbiologia

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO EM BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Nicole Lohana de Souza<sup>1</sup>; Raquel Garcia Isolani<sup>2</sup>, João Vitor de Oliveira Silva<sup>1</sup>; Daliah Alves Coelho Trevisan<sup>3</sup>; Andreia Farias Pereira Batista<sup>3</sup>; Maíra Dante Formagio<sup>1</sup>; Daniela Cristina de Medeiros<sup>5</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>6</sup>; João Carlos Palazzo de Mello<sup>7</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) representam um grave problema de saúde pública e geram grandes perdas econômicas para a indústria de alimento. Apesar de ser bem difundido o uso de conservantes químicos em alimentos a fim de evitar as DTA, esses compostos não são totalmente eficazes e também apresentam importantes efeitos adversos quando consumidos por muito tempo. Nesse sentido, compostos naturais têm sido considerados como alternativa no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos. A epigalocatequina-3-galato, um flavonoide presente nas folhas da planta *Stryphnodendron adstringens*, já foi anteriormente avaliado contra microrganismos causadores de infecções e apresentou potencial atividade antimicrobiana. **Objetivo:** Este estudo avaliou a atividade antibacteriana de epigalocatequina-3-galato em *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. **Material e métodos:** Uma alíquota da cepa congelada foi transferido para BHI em caldo e incubada a 37 °C por 24h. Em seguida, a cultura foi semeada em meios de cultura específico para cada microrganismo. A concentração inibitória mínima (CIM) do composto foi determinada usando o ensaio de microdiluição em caldo de acordo com CLSI, foram utilizadas concentrações de epigalocatequina-3-galato variando de 1,95 a 1000 µg/mL. A CIM foi definida pela menor concentração que inibe o crescimento de bactérias pela leitura visual. **Resultados:** A CIM de epigalocatequina-3-galato foi de 125 µg/ml para *S. aureus*, 250 µg/ml para *E. faecalis* e maior que 1000 µg/ml para *E. coli* e *S. Typhimurium*. Como relatado em outros estudos a epigalocatequina-3-galato mostrou ter melhor atividade em bactérias Gram positivas. Dessa forma esse composto se mostra promissor e merece ser melhor investigado para possível aplicação no controle de bactérias Gram positivas de importância em alimentos. **Conclusão:** Neste estudo foi demonstrado que a epigalocatequina-3-galato possui razoável atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. faecalis*.

**Palavras-chave:** Epigalocatequina-3-galato; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*.

**Financiador (es):** Capes; PPG-UEM

**Área temática:** Microbiologia

## PESQUISA DE ISOLADOS *Staphylococcus aureus* SENSÍVEL A METICILINA CARREADORES DO GENE *mecA* EM UM HOSPITAL DE ENSINO

Regivaldo Florentino Rodrigues<sup>1</sup>; Franciele Viana Fabri<sup>2</sup>; Pedro Marquetti Pereira<sup>3</sup>; Aline Natália de Santi<sup>3</sup>; Ihorrana Wencz Alflen<sup>4</sup>; Ana Paula Uber<sup>5</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina do inglês *methicillin resistant S. aureus* (MRSA) é considerado um dos principais patógenos mundiais devido ao seu alto potencial de morbimortalidade, pois a presença do gene *mecA* torna este microrganismo resistente a todos os antimicrobianos betalactâmicos, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos. A detecção fenotípica tem sido utilizada na rotina laboratorial, no entanto, nos últimos anos, foram relatados isolados oxacilina sensíveis carreadores desse gene, conhecidos como OS-MRSA, podendo levar ao tratamento inadequado e conseqüente a falha terapêutica. **Objetivo:** Pesquisar OS-MRSA entre isolados clínicos de *S. aureus* recuperados de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário de Maringá. **Material e métodos:** Foram incluídos 264 isolados clínicos de *S. aureus* sensíveis (MSSA) no período de Janeiro/2011 a Março/2018, cuja identificação e o perfil de sensibilidade foram anteriormente realizados pelo sistema automatizado BD Phoenix™. O DNA bacteriano foi extraído de todos os isolados fenotipicamente sensíveis à oxacilina. A pesquisa do gene *mecA* e a caracterização do tipo de cassetes cromossômico-SCC*mec* (I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd e V) foram realizadas molecularmente por PCR simples e multiplex, respectivamente. **Resultados:** Dos 264 MSSA, 0,75% (2/264) apresentaram o gene *mecA*, sendo identificados como isolados OS-MRSA. Entre esses dois isolados, um apresentou SCC*mec* IVc e o outro não pertencia aos tipos de SCC*mec* pesquisados. Estes isolados foram recuperados de amostras de secreção purulenta e de abscesso do joelho. **Conclusão:** O maior desafio nas infecções por OS-MRSA é o tratamento, uma vez que a oxacilina é o antimicrobiano de escolha e a presença do gene *mecA*, independente de sua sensibilidade *in vitro*, torna esses isolados verdadeiramente resistentes. Como as técnicas moleculares não são empregadas na rotina laboratorial, esse dado apresentado é preocupante, pois este microrganismo pode estar presente silenciosamente nas infecções, podendo acarretar em falha terapêutica, aumentando a morbimortalidade de pacientes acometidos.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina; *mecA*; OS-MRSA.

**Financiador (es):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

**Área temática:** Microbiologia

## TECIDO NANOESTRUTURADO DERIVADO DE EXOESQUELETO DE CRUSTÁCEOS E POLIPROLACTONA APLICADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE TECIDO RECONSTITUÍDO *IN VITRO*

Thaís Emiko Kawasaki<sup>1</sup>; Larissa Miwa Kikuchi Ochikubo<sup>1</sup>; Elton da Cruz Alves Pereira<sup>2</sup>; Beatriz Vesco<sup>1</sup>; Terezinha Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>; Melyssa Negri<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Tecidos de origem animal reconstituídos *in vitro* apresentam a capacidade de mimetizar o sistema *in vivo*. Para tal, é necessário desenvolver arcabouços para o suporte e formalização destes tecidos. Assim, biopolímeros de origem animal como quitosana (QHI) e polímeros sintéticos como poliprolactona (PCL) apresentam inúmeras vantagens por serem biodegradáveis, atóxicos e muitas vezes não imunogênicos. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade celular de um tecido nanoestruturado composto de (QHI com PCL) com aplicabilidade para o desenvolvimento de tecido reconstituído *in vitro*. **Material e métodos:** A partir do processo de eletrofiação, foi desenvolvido um tecido nanoestruturado composto de QHI com PCL. Primeiramente avaliou-se a citotoxicidade do material por MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) sobre a linhagem celular humana HeLa. Na sequência verificou a capacidade do tecido nanoestruturado de QHI com PCL em proporcionar a proliferação celular *in vitro*. Em uma placa de 24 poços, contendo o tecido nanoestruturado, foi adicionado um mililitro de uma suspensão celular de  $2 \times 10^5$  células, e incubado a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 72h foi visualizado o crescimento celular e realizado a troca do meio de cultivo e posteriormente realizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV). **Resultados:** Os testes de citotoxicidade do tecido nanoestruturado de QHI com PCL apresentou uma viabilidade celular de 92,54%, demonstrando ser atóxico para a linhagem celular HeLa. Com a MEV foi possível observar a colonização celular sobre o tecido nanoestruturado, sugerindo como suporte para a colonização de linhagens celulares. **Conclusão:** A não toxicidade e estabelecimento da colonização do tecido nanoestruturado polimérico de QHI com PCL, sugerem o possível uso no suporte para o desenvolvimento de um tecido reconstituído *in vitro*.

**Palavras-chave:** citotoxicidade celular; biopolímero; tecido reconstituído.

**Financiador (es):** Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018, processo: 421620/2018-8

**Área temática:** Microbiologia

## EPIDEMIOLOGIA DIFERENCIAL DE *Tinea corporis* E *Tinea capitis* EM PACIENTES ATENDIDOS NO LEPAC NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

Tiago de Paula Bianchi<sup>1</sup>; Camila Barros Galinari<sup>2</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>3</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>3</sup>; Terezinha Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** Micoses cutâneas compreendem uma classe de infecções fúngicas que abrangem a epiderme e seus anexos. Dentre elas, destaca-se as infecções por dermatófitos, as quais acometem em torno de 20% da população mundial, com importante comprometimento do local de infecção, prejudicando a autoestima do paciente. **Objetivo:** Identificar o perfil epidemiológico das micoses cutâneas de pele glabra (*tinea corporis*) e couro cabeludo (*tinea capitis*) de pacientes atendidos nos últimos 12 anos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC-UEM), que atende Maringá e região metropolitana. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo transversal entre o período de 2007 a 2018. Para isso, foram analisados os livros de registro do setor de Micologia Médica/UEM (COPEP nº2.748.843) e incluídos os resultados de cultura positiva para micose cutânea. **Resultados:** Neste período foram obtidas 414 culturas positivas de pele ou pelo, com predomínio de fungos dermatófitos em 93,48% (n=387) das mesmas. O gênero *Trichophyton* foi responsável por 73,13% dos casos, seguido por *Microsporum* (25,32%) e *Epidermophyton* (1,81%). Pele foi o sítio mais afetado com 76,23% das culturas positivas, e as espécies pertencentes ao complexo *T. rubrum* foram mais frequentes com 74,58% (n=220) dos casos de *tinea corporis*. *tinea capitis* foi responsável por 23,77% das infecções dermatofíticas e nestes casos *M. canis* foi o agente mais frequente (86,96%). Não houve contraste entre o gênero dos pacientes (feminino ou masculino). Considerando os dois sítios analisados, o complexo *T. rubrum* foi responsável por 53,14% das culturas e a faixa etária dos pacientes mais acometida foi de 26 a 51 anos. **Conclusão:** Este estudo mostrou alta frequência de *tinea corporis* e *tinea capitis* em pacientes com suspeita de micose cutânea. O conhecimento da etioepidemiologia das micoses é importante para a definição de estratégias eficazes para o seu tratamento e prevenção.

**Palavras-chave:** dermatomicose; *tinea corporis*; *tinea capitis*.

**Financiador (es):** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Área temática:** Microbiologia



## PARTICULARIDADES DAS ESPÉCIES DE *Candida* spp. NA IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (MALDI-TOF)

Vitória Monteiro de Araújo Vilela<sup>1</sup>; Fernanda Leghi Garcia<sup>1</sup>; Raquel Cabral Melo<sup>2</sup>; Daniella Renata Faria<sup>3</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>4</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>4</sup>,

<sup>1</sup>Graduando de Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Pós-Graduando em BIOCÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Pós-Graduando em BIOCÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente - Departamento de Análise Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** As infecções fúngicas são um importante problema de saúde pública. Assim, métodos rápidos e precisos de identificação são essenciais para tratamento adequado dos pacientes. A espectrometria de massas ionização de dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) vem se destacando, por possuir baixo custo e agilidade na identificação dos microrganismos. **Objetivos:** Avaliar duas metodologias de preparo das amostras para identificação de isolados clínicos do gênero *Candida* por MALDI-TOF MS. **Material e Métodos:** Os isolados de *Candida* spp. foram semeados em meio CHROMagar e incubados a 35°C, por 48 h. O método convencional consistiu em um esfregão da levedura com ácido fórmico na placa alvo. Já o método de extração prévia das proteínas, utilizou ácido fórmico (AF) e acetonitrila (ACN). Finalmente, a matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico foi adicionada e seca a temperatura ambiente. Os resultados foram automaticamente calculados e apresentados na Base de Conhecimento VITEK MS IVD v.2.0 (valor de confiança >90,0%). **Resultados:** A metodologia de extração convencional de proteínas seguida pela análise por MALDI-TOF foi capaz de identificar 74% dos isolados de *C. albicans* previamente identificados pela micromorfologia e VITEK 2 (37/50); 94% de *C. glabrata* (32/34); 100% de *C. parapsilosis* (4/4); 100% de *C. krusei* (3/3) e 0% de *C. tropicalis* (0/13). Já a metodologia de extração prévia combinando AF/ACN identificou 82% dos isolados de *C. albicans* (41/50); 38% de *C. glabrata* (13/34); 50% de *C. parapsilosis* (2/4); 100% de *C. krusei* (3/3) e 100% de *C. tropicalis* (13/13). *C. dubliniensis* não foi identificada pelo MALDI-TOF MS. **Conclusão:** Para *C. tropicalis* e *C. glabrata* o método de extração foi essencial para identificação por MALDI-TOF, sugerindo que a padronização previamente à implantação da metodologia na rotina laboratorial é essencial para o sucesso no diagnóstico.

**Palavras-chave** *Candida*; diagnóstico diferencial; MALDI-TOF-MS.

**Área temática:** Microbiologia



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Morfologia

## ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS ABSORTIVAS PRESENTES NO JEJUNO DE *Mesocricetus auratus* INFECTADOS PELA *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Bruna Cristina Pagliarini<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>3</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>4</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada - PGB, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia – PBF, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada, constituindo um problema de saúde pública em 98 países. Sabe-se que algumas espécies de leishmaniose tegumentar podem atingir órgãos internos num processo denominado visceralização. Todavia, não existem estudos desta infecção sobre o intestino e seus diferentes tipos celulares como os enterócitos.

**Objetivo:** Compreender os efeitos da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* na morfologia dos enterócitos de hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UEM (nº 7587260416). Foram utilizados hamsters fêmeas com 90 dias de idade distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (n=4), um grupo controle (GC) e um infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 (2903). O grupo 2903, recebeu  $2 \times 10^7$  promastigotas do isolado de *L. (V.) braziliensis* no dorso da pata posterior esquerda. Após 120 dias de infecção, os animais foram eutanasiados. O jejuno foi coletado, fixado, emblocado e cortado em  $4 \mu\text{m}$ . Posteriormente, os cortes foram desparafinizados e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. Mensuramos a altura e largura de 80 enterócitos e seus respectivos núcleos por animal. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t ( $p < 0,05$ ), os resultados foram apresentados por média  $\pm$  erro padrão.

**Resultados:** Não houve diferença significativa na altura enterócito ( $24,76 \pm 1,65 \mu\text{m}$ ); largura enterócito ( $6,82 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ); altura núcleo ( $7,52 \pm 0,39 \mu\text{m}$ ) e largura núcleo ( $4,98 \pm 0,23 \mu\text{m}$ ) do GI, quando comparados ao GC, altura enterócito ( $22,86 \pm 0,75 \mu\text{m}$ ); largura enterócito ( $7,032 \pm 0,21 \mu\text{m}$ ); altura núcleo ( $6,8 \pm 0,20 \mu\text{m}$ ) e largura núcleo ( $5,30 \pm 0,18 \mu\text{m}$ ). **Conclusão:** A infecção por *L. (V.) braziliensis* com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 não causou alterações na altura e largura dos enterócitos e seus núcleos presentes no jejuno de hamsters com a infecção via subcutânea por 120 dias. Os enterócitos podem não ter sofrido alteração devido a via de infecção e por serem células que são renovadas em um curto período.

**Palavras-chave:** leishmaniose; sistema digestório; enterócitos.

**Financiador (es):** CNPq e Fundação Araucária

**Área temática:** Morfologia

## ROSUVASTATINA PROMOVE AUMENTO DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO DUODENO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii*

Isabela Alessandra Mariano<sup>1</sup>; Cristiany Schultz<sup>2</sup>; Nelson Raimundo de Miranda Júnior<sup>2</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>3</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

**Introdução:** O tratamento da toxoplasmose apresenta efeitos tóxicos ao hospedeiro, portanto, é necessário a busca por novos fármacos. Dentre estes estão as estatinas que, além de inibirem a síntese de colesterol interferem na biossíntese de isoprenóides do parasito apresentando ação anti-toxoplasma. Em contato com o trato gastrointestinal, o *Toxoplasma gondii* estimula respostas imunológicas e inflamatórias podendo causar alterações epiteliais. Os linfócitos intraepiteliais (LIEs) auxiliam na defesa imunológica do organismo, reconhecem e combatem moléculas estranhas de agentes infecciosos por meio de resposta humoral e citotóxica mediada por células. **Objetivo:** Avaliar as possíveis alterações nos LIEs do duodeno de camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com rosuvastatina. **Material e métodos:** Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UEM sob registro 4804/2017. Utilizamos 20 camundongos *Swiss* fêmeas que aos 50 dias de idade os animais foram tratados por via oral por 21 dias consecutivos, e foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos. Dois grupos não foram infectados: grupo controle (GC) e grupo tratado com 40mg/kg/dia de rosuvastatina (GTR). Outros dois grupos foram infectados oralmente com cistos cerebrais de *T. gondii* compondo o grupo infectado (GI) e grupo infectado e tratado com rosuvastatina (GIT). A eutanásia foi realizada 24 horas após término do tratamento e o duodeno foi coletado. Foi realizado processamento histológico e as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina. Foram contadas 2560 células intraepiteliais. Os dados obtidos foram submetidos ao teste foi utilizada análise de variância (ANOVA) com auxílio do Software GraphPad Prism® version 5.01.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Houve um aumento no número de LIEs nos grupos GTR ( $186,6 \pm 19,00$ ) e GI ( $113,6 \pm 2,72$ ) quando comparado ao GC ( $94,80 \pm 7,66$ ). **Conclusão:** O tratamento com rosuvastatina promoveu aumento na proporção de LIEs no duodeno de camundongos infectados por *T. gondii* e tratados com rosuvastatina.

**Palavras-chave:** linfócitos; intestino; toxoplasmose.

**Financiador (es):** Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científicas (PIBIC), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação Araucária (FA)

**Área temática:** Morfologia

## INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NÃO ALTERA NÚMERO DE NEURÔNIOS MIENTÉRICOS DO JEJUNO DE HAMSTERS

Lainy Leiny de Lima<sup>1</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>2</sup>; Aline Rosa Trevizan<sup>2</sup>; Thaís Gomes Verznagassi Silveira<sup>3</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada - PGB, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia – PBF, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

**Introdução:** A leishmaniose é uma doença negligenciada em todo mundo, a forma tegumentar possui alta incidência no Brasil. Sabe-se que algumas espécies de *Leishmania* podem atingir órgãos secundários a picada do vetor, e deste modo, visceralizar. Também há relatos que este parasito pode causar danos ao intestino, entretanto, não existem estudos desta infecção sobre os neurônios do plexo mientérico do jejuno de hamsters. **Objetivo:** Compreender os efeitos da infecção por diferentes isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* sobre os neurônios do plexo mientérico de hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Material e métodos:** O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UEM sob o protocolo 7587260416. Foram utilizados 24 hamsters fêmeas distribuídas aleatoriamente em seis grupos, sendo um grupo controle (CG) e cinco infectados. Os grupos infectados receberam  $2 \times 10^7$  promastigotas, de isolados de pacientes do LEPAC, no dorso da pata posterior esquerda, sendo elas MHOM/BR/2000/1655 (1655), MHOM/BR/2003/2311 (2311), MHOM/BR/2003/2314 (2314), MHOM/BR/2009/3476 (3476) e a cepa padrão MHOM/BR/1975/M2903 (2903). Após 90 dias de infecção os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. O jejuno foi coletado, fixado, posteriormente, dissecado para obtenção do plexo mientérico que foi marcado pela imunohistoquímica HuD/HuC, evidenciando a população total de neurônios. Foi realizada a contagem de todos os neurônios presentes em 32 imagens, capturados com a objetiva de 20x. A análise estatística foi realizada aplicando ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), e os dados foram apresentados por média  $\pm$  erro padrão de neurônios/mm<sup>2</sup>. **Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas nos grupos infectados, 1655, 2311, 2314, 2903, 3476 (175,2 $\pm$ 12,31; 198,8 $\pm$ 5,65; 173,2 $\pm$ 15,19; 180,6 $\pm$ 16,82; 201,8 $\pm$ 13,90 neurônios/mm<sup>2</sup>), respectivamente, em relação ao GC (175,7 $\pm$ 12,16). **Conclusão:** Os neurônios são células resistentes, deste modo a infecção subcutânea por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, durante 90 dias não foi capaz de promover alteração na quantidade de neurônios pertencentes ao plexo mientérico no jejuno de hamsters.

**Palavras-chave:** leishmaniose; sistema digestório; sistema nervoso entérico.

**Financiador (es):** CNPq e Fundação Araucária

**Área temática:** Morfologia



## PROBIOTIC SUPPLEMENTATION AND ITS EFFECT ON REPAIR AND RESISTANCE OF INTESTINAL TISSUE IN WISTAR RATS

Letícia Alexandrino Barilli<sup>1</sup>; Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida<sup>2</sup>; Tiago Jacometo  
Coelho de Castilho<sup>3</sup>; Eneri Vieira de Souza Leite Mello<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Undergraduate Student in Biomedicine, Maringá State University, Maringá/PR

<sup>2</sup>Undergraduate Student in Biomedicine, Maringá State University, Maringá/PR

<sup>3</sup>Postgraduate Student (Doctorate) in Clinical Surgery, Federal University of Paraná, Curitiba/PR

<sup>4</sup>Professor - Department of Morphological Sciences, Maringá State University

**Introduction:** Probiotics are dietary substances that promote changes in the composition and activity of the gastrointestinal microbiota and end up conferring health benefits to the host. **Aim:** The objective of this study was to analyze the effects of probiotic supplementation on the healing, fibroplasia and resistance of colonic anastomosis tissue of Wistar rats. **Material and Methods:** The animals were divided into two groups (n = 12): CONTROL, which received maltodextrin; and TREATED, supplemented with probiotic, treated for 12 days (CEUA nº 5684270616). After 7 days of treatment, a surgical procedure performed anastomosis in the colon. 5 days after surgery, the animals were euthanized and anastomosis were collected. The first one was submitted to histological processing for Picrosirius Red technique in order to show types of collagen and Hematoxylin & Eosin technique for histopathological analysis of healing process by scores of intensities of a number of inflammatory parameters. The images were analyzed by the Image Pro Plus® program. The other one was attached to the Tensiometer to measure the Maximum Traction Force and the Breaking Force of the tissue. All studies were analyzed by GraphPad Prism 5®. **Results:** Analysis of fibroplasia showed that there was an increase in amount of both collagen in the treated group compared to control. Histopathology revealed a decrease in inflammatory infiltrate, increase in fibrosis and decrease in the area of inflammatory process in treated group compared to the control group. In the tensiometric study, there was an increase of both forces in the treated group in relation to the control. **Conclusions:** The use of probiotics conferred a greater deposition of mature collagen and a control of the inflammatory process, proving to be beneficial in the tissue repair process, which also reflected in a greater resistance to scar tissue, an important fact to decrease postoperative complications.

**Keywords:** probiotics; wound healing; colonic anastomosis.

**Sponsor(s):** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Thematic Area:** Morphology

## ANÁLISE DA HISTOARQUITETURA DA PRÓSTATA DORSOLATERAL DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE 5-FLUORURACIL

Letícia Ganem Rillo Paz Barateiro<sup>1</sup>; Lilian Catarim Fabiano<sup>2</sup>; Pedro Luiz Zonta de Freitas<sup>2</sup>; Mariana Conceição da Silva<sup>3</sup>; Karile Cristina da Costa<sup>2</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>4</sup>; Eneri Vieira de Souza Leite Mello<sup>4</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

**Introdução:** O 5-fluoruracil (5-FU) é um quimioterápico amplamente utilizado para diversos tipos de câncer, dentre eles o colorretal. Estudos já demonstraram que o 5-FU promove alterações na histoarquitetura da parede intestinal, porém há poucos estudos sobre seus impactos em outros órgãos, como a próstata. **Objetivo:** Avaliar a morfologia glandular da próstata dorsolateral de ratos *Wistar* após administração de 5-FU. **Material e métodos:** Foram utilizados 12 ratos *Wistar* machos (210-317g) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, (CEUA, número 001262). O experimento teve duração de 15 dias e os animais foram divididos em 2 grupos: grupo exposto ao quimioterápico 5-FU (QFU, n=6) administrado intraperitonealmente na dose de 15 mg/kg de peso corporal por 4 dias consecutivos, seguido de redução para 6mg/kg de peso corporal por 4 dias alternados e, por fim, administrando a última dose de manutenção de 15mg/kg; grupo controle (CTR, n=6) que recebeu PBS pela mesma via e período. Posteriormente, todos os animais foram eutanasiados e a próstata foi dissecada e submetida ao processamento histológico de inclusão em parafina. Cortes com 5 µm de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina e analisados morfometricamente pelo método de Weibel. Depois, realizou-se a estatística dos registros. **Resultados:** Em relação à área glandular total, houve diferença significativa no epitélio e lúmen prostático dos grupos, mas não houve no estroma ( $p < 0,05$ ). O grupo CTR apresentou média  $\pm$  erro padrão igual a  $46,82 \pm 1,18$  no epitélio e  $77,5 \pm 1,99$  na proporção luminal. Enquanto o grupo QFU apresentou média  $\pm$  erro padrão igual a  $41,47 \pm 1,31$  no epitélio e  $86,3 \pm 2,32$  no lúmen. Essa redução na altura epitelial sugere menor atividade celular e o aumento na área luminal também indica algum comprometimento na liberação da secreção glandular. **Conclusão:** Houve alteração na histoarquitetura da próstata dorsolateral do grupo QFU.

**Palavras-chave:** quimioterápico; morfologia prostática; método de Weibel.

**Financiador (es):** Fundação Araucária, CNPQ, CAPES

**Área temática:** Morfologia

## ANÁLISE DE MASTÓCITOS SEROTONINÉRGICOS NO JEJUNO DE HAMSTER INFECTADOS COM *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Lucas Antônio da Silva Guerra<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>3</sup>; Aline Rosa Trevizan<sup>3</sup>; Thais Gomes Verzignassi Silveira<sup>4</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A leishmaniose, é uma protozoonose amplamente distribuída pelo mundo. Sua transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de insetos do gênero *Lutzomyia*. Há estudos experimentais mostrando alterações intestinais causadas pela forma visceral da leishmaniose, porém existe um grande déficit de estudos relacionados às formas tegumentares da doença e ao seu efeito sobre o trato gastrointestinal. **Objetivo:** Analisar os efeitos da infecção causada por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* sobre número de mastócitos serotoninérgicos no jejuno de hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Material e métodos:** O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UEM sob o protocolo 7587260416. Foram utilizados 24 hamsters fêmeas distribuídas aleatoriamente em seis grupos, sendo um grupo controle (CG) e cinco infectados. Os grupos infectados receberam  $2 \times 10^7$  formas promastigotas, de isolados de pacientes do LEPAC, no dorso da pata posterior esquerda, sendo elas MHOM/BR/2000/1655 (1655), MHOM/BR/2003/2311 (2311), MHOM/BR/2003/2314 (2314), MHOM/BR/2009/3476 (3476) e a cepa padrão MHOM/BR/1975/M2903 (2903). Após 120 dias de infecção os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. O jejuno foi coletado, emblocado, posteriormente, realizou-se cortes semi-seriados de  $4 \mu\text{m}$  de espessura, para então serem submetidos a técnica de imunohistoquímica de 5-HT, evidenciando a subpopulação de mastócitos serotoninérgicos. A contagem de mastócitos 5-HT/IR na lâmina própria foi feita, com objetiva de 40x, totalizando 50 campos por animal. A análise estatística foi realizada aplicando ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), e os dados foram apresentados por média  $\pm$  erro padrão de mastócitos/ $\text{mm}^2$ . **Resultados:** Não foram observados resultados significativos, dos grupos infectados, 1655, 2311, 2314, 2903, 3476 ( $33,68 \pm 3,42$ ;  $38,21 \pm 1,93$ ;  $22,44 \pm 1,41$ ;  $33,07 \pm 3,28$  e  $30,60 \pm 4,50$  mastócitos/ $\text{mm}^2$ ), respectivamente, em relação ao GC ( $29,53 \pm 2,90$ ). **Conclusão:** Os mastócitos são células envolvidas na regulação da imunidade contra várias espécies de *Leishmania*, porém, no modelo estudado não apresentaram diferença em seus números na mucosa do jejuno.

**Palavras-chave:** leishmaniose; 5-HT; trato gastrointestinal.

**Financiador:** CNPq e Fundação Araucária

**Área temática:** Morfologia

## EFEITO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA SOBRE AS CRIPTAS DO CÓLON DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA apoCIII HUMANA

Nilton Rodrigues Teixeira Junior<sup>1</sup>, Cristiany Schultz<sup>2</sup>, Lainy Leiny de Lima<sup>3</sup>, Jairo Augusto Berti<sup>4</sup>, Débora de Mello Gonçalves Sant Ana<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Educação Física, Departamento de Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

**Introdução:** Camundongos transgênicos que super expressam a ApoCIII humana, apresentam absorção e transporte das lipoproteínas comprometidos e podem desenvolver alterações morfológicas e patológicas relacionadas a processos inflamatórios no intestino. O epitélio intestinal é altamente especializado no processo de regeneração, absorção, produção e secreção de peptídeos antimicrobianos que interferem na composição da microbiota intestinal. As criptas são estruturas do epitélio intestinal, nelas estão células progenitoras diferenciadas.

**Objetivo:** Realizar análise morfométrica da profundidade e largura de criptas no cólon dos camundongos C57Bl/6 transgênicos que super expressam a ApoCIII humana (apoCIII-tg) e seu respectivo controle, não transgênicos (ntg). **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentos com Animais da Universidade Estadual de Maringá com registro CEUA nº 6558180517 e Comissão Interna de Biossegurança - CTNBio nº 819/2013. Utilizamos 12 camundongos (2 grupos, n=6) machos, com 180 dias de vida da linhagem C57Bl/6. Após a eutanásia, o cólon foi coletado, fixado e submetido à rotina histológica para obtenção de cortes transversais semi seriados de 4µm e corados pela coloração hematoxilina e eosina (HE) para mensuração estrutural da profundidade e altura de criptas. As imagens obtidas foram analisadas através do sistema de análise de imagem (Motic Image Plus, versão 2.0<sup>®</sup>) ampliadas nas objetivas com aumento de 1000X. Os dados obtidos foram submetidos ao teste t-Student com auxílio do Software GraphPad Prism<sup>®</sup> version 5.01. Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** Não identificamos alterações morfológicas na profundidade das criptas do cólon dos camundongos apoCIII-tg em relação ao grupo controle, os ntg, assim como na largura de cripta, que não apresentaram alterações morfológicas para o grupo apoCIII-tg comparados ao grupo controle, os ntg. **Conclusão:** A superexpressão da apoCIII e consequente dislipidemia não foi capaz de alterar a morfometria das criptas do cólon de camundongos transgênicos.

**Palavras-chave:** apolipoproteína; intestino; dislipidemia.

**Financiador (es):** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FADEC) da Universidade Estadual de Maringá.

**Área temática:** Morfologia

## ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS RINS DE CAMUNDONGOS *SWISS* TRATADOS COM BAIXA DOSE DE CICLOSPORINA A

Pedro Mareti Maçaira Fígara<sup>1</sup>; Danielle Ramos da Silva<sup>2</sup>; João Vinícius Honório da Silva<sup>3</sup>; Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo<sup>4</sup>; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>5</sup>; Fábio Goulart de Andrade<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>2</sup>Biomédica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Unifil, Londrina/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

**Introdução:** A ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor amplamente utilizado, com potencial para se tornar contraceptivo masculino efetivo. No entanto, apresenta histórico de toxicidade renal quando administrado em altas doses. **Objetivo:** Avaliar possíveis alterações histológicas nos rins dos camundongos tratados com baixa dose de CsA. **Material e métodos:** Foram utilizados 18 camundongos *Swiss* machos tratados por gavagem durante 10 dias, distribuídos em 3 grupos (n=6). Os grupos imediato (CsAI) e recuperação (CsAR) receberam 10 mg/kg de CsA e o grupo controle recebeu água potável. Os grupos CsAI e controle foram submetidos à eutanásia no 11º dia experimental, o grupo CsAR passou por período de recuperação de 10 dias e foi submetido à eutanásia no 21º dia. Após eutanásia o sangue foi coletado para análise bioquímica e os rins destinados ao processamento histológico de rotina, corados com hematoxilina e eosina e técnicas especiais (PAS, tricrômico de azan e picrossírius). Tais procedimentos foram autorizados pela comissão de ética no uso de animais da UEL (OF. CIRC. CEUA n° 68/2017). Os resultados foram comparados através de ANOVA de uma via, com pós-teste de Turkey (P<0,5). **Resultados:** Houve aumento do espaço de Bowman no grupo CsAI. Ocorreu dilatação do túbulo contorcido proximal nos grupos CsAI e CsAR. Não houve alterações no diâmetro de glomérulos, túbulos contorcidos distais e túbulos coletores, bem como nas quantidades de colágeno total e glicoconjugados. Houve predominância de colágeno do tipo I em relação ao colágeno do tipo III em todos os grupos. Não houve alteração de ureia e creatinina em resposta ao tratamento. **Conclusão:** Conclui-se que a utilização de CsA, em baixa dose, pode causar alterações histológicas nos rins, que permanecem mesmo após o período de recuperação, contudo, sem comprometer as principais funções renais.

**Palavras-chave:** rim; histologia; ciclosporina A.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Morfologia



**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* PROMOVE REDUÇÃO DA PRESENÇA DE COLÁGENO TIPO I DO JEJUNO DE *Mesocricetus auratus***

Vitória Rodrigues Soares<sup>1</sup>; Lainy Leiny Lima<sup>2</sup>; Amanda Gubert Alves do Santos<sup>3</sup>; Thais Gomes Verzignassi Silveira<sup>4</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Débora Gonçalves Sant'Anna de Mello<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada - PGB, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Pós-Graduada em Biociências e Fisiopatologia – PBF, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A leishmaniose é uma das doenças infecto-parasitárias endêmica no Brasil, pode se apresentar em diferentes formas e resistências, e, pode causar danos intestinais. As fibras colágenas, um dos constituintes da matriz extracelular, é uma das proteínas mais abundantes em mamíferos estando presente também na estrutura intestinal. **Objetivo:** Analisar a área ocupada por colágeno tipo I no jejuno de hamsters infectados por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Material e métodos:** O experimento foi aprovado pelo comitê de ética do uso de animais da UEM (parecer 7587260416). Usamos 12 hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*), com idade aproximada de 90 dias, distribuídos de forma randômica em 3 grupos (n=4). Um grupo controle (GC), um grupo infectado pela cepa MHOM/BR/2003/2314 (2314) e outro pela cepa MHOM/BR/2009/3476 (3476), a infecção se deu por via subcutânea no dorso da pata com  $2 \times 10^7$  formas promastigotas de cada isolados de *L. (V.) braziliensis*. Após 120 dias de infecção os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico, o jejuno foi coletado, embocado, submetido a microtomia semi-seriada, coloração com Picro Sirius Red, para evidenciação de fibras colágenas tipo I. Para a análise da área ocupada pelo Colágeno tipo I nas camadas intestinais foram capturadas 16 imagens de cada animal, com objetiva de 20x, com luz polarizada. Para a análise estatística utilizamos ANOVA com pós teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), média±erro padrão. **Resultados:** Houve diminuição significativa na área do colágeno tipo I nos grupos infectados 2314 ( $3,98 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$ ) e 3476 ( $3,90 \pm 0,45 \mu\text{m}^2$ ) quando comparados ao GC ( $6,60 \pm 0,72$ ). **Conclusão:** Apesar da *L. (V.) braziliensis* ser uma espécie de maior alcance tegumentar, já foi descrita a sua presença no intestino de roedores, portanto, a diminuição das fibras colágenas tipo I no jejuno, pode apontar sua substituição por fibras colágenas tipo III.

**Palavras-chave:** trato gastrointestinal; leishmaniose cutânea; fibras colágenas.

**Financiador (es):** CNPq e Fundação Araucária

**Área temática:** Morfologia



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Neurociências

## EFEITO NEUROPROTETOR DO TRATAMENTO COMBINADO DE ASPIRINA E BENZNIDAZOL SOBRE OS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS COLINÉRGICOS NO MODELO MURINO DA DOENÇA DE CHAGAS

Joyce Hellen Ribeiro Dionisio<sup>1</sup>; Rito Santos Pereira<sup>2</sup>; Paulo da Silva Watanabe<sup>3</sup>; Joana D'Arc de Lima Mendes<sup>4</sup>; Camila Regina Basso<sup>3</sup>; Phileo Pinge-Filho<sup>5</sup>; Eduardo Jose de Araújo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Laboratório de Imunoparasitologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>3</sup>Acadêmicos de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>4</sup>Mestre em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

**Introdução:** A Doença de Chagas é a manifestação clínica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. As alterações no trato gastrointestinal que se manifestam durante a fase crônica da infecção são atribuídas a lesões no plexo mioentérico. Estudos demonstram que no megacólon chagásico ocorre uma drástica perda dos neurônios colinérgicos. Existem no mercado dois fármacos para o tratamento da DC: Benznidazol (BZN) e Nifurtimox. Estudos com a Aspirina (ASA) têm apresentado bons resultados no controle do parasito. **Objetivo:** Avaliar a eficácia do tratamento combinado do Benznidazol e Aspirina sobre o número de neurônios colinérgicos no plexo mioentérico de camundongos infectados com *T. cruzi*. **Material e métodos:** vinte e cinco camundongos machos BALB/c foram separados em cinco grupos (n=5): controle, infectado sem tratamento, ASA, BZN e ASA+BZN. Vinte animais foram infectados por via intraperitoneal, com  $5 \times 10^2$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* (CEUA/UEL nº 20106.2018.11). Quarenta e oito horas após a infecção foi iniciado os tratamentos com duração de trinta dias. Os animais foram submetidos a eutanásia 180 dias após a infecção e, durante esse período, a taxa de sobrevivência foi avaliada. As amostras de cólon foram submetidas a técnica de imunofluorescência para marcação da população colinérgica de neurônios mioentéricos (ChAT+). Contou-se o número total de células em 32 imagens advindas de cada animal. **Resultados:** O tratamento combinado promoveu sobrevivência de 100% dos animais, o que não foi observado nos que receberam os tratamentos de ASA e BZN de forma isolada. O tratamento combinado ASA e BZN manteve o número de neurônios similar ao grupo controle, indicando efeito neuroprotetor. Os grupos tratados somente com ASA ou BZN apresentaram resultado semelhante ao grupo infectado sem tratamento. **Conclusão:** A combinação da ASA com o BZN apresentou efeito neuroprotetor sobre os neurônios colinérgicos do plexo mioentérico de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** doença de chagas; megacólon; neuroproteção.

**Área temática:** Neurociência

## MOLECULAR COMPOSITION OF THE ENTERIC PERINEURONAL NET

Matheus Deroco Veloso da Silva<sup>1</sup>; Cristiano Correia Bacarin<sup>2</sup>; Joana D'Arc de Lima Mendes<sup>1</sup>; Paulo da Silva Watanabe<sup>3</sup>; Anelise Franciosi<sup>1</sup>; Rubina Aktar<sup>4</sup>; Carlos Alberto Miqueloto<sup>5</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>6</sup>; L. Ashley Blackshaw<sup>7</sup>; Eduardo José de Almeida Araújo<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>2</sup>Pós-doutorando em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>4</sup>Pós-doutoranda em Neurociências, Laboratório de Neurociência Entérica, Queen Mary University of London, Londres/Reino Unido

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Neurogastroenterologia, Laboratório de Neurociência Entérica, Queen Mary University of London, Londres/Reino Unido

<sup>8</sup>Docente – Departamento de Histologia, Laboratório de Neurociência Entérica, Universidade Estadual de Londrina

**Introduction:** Despite the notorious relevance of the matrix extracellular for the development and survival of neurons in the central nervous system, the existence and organization of a perineuronal net (PNN) in the enteric nervous system are misunderstood. **Objective:** to assess the PNN molecular expression and its localization in the gastrointestinal tract (GIT). **Material and methods:** GIT samples from C57/BL6 mice and humans were collected after ethics approval (CEUA/Uel 032/2015 and CAEE: 43753415.6.0000.5231). RT- qPCR was used to assess the expression of hyaluronan synthases - HAS (HAS1, HAS2 and HAS3), hyaluronan receptor (CD44); chondroitin sulphated proteoglycans (CSPG's): ACAN, BCAN, NCAN, VCAN and PTP $\zeta$ ; the tenascins (TNX, R, C and W) and the link proteins (HAPLN1, HAPLN2 e HAPLN3 e HAPLN4). Immunofluorescence was used to identify and quantify submucosal (SMP) and myenteric (MP) neurons associated with PNN molecules. *Wisteria floribunda* lectin (WFA) was used to highlight PNN. **Results:** All PNN molecules were expressed throughout GIT. We found WFA labelling SMP and MP neurons. Around half of enteric neurons was positive to HAS1 in humans and more than 80% in mouse tissue. Regarding CSPGs in the SMP, we found ACAN in 66.6% (both), BCAN in 81.2% and 85%, VCAN 83.3% and 57.1% e PTP $\zeta$  in 87.5% and 62.5% in mice and humans respectively. In the MP, the number reached 65.7% and 50% for ACAN, 93.5% and 59.6% for BCAN, 88.4% and 55.5% for VCAN, and 82.3% and 91.6% for PTP $\zeta$ . For HAPLN2, we found 72.7% and 90% in the SMP, and 61.5% and 78.9% in the MP of mice and humans respectively. Only TNW (~46-77%) and TNX (~66-80%) were present in enteric neurons. TNC and R were present only in muscle cells. **Conclusion:** Enteric PNN is not present in all neurons and its composition also involves HA, CSPGs, tenascins and link proteins.

**Palavras-chave:** extracellular matrix; gut; perineuronal net.

**Financiador (es):** CAPES – Programa Pesquisador Visitante Especial

**Área temática:** Neurociências



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Parasitologia



## CHRONIC INFECTION BY *Toxoplasma gondii* DOES NOT PROMOTE CHANGES IN PANETH CELLS IN THE DUODENUM AND JEJUNUM OF C57BL/6 MICE

Aline Aguiar<sup>1</sup>; Andressa Sulamita Siqueira Menezes de Brito<sup>1</sup>; Lucas Casagrande<sup>2</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>3</sup>; Lucimara Rodrigues<sup>4</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>5</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>6</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introduction:** *Toxoplasma gondii* infection can cause changes in the intestine. This organ is composed by many types of cells, among them Paneth cells is responsible for the secretion of antimicrobial peptides. These cells act in innate defense of the organ. **Objective:** Therefore, our research aimed to analyze the Paneth cells in duodenum and jejunum during the chronic phase of the infection. **Material and methods:** The experimental procedures were previously approved by the Ethical Committee on animal use of the Universidade Estadual de Maringá (Nº 4092040517). Male C57BL/6 mice were distributed as control (CG, n=4) and infected groups (IG, n=4). Infected animals received a suspension with 1,000 oocysts of *T. gondii* (strain ME-49, genotype II) orally, and the control animals received sterile saline. After 60 days, they were underwent to euthanasia and the duodenum and jejunum collected. Sections (5 µm) of each sample were stained by hematoxylin and eosin to evidence Paneth cells, this technique differentiates basophilic parts (by hematoxylin) and acidophilic parts, or eosinophils (by eosin). The quantification was done considering the total number of Paneth cells in 64 crypts. **Results:** The results did not show significant alterations in the number of Paneth cells in the duodenum (IG= 116.5 ± 1.3 versus CG= 125.3 ± 2.3) or in the jejunum (IG= 106.0 ± 21.4 versus CG: 104,3 ± 16.9) data were analyzed using GraphPad Prism® 5.0 software, and T test was used. **Conclusion:** Our results suggest that chronic infection by *T. gondii* does not alter the number of Paneth cells in the duodenum or jejunum of C57BL/6 mice.

**Keywords:** toxoplasmosis; gut; antimicrobial peptides.

**Financier:** Financed by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

**Thematic Area:** Parasitology

## **PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM GLUCANTIME® INTRAPERITONEAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Aline Ávila Brustolin<sup>1</sup>; Nathália Martins Franzói<sup>2</sup>; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos-Milaré<sup>1</sup>; Cíntia Akemi Tanoshi<sup>3</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>4</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Para o desenvolvimento de terapias mais efetivas para a leishmaniose cutânea (LC) são necessários estudos *in vivo* que utilizem grupos controles, com os medicamentos usuais, visando um padrão de comparação. Os estudos que utilizam o Glucantime®, primeira opção de tratamento para as leishmanioses, como controle de tratamento são escassos e utilizam uma faixa muito ampla de concentrações. **Objetivo:** Padronizar o tratamento para LC com Glucantime® intraperitoneal em camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Material e métodos:** 48 camundongos BALB/c (CEUA nº 5621311017) foram divididos em seis grupos: controles positivos e negativos de infecção, tratamento com Anfotericina B ou diferentes concentrações de Glucantime® intraperitoneal (Sb<sup>+5</sup>), por 30 dias. Avaliações de peso, comportamento, volume e espessura das patas foram realizadas semanalmente. Duas semanas após o tratamento, fez-se eutanásia, dosagens bioquímica e retirada dos gânglios poplíteos para determinação da carga parasitária. **Resultados:** Os achados bioquímicos não revelaram toxicidade, apenas efeitos colaterais já conhecidos na literatura, como: aumento de AST e uréia (Anfotericina B e Sb<sup>+5</sup>), diminuição de creatinina (Sb<sup>+5</sup>) e dos níveis de glicose (Anfotericina B) em relação ao controle saudável ( $p > 0,05$ ). Ao final do tratamento todos os grupos ganharam peso em relação ao peso inicial ( $p > 0,05$ ). A concentração de Sb<sup>+5</sup> usual no tratamento de LC em humanos (20 mg/Kg/dia), não foi efetiva para o tratamento de animais de laboratório, assim como o controle de tratamento com Anfotericina B (5 mg/Kg/dia). As concentrações de 100 e 200 mg Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia foram efetivas no tratamento da LC, com diminuição significativa das medidas das patas e carga parasitária ( $p > 0,05$ ). No entanto, não houve diferença estatística entre a carga parasitária destas concentrações, demonstrando que foram igualmente efetivas, sendo que a maior delas provocou irritabilidade nos animais. **Conclusão:** A concentração de 100 mg Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia foi a mais efetiva e com menores efeitos adversos dentre as concentrações avaliadas.

**Palavras-chave:** *Leishmania*; antimoniato de meglumina; modelo animal.

**Financiador (es):** CAPES e CNPq

**Área temática:** Parasitologia

## INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii* REDUZ O NÚMERO DE NEURÔNIOS SUBMUCOSOS VIPÉRGICOS NO DUODENO DE RATOS WISTAR

Aline Rosa Trevizan<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Eduardo José de Almeida Araújo<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Pró-Reitora de Extensão e Cultura, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A infecção pelo *Toxoplasma gondii* ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contendo oocistos. O tubo digestório possui em sua parede os neurônios entéricos que participam intensamente do controle das funções intestinais. A comunicação dos neurônios entéricos envolve entre outros, o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), com função motora inibitória e secretomotora no plexo submucoso. **Objetivo:** Avaliar a densidade de neurônios VIP imunorreativos no plexo submucoso do duodeno de ratos *Wistar* submetidos a diferentes tempos de infecção aguda por *T. gondii*. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (parecer nº 079/2013). Utilizamos 40 ratos *Wistar* machos com 60 dias de idade (n=5), distribuídos em grupo controle (GC) que recebeu solução salina e grupos infectados por 6 horas (G6), 12 horas (G12), 24 horas (G24), 48 horas (G48), 72 horas (G72), 7 dias (G7d) e 10 dias (G10d) que receberam suspensão contendo 5000 oocistos esporulados (cepa ME-49, genótipo II) por via oral. Realizou-se a eutanásia dos animais, os duodenos foram coletados e os plexos submucosos dissecados e processados para a marcação da subpopulação de neurônios vipérgicos VIP-imunorreativos (VIP-IR). Foram obtidas imagens de 32 campos microscópicos, com auxílio do Navegador de imagens FSX100 Olympus com microscópio integrado. A quantificação de neurônios VIP-IR foi feita no software de análise de imagens Image-Pro Plus. A análise estatística foi feita no programa Bioestat 5.3 e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. **Resultados:** O número de neurônios submucosos VIP-IR diminuiu no G72 ( $34,25 \pm 5,77$  neurônios/mm<sup>2</sup>), G7d ( $30,32 \pm 2,88$  neurônios/mm<sup>2</sup>) e G10d ( $29,64 \pm 5,25$  neurônios/mm<sup>2</sup>) quando comparado com o GC ( $45,89 \pm 10,45$  neurônios/mm<sup>2</sup>). **Conclusão:** A infecção aguda por *T. gondii* reduz a densidade de neurônios submucosos vipérgicos no duodeno de ratos *Wistar* a partir de 72 horas de infecção.

**Palavras-chave:** intestino delgado; sistema nervoso entérico; toxoplasmose.

**Financiador (es):** CAPES, Fundação Araucária

**Área temática:** Parasitologia

## INFECÇÃO CRÔNICA POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* CAUSA ALTERAÇÕES INDICATIVAS DE ATIVIDADE IMUNE NO ÍLEO DE HAMSTERS

Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>, Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes<sup>3</sup>, Thais Gomes Verzignassi Silveira<sup>3</sup>, Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>, Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

**Introdução:** *Leishmania (Viannia) braziliensis* é uma das principais espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil. Contudo, existem relatos na literatura que comprovaram a sua migração para outros órgãos além da pele, como o intestino. Este, é um importante órgão na manutenção da homeostase do organismo, possuindo um sistema imune próprio. A desregulação do ambiente intestinal pode levar à consequências em nível sistêmico. **Objetivo:** Avaliar alterações indicativas de resposta imune inata intestinal, como quantidade de linfócitos intraepiteliais (LIEs) e morfometria dos vilos do íleo de hamsters infectadas por *L. (V.) braziliensis*. **Material e métodos:** Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (7587260416). Foram utilizadas oito hamsters fêmeas distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Controle, que recebeu um inóculo de 100 µl de tampão fosfato salino estéril no dorso da pata esquerda posterior e o grupo infectado, que recebeu uma suspensão de 100 µl contendo  $2 \times 10^7$  formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). Após 120 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e tiveram aproximadamente 1 cm do seu íleo coletado para processamento histológico. Foram realizados cortes semi-seriados de 5 µm que, após serem corados pela técnica de hematoxilina e eosina foram analisados. Foi realizada a contagem dos LIEs presentes entre 2560 células epiteliais de cada animal (posteriormente foi calculada a proporção de LIEs/100 células epiteliais) e a morfometria de 64 vilosidades intestinais/animal. Para a análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade e a comparação entre grupos foi realizada utilizando o teste t, considerando significância estatística com  $p < 0,05$ . **Resultados:** Houve um aumento de 22,5 % nos LIEs, de 11,05 % na altura e 2,6 % na largura dos vilos após a infecção. **Conclusão:** A infecção crônica por *L. (V.) braziliensis* altera significativamente a atividade imune no íleo de hamsters.

**Palavras-chave:** leishmaniose; intestino delgado; imunidade inata.

**Financiador (es):** CNPq e CAPES

**Área temática:** Parasitologia

## QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO ÍLEO E CÓLON DE CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS CRONICAMENTE POR *Toxoplasma gondii*

Andressa Sulamita Siqueira Menezes de Brito<sup>1</sup>; Aline Aguiar<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Lucimara Rodrigues Carobeli<sup>3</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'ana<sup>5</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Laboratório de Neorogastroenterologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Toxoplasmose é uma infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* e a principal via de transmissão é a oral. Após a invasão, a primeira barreira que o parasito enfrenta são os componentes celulares da mucosa intestinal. Entre esses componentes estão os linfócitos intraepiteliais (LIEs) que migram da lâmina própria para o lúmen do intestino a fim de conter a infecção. **Objetivo:** Neste estudo, analisamos os efeitos da infecção crônica por *T. gondii* sobre os linfócitos intraepiteliais no íleo e cólon de camundongos C57BL/6. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA/UEM sob nº 4092040517. Oito camundongos C57BL/6 fêmeas foram distribuídos em grupo controle (GC, n = 8) que recebeu solução salina; e grupo infectado (GI, n = 8) que recebeu uma suspensão com 1.000 oocistos do parasito (linhagem ME-49, genótipo II) por via oral. Após 60 dias eles foram submetidos à eutanásia, os íleos e cólons foram removidos e processados para análise histológica. Seções de 5 µm foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e usadas para quantificar LIEs em 2560 células do epitélio (CE). A análise da distribuição dos dados foi feita pelo software BioEstat 5.0®. Posteriormente os grupos foram comparados utilizando t-student e apresentados como média e desvio padrão por meio do Software GraphPad Prism versão 5.01. Valores e p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** Observamos aumento significativo no número de LIEs no íleo do GI (7,26±0,63 LIE/100 CE) em relação ao GC (3,77±0,39 LIE/100 CE), entretanto esse aumento não foi observado no cólon. **Conclusão:** A infecção crônica por *T. gondii* aumentou a proporção de LIEs do íleo de camundongos C57BL/6.

**Palavras-chave:** toxoplasmose; infecção crônica; histologia.

**Financiador (es):** CAPES, CNPq, Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia

**Área temática:** Parasitologia



## REDUÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES NO ÍLEO DE HAMSTERS INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Beatriz Fonseca Ferreira<sup>1</sup>; Daniele Stefanie Sara Lopes Lera<sup>2</sup>, Maria Valdrinez Campana Lonardoni<sup>3</sup>, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>, Gessilda Alcantara Nogueira de Melo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** As células caliciformes (CC) são glândulas unicelulares presentes na túnica mucosa do intestino delgado, cuja principal função é produzir mucinas que compõem o muco lubrificante para o epitélio intestinal. Este muco representa, juntamente com as células epiteliais, a primeira barreira de defesa do intestino contra patógenos do lúmen. A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) apresenta afinidade por pele e mucosas, no entanto estudos relatam que o parasito pode também apresentar o processo de visceralização para outros órgãos, como o intestino. **Objetivo:** Analisar quantitativamente as CCs neutras e ácidas do íleo de hamsters após a infecção por LVB. **Material e métodos:** Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da UEM sob o nº 306206916. Foram utilizados 10 hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) distribuídos em dois grupos n=5: Grupo controle (GC) e grupo infectado com a cepa MHOM/2003/2314 (GI). A infecção foi realizada pela injeção de formas promastigotas de LVB ( $5 \times 10^6$  parasitos) no dorso da pata posterior direita. Após 15 semanas de infecção os animais foram eutanasiados e os íleos coletados. Foram obtidos cortes histológicos de espessura de  $4 \mu\text{m}$  em parafina, corados pelas técnicas de alcian-blue pH1,0 (AB1,0), alcian-blue 2,5 (AB2,5) e PAS. Os dados foram considerados de distribuição normal pelo teste de D'agostino e comparados pelo teste de análise de variância simples *Test t* considerando  $p < 0,05$  (média  $\pm$  desvio padrão). **Resultados:** Foi observada redução significativa do número de CC no íleo do GI (AB1,0:  $4,23 \pm 0,54$ ; AB2,5:  $5,24 \pm 0,50$  e PAS:  $9,23 \pm 0,45$ ) quando comparado ao GC (AB 1,0:  $13,75 \pm 0,59$ ; AB 2,5:  $11,06 \pm 1,66$ ; PAS:  $13,51 \pm 1,05$ ) respectivamente. **Conclusão:** A cepa 2314 de LVB reduziu significativamente o número de CC neutras e ácidas no íleo de hamsters infectados por 15 semanas.

**Palavras chave:** trato gastrointestinal; mucosa intestinal; leishmaniose.

**Área temática:** Parasitologia

## ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS SWISS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Giardia muris*

Caroline Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>; Lainy de Lima<sup>2</sup>; Marcelo Alberto Elias<sup>3</sup>; Deborah de Castro Moreira<sup>4</sup>; Renata Coltro Bezagio<sup>1</sup>; Liara Izabela Lopes Romera<sup>5</sup>; Fernanda Ferreira Evangelista<sup>1</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant`Ana<sup>6</sup>; Mônica Lúcia Gomes<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Mestre em Biologia Comparada Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Mestre Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmica Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente- Departamento de Ciências Morfológicas- DCM, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Docente- Departamento de Ciências Básicas da Saúde-DBS, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/ PR

**Introdução:** *Giardia muris* é um dos principais patógenos do trato gastrointestinal de roedores podendo desencadear resposta inflamatória e alterações histopatológicas, interferindo nos resultados de experimentos que utilizam esses animais como modelo. **Objetivos:** Analisar parâmetros clínicos e alterações histopatológicas do duodeno de camundongos naturalmente infectados por *G. muris* e não infectados. **Material e métodos:** Conforme aprovado pelo CEUA/UEM (parecer nº 8792240818), foram analisados 16 camundongos suíços machos, 21 dias, divididos em dois grupos com oito animais cada: GC (controle negativo) e GI naturalmente infectados por *G. muris*. Os animais foram acompanhados por parâmetros clínicos quantitativos (peso, ingestão de água e ração e eliminação de excretas) e qualitativos (aspecto do pelo e das fezes). Após 45º dia de acompanhamento, foi realizado a eutanásia e análise histopatológica do duodeno. **Resultados:** Foi identificado clinicamente que a infecção por *G. muris* (GI) em camundongos *swiss* reduziu significativamente ( $p=0,0001$ ) a quantidade do consumo de ração, água e excreta. Houve aumento significativo ( $p<0,05$ ) nos linfócitos intraepiteliais GC ( $2,14\pm 0,47$  LIE/100CE) e GI ( $3,17\pm 0,80$ ) e entre células de Paneth GC ( $48\pm 4,63$ ) e GI ( $63,87\pm 20,75$ ) além, de alterações significativas ( $p<0,05$ ) na altura do vilo e criptas do duodeno do GI em relação ao GC. **Conclusão:** A infecção por *G. muris* ocasiona importantes alterações clínicas e histopatológicas, salientando a necessidade de análise parasitológica e tratamento antiparasitário prévio antes de utilizar esses animais em experimentação, em especial, se *Giardia* spp. é o objeto de estudo.

**Palavras-chave:** giardíase; modelo experimental.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Parasitologia

## TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea* ALTERA O NÚMERO DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS APÓS INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii*

Claudia Nara de Almeida Lino Bratti<sup>1</sup>; Maria José Pastre<sup>2</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>2</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>3</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii* e acomete grande parte da população mundial. As opções de tratamento da infecção causada por este protozoário são limitadas e podem ser prejudiciais ao hospedeiro. Como uma nova opção terapêutica, a planta *Echinacea purpurea* (EP) tem sido estudada. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com EP sobre os leucócitos sanguíneos de ratos infectados pelo *T. gondii*. **Material e métodos:** Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEM (nº 7633021018). Foram utilizados 16 ratos Wistar. Oito deles receberam um pré-tratamento de 100 mg/kg por dia de EP por gavagem e os demais, água filtrada. Após 28 dias, 4 animais tratados com EP e 4 não tratados foram infectados com 500 oocistos de *T. gondii* cepa RH, formando assim, 4 grupos: Grupo Controle (G1), Grupo Infectado (G2), Grupo Controle Tratado (G3) e Grupo Infectado Tratado (G4). Cinco dias após a infecção, os grupos tratados continuaram recebendo EP por mais 28 dias e os demais água filtrada. Ao fim do período experimental, os animais foram anestesiados para coletar o sangue via retro-orbital. Essa amostra foi utilizada para a contagem dos leucócitos totais em câmara de Neubauer e de leucócitos diferenciais em esfregaço sanguíneo corado com May-Grünwald-Giemsa. Os dados foram considerados normais pelo teste de Shapiro-Wilk. Portanto, a comparação entre eles foi realizada pelo teste de ANOVA seguido de Tukey, sendo representados por média  $\pm$  desvio padrão por mm<sup>3</sup> de sangue. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . **Resultados:** Foi observada uma redução significativa na contagem de linfócitos no grupo G4 ( $3242 \pm 887,1$  mm<sup>3</sup>) quando comparado ao G1 ( $5998 \pm 1135$  mm<sup>3</sup>) e ao G3 ( $7068 \pm 1461$  mm<sup>3</sup>). Leucócitos totais, eosinófilos, monócitos e segmentados apresentaram uma tendência a diminuição não significativa estatisticamente. **Conclusão:** O tratamento da infecção por *T. gondii* com EP diminui o número de linfócitos.

**Palavras-chave:** toxoplasmose; tratamento; leucócitos sanguíneos.

**Financiador (es):** CAPES e CNPq

**Área temática:** Parasitologia

## ASSOCIATION OF MATRIX METALLOPROTEASE 9 AND WELL-CONTROLLED INFECTION OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose<sup>1</sup>; Camila Alves Mota<sup>1</sup>; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré<sup>1</sup>; Jully Oyama<sup>2</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>3</sup>; Izabel Galhardo Ddemarchi<sup>3</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoni<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate student (Ph.D.) in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Postgraduate student (Ph.D.) in Bioscience and Physiopathology, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introduction:** Recently, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) has been studied in the leishmaniasis pathogenesis showing potential for being used as a biomarker of this disease. Even though, there are few studies on New World cutaneous leishmaniasis (NWCL). **Objective:** Aspiring to a new prognostic factor for NWCL, we investigated the kinetics of MMP-9 in experimental infection caused by different species of subgenus *Leishmania* (*Viannia*). **Material and methods:** Three male golden hamsters were infected on the right back paw with promastigotes of *L. (V.) braziliensis* (LVb), *L. (V.) lainsoni* (LVI) or *L. (V.) naiffi* (LVn). The parasite loads in blood were assessed by absolute quantification using qPCR at 14, 56 and 105 days post-infection. At the same moments, the presence and absence of MMP-9 in serum was based on the expression of its RNA. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of UEM (nº 3062060916). **Results:** Clinical evolution of the lesion showed that L(V)b infection caused ulceration, while L(V)l infection just caused edema and L(V)n did not result in any visible alteration. The parasite load in blood was only detectable in L(V)n infection by 14 days-post-infection ( $7.2 \pm 1.41$  parasites/mL). L(V)n infection had detectable MMP-9 in all analysed time: 3/3, 2/3 and 3/3 animals at 24, 56 and 105 days post-infection, respectively. L(V)l infection presented MMP-9 at 14 (1/3 animals) and 105 days post-infection (2/3 animals). There was an association between MMP-9 and parasite blood dissemination. Although the expression of MMP-9 also appeared without parasite load detection, its expression suggested that in some point these species achieved the blood circulation, activating the immune response more effectively to control the infection when compared to L(V)b that did not show any dissemination trace. **Conclusion:** The clinical assessment showed that the expression of MMP-9 was increased in the best-controlled cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** leishmaniasis; biomarkers; matrix metalloproteinase 9.

**Financial support:** This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

**Thematic area:** Parasitology

## OS MATÓCITOS DO ÍLEO DE HAMSTERS NÃO SOFREM ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS APÓS 120 DIAS DE INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Erick Lincoln Carneiro<sup>1</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>2</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>3</sup>; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes<sup>4</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>4</sup>; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Caracterizando-se por feridas na pele e mucosas, a Leishmaniose Tegumentar Americana é uma doença infecciosa, não contagiosa que afeta homens e animais, sendo causada por diferentes espécies de *Leishmania*. Pode causar lesões disseminadas e até mesmo migrar para outros locais como por exemplo o intestino. Este órgão é de extrema importância para o funcionamento normal do organismo e apresenta grandes quantidades de mastócitos, células consideradas muito importantes frente à imunidade contra a leishmaniose.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* sobre os mastócitos intestinais de hamsters. **Material e métodos:** Foram utilizadas 10 hamsters fêmeas distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: o grupo controle (GC), no qual foi inoculado intradermicamente na pata posterior esquerda 100µl de tampão fosfato-salino estéril, e o grupo infectado (GI), que recebeu da mesma forma um inóculo contendo  $2 \times 10^7$  formas promastigotas da cepa MHOM/BR/2003/2314 de *L. (V.) braziliensis*. Após 120 dias de infecção, foi realizada a eutanásia por aprofundamento anestésico e 1 cm do íleo foi coletado para a rotina histológica, e assim realizou-se a quantificação de mastócitos totais em lâminas coradas com Azul de Toluidina e Fucsina G. A distribuição dos dados foi considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk e para comparação entre os grupos foi utilizado teste t de Student, com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (7587260416). **Resultados:** O GC apresentou uma média de 204,5 mastócitos por mm<sup>2</sup> por campo microscópico, com desvio padrão de  $\pm 55,69$ , enquanto o GI apresentou média de 179,6 e desvio padrão de  $\pm 10,43$ . Apesar da diminuição de 12% na quantidade de mastócitos do grupo infectado, não demonstrou-se significância estatística. **Conclusão:** Conclui-se que a infecção por *L. (V.) braziliensis* por 120 dias, não causa alterações no número de mastócitos do íleo de hamsters.

**Palavras-chave:** leishmaniose; mastócitos; intestino delgado.

**Área temática:** Parasitologia



## CONTAGEM DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO INTESTINO DE HAMSTERS INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Felipe Steinmacher Batista<sup>1</sup>; Beatriz Fonseca Ferreira<sup>2</sup>; Daniele Stefanie Sara Lopes Lera<sup>3</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) pode afetar órgãos além de pele e mucosas, como fígado, baço e intestino. No intestino, os linfócitos intraepiteliais (LIEs) têm importante função protetora em processos inflamatórios. **Objetivo:** Analisar quantitativamente os LIEs de jejuno e íleo de hamsters infectados por LVB. **Material e métodos:** Foram utilizados 29 hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) divididos aleatoriamente em um grupo controle (GC) e cinco grupos infectados. Foram injetados 100µL de tampão fosfato-salino na pata posterior dos hamsters controle, enquanto os animais infectados receberam formas promastigotas da cepa MHOM/2003/2314 de LVB ( $5 \times 10^6$  parasitos). Estes foram eutanasiados nos tempos de 2, 5, 8, 11 e 15 semanas de infecção (GI2, GI5, GI8, GI11, GI15, respectivamente). Foram coletados segmentos de jejuno e íleo e produzidos cortes histológicos (4µm), corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Foram contados os LIEs presentes entre 2560 células epiteliais e calculada a proporção LIE/100 células epiteliais. Os dados tiveram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e foram comparados pelo teste *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando  $p < 0,05$  (média  $\pm$  desvio padrão). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (306206916). **Resultados:** No jejuno, houve redução significativa de LIEs nos grupos GI8 ( $7,22 \pm 2,04$ ) e GI15 ( $6,83 \pm 0,74$ ) em relação ao controle (GC:  $11,88 \pm 4,603$ ). No íleo, ocorreu redução significativa ( $p < 0,001$ ) de LIEs em quase todos os grupos infectados (GI2:  $5,952 \pm 0,757$ ; GI5:  $5,92 \pm 0,315$ ; GI8:  $5,872 \pm 0,813$ ; GI11:  $5,712 \pm 1,628$ ) em comparação ao GC ( $10,13 \pm 1,164$ ). A infecção por 15 semanas (GI15:  $7,88 \pm 2,257$ ) não alterou o número de LIEs no íleo. **Conclusão:** A infecção por LVB reduziu o número de LIEs no jejuno e no íleo de hamsters.

**Palavras-chave:** intestino delgado; linfócitos intraepiteliais; leishmaniose.

**Financiadores:** CAPES e CNPq

**Área temática:** Parasitologia

## DIMINUIÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DE MASTÓCITOS NO CÓLON DE HAMSTERS INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Henrique Cazanti Sona<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Maria José Pastre<sup>3</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação (Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A leishmaniose é uma doença de alta incidência em todo o mundo, chegando a 98 países. Além do local da picada do flebotomíneo, pode migrar para órgãos secundários como o trato gastrointestinal. Os mastócitos localizados na lâmina própria do intestino possuem função imunorreguladora. **Objetivos:** Investigar os efeitos da infecção por diferentes cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* sobre a quantidade de mastócitos no cólon de hamsters. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais da UEM (nº7587260416). Foram utilizados 8 hamsters fêmeas (n=4) distribuídos aleatoriamente em um grupo controle (GC) e grupo infectado (1655). O grupo infectado recebeu  $2 \times 10^7$  formas promastigotas do isolado de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/2000/1655 (1655), na pata traseira esquerda. Após 90 dias os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico, o cólon foi coletado, lavado e fixado. Cortes transversais semi-seriais de 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram realizadas e posteriormente coradas por Azul de Toluidina e Fucsina G. Todos os mastócitos presentes em 100 campos, foram contados na objetiva de 100x. A análise estatística foi realizada por meio do teste *t* ( $p < 0,05$ ) e os resultados foram apresentados por média  $\pm$  erro padrão da quantidade de mastócitos presentes em aproximadamente 1  $\text{mm}^2$  da lâmina própria. **Resultados:** Os mastócitos do grupo infectado ( $70,18 \pm 6,96$  mastócitos/  $\text{mm}^2$ ), tiveram diminuição significativa se comparado com o GC ( $116,5 \pm 12,39$ ). **Conclusão:** A infecção subcutânea com *L. (V.) braziliensis* mostrou alterações na quantidade de mastócitos presentes no cólon de hamsters infectados.

**Palavras-chave:** doença parasitária; intestino grosso; leishmaniose.

**Financiador (es):** CAPES, Fundação Araucária

**Área temática:** Parasitologia

## CHARACTERIZATION OF TWO SUBPOPULATIONS OF EXTRACELLULAR VESICLES DERIVED FROM THE INTERACTION OF *Trypanosoma cruzi* WITH HOST CELLS

Izadora Volpato Rossi<sup>1</sup>; Maria Alice Ferreira Nunes<sup>2</sup>; Marcel Ivan Ramirez<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>PhD student on Molecular and Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba/PR

<sup>2</sup>Master student on Molecular and Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba/PR

<sup>3</sup>Researcher - Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba/PR

<sup>4</sup>Researcher - Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro/RJ

**Introduction:** The protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, has a complex biological cycle. *T. cruzi* have developed several mechanisms to escape to the complement system attack and invade eukaryotic cells, expressing different molecules and releasing extracellular vesicles, which comprises microvesicles and exosomes, according to their size and biogenesis. Our group have shown that EVs secreted by parasites interacting with host cells promotes complement system inhibition and increases the invasion of *T. cruzi* to cells.

**Objective:** Here, our aim was to understand the secretion of EVs by different stages of the parasite. **Materials and methods:** Parasites from CL Brener and Dm28 strains of *T. cruzi* was differentiate to metacyclic forms (METAs) by a nutrient starvation process and tissue-culture derived trypomastigotes (TCT) was obtained from the supernatant of infected VERO cells monolayers. To induce EVs secretion, different parasite stages was exposed to THP1 cells in a relation of 5:1 (parasites:cells) for one hour at 37°C. EVs subpopulations was isolated by differential centrifugation method, with large EVs (LEVs, predominantly microvesicles) obtained from a 11.000xg centrifugation and small EVs (SEVs, predominantly exosomes) from a subsequent 100.000xg centrifugation and it was evaluated the protein dosage in EVs. **Results:** It was seen that parasites from Dm28c strain had higher capability of inducing the secretion of both LEV and SEV compared to CL Brener strain. For both strains, LEV secretion was twice as high as that of SEV. As seen before by our group, TCT induced a higher secretion of EVs than METAs. **Conclusion:** The two subpopulations of EVs was differentially secreted from the parasites and had different features. The next steps of this work are to understand if different subpopulation of EVs have different functions in the resistance and invasion of *T. cruzi* and to characterize the secretion of EVs between different strains.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; extracellular vesicles; host-parasite interaction.

**Financial support:** Capes/CNPQ

**Thematic area:** Parasitology

## CAMUNDONGOS SWISS E BALB/C COMO MODELOS EXPERIMENTAIS NO ESTUDO DA GIARDÍASE: COMPARAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS

Liara Izabela Lopes Romera<sup>1</sup>; Renata Coltro Bezagio<sup>2</sup>; Caroline Rodrigues de Almeida<sup>2</sup>; Lais de Fátima Contessotto<sup>3</sup>; Cristiane Maria Colli<sup>4</sup>; Mônica Lúcia Gomes<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** Ainda não se tem clareza quanto ao melhor modelo experimental murino para estudo da giardíase humana. Faz-se necessário ampliar os estudos a respeito dos animais de bioexperimentação, realizando avaliação comparativa de parâmetros parasitológicos, como infecções pré-existentes, que possam interferir na fisiologia do animal e comportamentais que interferem na experimentação. **Objetivo:** Avaliar parâmetros parasitológicos e comportamentais de duas linhagens (Swiss e Balb/c) como método de escolha de modelo experimental murino para giardíase humana. **Material e métodos:** Dez camundongos de cada linhagem e sexo foram divididos em grupos experimentais de cinco animais. O experimento ocorreu em duplicata. A detecção de infecção pré-existente por *Giardia muris* foi realizada pelo método de Ritchie modificado com quantificação em câmara Neubauer e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O comportamento dos animais foi analisado com auxílio do *software* X-plo Rat. O trabalho foi aprovado pelo CEUA-UEM sob o protocolo nº 9375170816. **Resultados:** Os camundongos Swiss estavam naturalmente infectados com *G. muris* com eliminação média de  $1 \times 10^6$  cistos/g de fezes para machos e  $7,8 \times 10^5$  cistos/g de fezes para fêmeas, com visualização de fragmentos de 470 pb amplificados pela PCR, o que pode interferir na fisiologia e resposta imune do animal. Os Balb/c apresentaram microscopia negativa e ausência de produtos de amplificação pela PCR. A análise do comportamento animal mostrou uma maior frequência de deslocamento dos camundongos Balb/c em relação ao Swiss, para ambos sexos, com diferenças significativas entre eles ( $p < 0,05$ ) sugerindo maior agitação que pode interferir na sua manipulação durante o período de experimentação. **Conclusão:** De acordo com os parâmetros avaliados, o modelo experimental mais adequado sugerido para o estudo da giardíase humana, apesar de sua maior agitação o que pode interferir na sua manipulação, são os camundongos Balb/c visto que chegam do biotério livres de infecção pré-existente por *G. muris*.

**Palavras-chave:** camundongo; giardíase; modelo-experimental.

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

**Área temática:** Parasitologia

## QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DE PANETH NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 SUBMETIDOS À INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii*

Lucimara Rodrigues Carobeli<sup>1</sup>; Aline Aguiar<sup>2</sup>; Andressa Sulamita Siqueira Menezes de Brito<sup>2</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A toxoplasmose é uma das parasitoses mais difundidas no mundo e tem importância veterinária e médica. O *Toxoplasma gondii* provoca inflamação intestinal que pode afetar a estrutura e função do órgão. O epitélio do intestino delgado contém células que contribuem na defesa do hospedeiro, como as células de Paneth, que produzem peptídeos antimicrobianos, os quais podem evitar infecções parasitárias. **Objetivo:** Avaliar o efeito da infecção crônica por *T. gondii*, sobre as células de Paneth presentes no íleo de camundongos C57BL/6. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA/UEM nº4092040517. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=8): controle (GC) que receberam gavagem com solução salina estéril e infectado (GI) que receberam gavagem com 1.000 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa ME49). Sessenta dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e amostras do íleo coletadas para processamento histológico com coloração em hematoxilina-eosina. Em microscópio óptico com objetiva de 100X contou-se o número de células de Paneth presentes em 64 criptas do íleo de cada animal. Por meio do software GraphPad Prism® 5.0, realizou-se a análise dos dados aplicando o teste *T-student*, com significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. **Resultados:** Não houve alterações significativas sobre o número de células de Paneth após a infecção crônica ( $133,9 \pm 5,2$  células de Paneth em 64 criptas) em comparação ao grupo controle ( $121,8 \pm 6,9$  células de Paneth em 64 criptas) ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** A infecção crônica por *T. gondii* (cepa ME49) não alterou o número de células de Paneth no íleo de camundongos C57BL/6.

**Palavras-chave:** epitélio intestinal; intestino delgado; toxoplasmose.

**Área temática:** Parasitologia



## A INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NÃO ALTERA O COLÁGENO DO ÍLEO DE HAMSTERS

Maria Gabriela Lima da Silva<sup>1</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>2</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>3</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>4</sup>; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A leishmaniose tegumentar é uma doença causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*, como a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Porém, já foram comprovadas alterações histopatológicas no intestino delgado de animais infectados por essa espécie. Dentre essas alterações, foi visto o aumento da espessura da submucosa intestinal, camada que apresenta formação e deposição de colágeno que, por sua vez, tem uma importante relação com a infecção. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da infecção por *L. (V.) braziliensis* sobre o colágeno do íleo de hamsters. **Material e métodos:** O Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da UEM aprovou este trabalho sob protocolo nº7587260416. Foram utilizadas 24 hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) com 12 semanas de idade que formaram quatro grupos com 6 animais cada. Dois grupos formados eram os controles de 90 ou 120 dias de infecção, os outros dois grupos foram infectados pela cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis* e permaneceram infectados por 90 ou 120 dias. A eutanásia desses animais se deu após o tempo experimental, sendo coletado 1 cm do íleo para histologia. As lâminas obtidas a partir de cortes semi-seriados de 5µm foram coradas pela técnica de Picrosirius. Imagens dessas lâminas foram capturadas em microscópio trilocular para avaliar a área ocupada pelo colágeno total e com um filtro de luz polarizada para evidenciar os colágenos dos tipos I e III. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image-Pro Plus® 4.5. A normalidade dos dados foi evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk e a relação análise de variância entre os grupos foi realizada por ANOVA seguido de Tukey considerando  $p < 0,05$ . **Resultados:** Apesar de observarmos uma tendência ao aumento do colágeno total, nenhum dos resultados demonstrou alterações significativas no colágeno intestinal. **Conclusão:** A infecção por *L. (V.) braziliensis* não alterou o colágeno do íleo de hamsters.

**Palavras-chave:** leishmaniose; colágeno; intestino delgado.

**Financiador (es):** CNPq e CAPES

**Área temática:** Parasitologia

## INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii* REDUZ O NÚMERO DE GÂNGLIOS VIPÉRGICOS NO PLEXO SUBMUCOSO DO DUODENO DE *Rattus norvegicus*

Maria José Pastre<sup>1</sup>; Aline Rosa Trevizan<sup>1</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>2</sup>; Eduardo José de Almeida Araújo<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

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

**Introdução:** O oocisto de *Toxoplasma gondii* ingerido eclode no trato digestório e origina formas infectantes capazes de transpor a barreira intestinal do hospedeiro. No tubo digestório estão presentes os neurônios entéricos que controlam todas as funções intestinais, e o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) é um neurotransmissor inibitório que atua no funcionamento dos neurônios do plexo submucoso. **Objetivo:** Investigar os efeitos da infecção aguda por oocistos de *T. gondii* sobre o número de gânglios VIP imunorreativos (VIP-IR) do duodeno de *Rattus norvegicus*. **Material e métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais da UEM (n°079/2013). Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus*, Wistar, machos, com 60 dias de idade (n=5). Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em GC (grupo controle) que recebeu solução salina; G6, G12, G24, G48 e G72 (horas de infecção); e G7 e G10 (dias de infecção) que receberam suspensão contendo 5.000 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa ME-49) por via oral. Os ratos foram submetidos a eutanásia e os plexos submucosos do duodeno foram dissecados e processados para a técnica imunohistoquímica de marcação da subpopulação de neurônios vipérgicos VIP- IR. Foram obtidas imagens de 32 campos microscópicos, com auxílio do Navegador de imagens FSX100 Olympus com microscópio integrado. A quantificação de gânglios submucosos contendo neurônios VIP-IR foi feita no software de análise de imagens Image-Pro Plus. A análise estatística foi realizada no programa Bioestat 5.3 e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. **Resultados:** O número de gânglios submucosos VIP-IR diminuiu no G7d ( $9,05 \pm 0,89$  gânglios/mm<sup>2</sup>) e G10d ( $9,87 \pm 0,64$  gânglios/mm<sup>2</sup>) quando comparado com o GC ( $12,61 \pm 1,47$  gânglios/mm<sup>2</sup>). **Conclusão:** A infecção aguda por *T. gondii* reduz o número de gânglios submucosos contendo neurônios vipérgicos no duodeno de *Rattus norvegicus* a partir de 7 dias de infecção.

**Palavras-chave:** gânglios nervosos; intestino delgado; toxoplasmose.

**Financiador (es):** CAPES, Fundação Araucária.

**Área temática:** Parasitologia

## ÁREA DE GÂNGLIOS MIENTÉRICOS E SUBMUCOSOS NO DUODENO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO AGUDA POR *Toxoplasma gondii*

Mariana Buranelo<sup>1</sup>; Aline Rosa Trevizan<sup>2</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Pró-Reitora de Extensão e Cultura, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Na infecção oral, o *Toxoplasma gondii* precisa atravessar a barreira intestinal para se disseminar pelo organismo. Na parede do tubo digestório, os neurônios do sistema nervoso entérico organizam-se em dois plexos ganglionados. O mientérico encontra-se entre os estratos da túnica muscular e controla a motilidade, enquanto o submucoso encontra-se dentro da tela submucosa e controla a secreção e vasomotricidade intestinal. **Objetivo:** Mensurar a área de gânglios mientéricos e submucosos no duodeno de ratos submetidos à infecção aguda por *Toxoplasma gondii*. **Material e Métodos:** O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (n° 079/2013). Utilizamos 40 ratos Wistar machos com 60 dias de idade (n=5), distribuídos em grupo controle (GC) que recebeu solução salina, e grupos infectados por 6 (G6), 12 (G12), 24 (G24), 48 (G48), 72 horas (G72) e 7 (G7d) e 10 dias (G10d), que receberam suspensão contendo 5000 oocistos esporulados do parasito por via oral. Os animais foram submetidos a eutanásia, os duodenos coletados, fixados, embebidos em parafina, e levados ao micrótomo para obtenção de cortes semi-seriados de 10 µm. Foi realizada a coloração de Azan e a mensuração da área dos gânglios mientéricos e submucosos presentes em 16 campos microscópicos por animal (objetiva 20x) através do *software* Image Pro Plus. A análise estatística foi feita no programa Bioestat 5.3 e os resultados expressos como média ± desvio padrão. **Resultados:** Não houve diferença significativa na área de gânglios mientéricos nos grupos infectados quando comparados com o GC, entretanto, houve uma diminuição na área dos gânglios submucosos no G12 (271,68 ± 96,20 µm<sup>2</sup>), G24 (226,22 ± 8,82 µm<sup>2</sup>) e G10d (258,72 ± 76,72 µm<sup>2</sup>) em relação ao GC (433,14 ± 74,01 µm<sup>2</sup>). **Conclusão:** A infecção aguda por *Toxoplasma gondii* causa diminuição na área de gânglios submucosos no duodeno de ratos Wistar.

**Palavras-chave:** gânglios nervosos; sistema nervoso entérico; toxoplasmose.

**Financiador (es):** CNPq e Fundação Araucária

**Área temática:** Parasitologia

## EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* E CETOCONAZOL OU ANFOTERICINA B NA EVOLUÇÃO DA LESÃO TEGUMENTAR POR LEISHMANIOSE EM CAMUNDONGOS BALB/C

Mariana de Souza Terron-Monich<sup>1</sup>; Karine Sartori Patel<sup>2</sup>; Karla Larissa Trassi Ganaza<sup>3</sup>; Aline Ávila Brustolin<sup>1</sup>; Zilda Cristiani Gazim<sup>4</sup>, Izabel Galhardo Demarchi<sup>5</sup>; Thais Gomes Verzignassi Silveira<sup>5</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoni<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Paranaense, Umuarama/PR

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

**Introdução:** A terapia combinada pode ser uma alternativa terapêutica para a leishmaniose, permitindo uma redução da concentração dos medicamentos utilizados, resistência do parasito e tempo de tratamento. O efeito sinérgico da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) ao cetoconazol (CETO), bem como a anfotericina B (AmB) contra *Leishmania Leishmania amazonensis* foi mostrado *in vitro*, mas ainda não *in vivo*. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento combinado entre óleo essencial de TrEO e CETO ou AmB na evolução da lesão causada por *Leishmania Leishmania amazonensis* em camundongos Balb/c. **Material e métodos:** Camundongos Balb/c foram infectados na pata posterior direita com  $2 \times 10^7$  parasitos/mL de *Leishmania (L.) amazonensis* (CEUA-UEM nº 2096250517). Após o aparecimento das lesões, os animais foram separados em seis grupos: infectado e não tratado (controle); tratados localmente com TrEO 60 mg/mL ou oralmente com CETO 40 mg/Kg, por 30 dias; tratados com AmB 5 mg/Kg, por 20 dias (via peritoneal); tratados com TrEO e CETO e com TrEO e AmB. A espessura e volume das patas foram mensurados semanalmente e as diferenças entre os grupos foi analisada utilizando o teste ANOVA (Bioestat 5.0), considerando  $p < 0,05$ . **Resultados:** Ao final do tratamento, apenas os grupos tratados com AmB e AmB associado ao TrEO mostraram lesões significativamente menores em relação ao grupo controle. Entretanto, TrEO parece não ter contribuído com o efeito da AmB. O tratamento com CETO ou com apenas TrEO não afetou a evolução das lesões. **Conclusão:** os tratamentos combinados propostos não foram eficazes para o controle da evolução da lesão causada por *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos Balb/c. A avaliação da carga parasitária das lesões e órgãos está em estudo e poderá esclarecer a ação desses medicamentos na infecção por *Leishmania*.

**Palavras-chave:** *Leishmania (L.) amazonensis*; terapia combinada; antiparasitários.

**Financiador (es):** O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001

**Área temática:** Parasitologia

## AVALIAÇÃO NAS MUCINAS PRESENTES NO ÍLEO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL

Mariana Sacchi Silva<sup>1</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>2</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>3</sup>; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e tem os cães como o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral da área próximas à florestas para a área urbana. Um dos órgãos atingidos pela doença é o intestino delgado. Este órgão, por sua importância imune, é essencial para a homeostase do organismo, que apresenta em seu epitélio células caliciformes, responsáveis por produzir, armazenar e secretar mucinas, constituintes do muco, que por sua vez tem a função de proteção do organismo. **Objetivo:** Verificar as possíveis alterações nas células caliciformes de cães portadores de leishmaniose visceral. **Material e métodos:** Este trabalho foi aprovado pela CEUA/UFGD sob nº27/2016. Os animais que adquiriram naturalmente a doença e apresentaram sorologia positiva para leishmaniose foram agrupados no grupo infectado (GI); e no grupo controle (GC), ficaram os cães com sorologia negativa. Foi realizada a eutanásia e aproximadamente 5 cm do íleo dos animais foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4%. Para confecção das lâminas histológicas, o material foi desidratado, diafanizado e embocado em parafina, com cortes semi-seriados de 5 µm, que foram corados pela técnica de Alcian Blue pH 2,5 para a detecção de mucinas ácidas. Em microscópio óptico, objetiva de 100X, foram contadas 2560 células do epitélio da túnica mucosa intestinal de cada animal e as células caliciformes presente entre elas. A distribuição dos dados foi considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos foi realizada por teste T. Os dados foram representados por média ± desvio padrão e p<0,05 foi considerado significativo estatisticamente. **Resultados:** Não houve diferença significativa na contagem de células caliciformes do GI (17,07 ± 2,32) em relação ao GC (19,04 ± 4,07). **Conclusão:** A leishmaniose visceral não causou alteração quantitativa das células caliciformes no íleo de cães infectados.

**Palavras-chave:** leishmaniose visceral; células caliciformes; cães.

**Financiador (es):** Capes e Fundação Araucária

**Área temática:** Parasitologia



## DANOS MITOCONDRIAIS EM *Leishmania amazonensis* INDUZIDOS PELO 1,2-BIS[3-(2-METIL-1,3-DIOXOLAN-2-IL)FENIL]DITELANO

Natália Storck Ceroni<sup>1</sup>; Pamela Bandeira<sup>2</sup>; Rayanne Regina Beltrame Machado<sup>3</sup>; Danielle Lazarin Bidóia<sup>4</sup>; Tânia Ueda-Nakamura<sup>5</sup>; Sueli de Oliveira Silva<sup>6</sup>; Leandro Piovani<sup>7</sup>; Celso Vataru Nakamura<sup>8</sup> e Francielle Pelegrin Garcia<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente - Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente - Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná

<sup>8</sup>Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>9</sup>Docente - Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

**Introdução:** A leishmaniose cutânea é definida pela presença de lesões infectantes que causam deformações dermatológicas e está associada à *Leishmania amazonensis*. Além do alto custo, o tratamento pode ser abandonado pelo paciente devido ao uso extensivo, falhas medicamentosas e efeitos colaterais dos medicamentos atualmente disponíveis. Assim, considera-se importante a pesquisa de novas alternativas de tratamento para pacientes com leishmaniose. A atividade antileishmania da substância 1,2-bis[3-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]ditelano (LQ-6) já foi relatada anteriormente na literatura. **Objetivo:** Avaliar o possível mecanismo de ação da substância LQ-6 em promastigotas de *L. amazonensis*. **Material e métodos:** A ultraestrutura dos parasitos foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, os parasitos foram tratados com IC<sub>50</sub> (0,17 µM) e 2xIC<sub>50</sub> (0,34 µM), incluídos em resina EPON e visualizadas em JEOL JEM-1400. Por fluorimetria, os parasitos tratados foram avaliados quanto à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) total com o marcador H<sub>2</sub>DCFDA (10 µg/mL) e a produção de ATP utilizando o Kit ATP (Promega). Adicionalmente, por citometria de fluxo, determinou-se o potencial transmembrânico mitocondrial utilizando o corante catiônico Rodamina 123 (Rh 123) (5 mg/mL em etanol) (Sigma®, St Louis, MO, USA). As análises estatísticas foram realizadas através do software Prism 7.04 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). **Resultados:** Observamos por microscopia eletrônica de transmissão que a substância LQ-6 causou intensa desorganização do conteúdo citoplasmático e inchaço mitocondrial. Além disso, foi observada uma hiperpolarização mitocondrial, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de ATP. **Conclusão:** A substância LQ-6 foi capaz de induzir extenso estresse oxidativo nos parasitos de formas promastigotas de *L. amazonensis*, o que justifica sua boa atividade.

**Palavras-chave:** *Leishmania amazonensis*; mitocôndria; estresse oxidativo.

**Financiador (es):** CAPES, CNPq e PRONEX/Fundação Araucária

**Área temática:** Parasitologia

## MELHORA NA DETECÇÃO PARASITOLÓGICA E MOLECULAR DE *Giardia duodenalis* EM AMOSTRAS DE FEZES COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA

Renata Coltro Bezagio<sup>1</sup>; Cristiane Maria Colli<sup>2</sup>; Liara Izabela Lopes Romera<sup>3</sup>; Caroline Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>; Érika Cristina Ferreira<sup>4</sup>; Salette Mattia<sup>5</sup>; Mônica Lúcia Gomes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Farmacêutica Bioquímica – Laboratório Municipal de Paiçandu, Paiçandu/PR

**Introdução:** A detecção de *Giardia duodenalis* em amostras fecais pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é difícil devido a inibidores que contaminam as preparações do DNA ou devido a baixas concentrações de cistos nas fezes. **Objetivo:** Substituir o Formol por diferentes tipos de água no método de Ritchie, a fim de eliminar inibidores, melhorar a recuperação de cistos e a detecção molecular de *G. duodenalis*. **Material e métodos:** Amostras fecais foram classificadas em alta, média e baixa concentração de cistos e analisadas pelo método de Ritchie (1948) convencional (MC) e modificado, substituindo o Formol pela água Destilada (MDs), Deionizada (MDz), Injeção (MI) e Milli-Q® (MM). Fragmentos dos genes Glutamato Desidrogenase (GDH) e  $\beta$ -giardina ( $\beta$ g) foram amplificados por *semi-nested* e PCR convencional simples, respectivamente. Análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Humano da Faculdade Integrado-Campo Mourão/Paraná/Brasil (parecer nº 1.594.078). **Resultados:** A recuperação de cistos de *G. duodenalis*, pela microscopia em Câmara de Neubauer, foi melhorada em todos os métodos processados com água (MDs/MDz/MI/MM), sem diferença estatística, em comparação com o método convencional (MC-Formol). Em todas as concentrações o grupo MM mostrou consistentemente a maior recuperação de cistos, com 52,9%, 38,7% e 48,5% a mais em amostras com baixa/média/alta concentração, respectivamente, quando comparado ao MC. Em amostras de alta/média ambos os genes foram amplificados quando o método modificado foi utilizado. Em baixa concentração, o gene GDH foi amplificado de amostras processadas pelo MM/MDs e  $\beta$ g em MM. Não houve amplificação de DNA quando utilizado o MC. **Conclusão:** O método com água Milli-Q® possibilita maior recuperação de cistos de amostras de fezes e, correspondentemente, maior sensibilidade para detectar cistos de *G. duodenalis* por microscopia ou por PCR para os genes GDH e  $\beta$ g, mesmo em amostras de baixa concentração.

**Palavras-chave:** giardiase; diagnóstico; pcr.

**Financiador:** Programa de Apoio à Pós Graduação - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROAP - CAPES)

**Área temática:** Parasitologia



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Educação em saúde e ciências

## PRODUÇÃO DE UM VÍDEO ANIMADO COMO FERRAMENTA PARA A DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA NA ÁREA DA SAÚDE

Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka<sup>1</sup>; Amanda Carrasco Duarte<sup>2</sup>; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>3</sup>; Josiane Bazzo de Alencar<sup>4</sup>; Quirino Alves de Lima Neto<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Educação para a Ciência e Matemática, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorando) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorando) em Biociências e Fisiopatologia, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A evolução das tecnologias e a rápida divulgação de notícias à população tornou possível o rápido acesso à informação. Contudo, muitas destas informações não são verdadeiras. Nesse contexto, a universidade deveria atuar como difusor de conhecimento, porém, muitas vezes as produções ficam restritas a esse universo. Desta forma, a população sem acesso ao ambiente universitário fica a mercê de notícias compartilhadas em mídias não especializadas, acarretando em informações imprecisas ou errôneas. Como toda universidade se pauta no tripé Ensino, Pesquisa e Extensão, uma de suas funções é divulgar os conhecimentos adquiridos em suas pesquisas e adaptar o vocabulário científico para o vocabulário cotidiano, facilitando a compreensão de conceitos complexos e sensibilizando a população para importância da pesquisa dentro das universidades. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi produzir um material de divulgação científica acerca de conceitos relacionados à imunogenética e sobre a aplicação desses conceitos em pesquisas realizadas no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM). **Material e métodos:** O vídeo foi produzido utilizando uma ferramenta online de criação de vídeos animados, chamada "PowToon". O curta-metragem explica de forma resumida os conceitos básicos de polimorfismo genéticos e suas consequências, bem como aplicabilidade em estudos de caso-controle desenvolvidos no LIG-UEM. **Resultados:** O vídeo produzido se encontra na plataforma *YouTube*, intitulado "Polimorfismos Genéticos e Imunogenética", disponível no *link* <https://youtu.be/WjiE4mXI7as>. Além disso, o curta-metragem foi apresentado no evento de divulgação científica "*Pint of Science*", realizado no Boteco do Neco em Maringá. **Conclusão:** A partir da ferramenta utilizada foi possível produzir uma animação de curta-metragem duração que explica didaticamente um dos trabalhos realizados no LIG-UEM. Com a divulgação em eventos e nas redes sociais, espera-se que o vídeo atinja a população da região de Maringá, aumentando o alcance de informações científicas e conscientizando a população para importância da pesquisa nas universidades.

**Palavras-chave:** Popularização científica; polimorfismo genético; imunogenética.

**Financiador (es):** Laboratório de Imunogenética – UEM, CAPES e CNPq

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## A INFLUÊNCIA DA MÍDIA NOS HÁBITOS ALIMENTARES DA CRIANÇA E O PAPEL DA ESCOLA E DOS RESPONSÁVEIS NESSE PROCESSO

Bianca Dias de Souza<sup>1</sup>; Rayara Carvalho Barroso<sup>1</sup>; Karina Cardoso Gonzalez Vaz<sup>2</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A alimentação no início da vida de um indivíduo constituirá a principal fonte de nutrientes e determinará as predisposições para certos tipos de alimentos. A influência da mídia é poderosa, e as crianças não são apenas seus alvos preferidos, mas também os mais suscetíveis. A escola tem o papel de incentivar e buscar projetos que visem conhecimento a respeito de uma melhor alimentação aos alunos, em conformidade com os princípios legais da educação. **Objetivo:** Destacar a influência da mídia nos hábitos alimentares de alunos do ensino infantil e fundamental. **Material e métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática, de natureza qualitativa, nas bases de dados BVS, SciELO e CAPES publicados no período de 2012 a 2019, utilizando os descritores: alimentação, educação infantil e mídia. Assim 10 artigos foram selecionados. **Resultados:** Os responsáveis tornaram-se vítimas da correria do mundo moderno, permitindo a criança estar mais horas disponível a ocupar seu tempo com a mídia de modo geral. Nesse quadro, a criança fica exposta a propagandas de produtos industrializados, com rotulagens que incluem seus personagens de modo a influenciar a alimentação. Essa permissividade tem influência direta dos hábitos permitidos e sancionados em casa, pois os pais são responsáveis pela saúde de seus filhos. Nesse sentido, é necessário que haja uma participação direta das escolas, enquanto responsáveis pelo desenvolvimento cognitivo, social, psíquico na vida da criança, com ênfase em atividades pedagógicas agindo junto a órgãos de saúde e com a família como promotoras de saúde. **Conclusão:** Pode-se perceber o papel da mídia sobre as crianças e como ela pode ser usada a favor da saúde através de projetos direcionados. Percebeu-se, também, o papel dos pais na educação alimentar da família, incluindo seus filhos e a missão que as escolas têm de serem promotoras de saúde dos indivíduos, mesmo na idade infantil.

**Palavras-chave:** educação; mídia; hábitos alimentares.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências



## ABORDAGENS METODOLÓGICAS RELACIONADAS AO ESTUDO DE CIÊNCIAS

Eliz Cristina Hergessel Bodnariuc<sup>1</sup>; Larissa dos Santos Bezerra<sup>1</sup>; Niviane Cristina Alves da Silva<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Regineá de Souza Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup> Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup> Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** O estudo de ciências naturais ainda na idade escolar é de grande importância na formação do indivíduo, contribuindo para a construção de cidadãos pensantes. Algumas metodologias acabam por optar somente pelo uso do livro didático em sala de aula ao prepararem o conteúdo ministrado. **Objetivo:** Apresentar metodologias que possam ser utilizadas para o ensino de ciências na educação infantil. **Material e métodos:** Trata-se de um levantamento sistemático, de caráter descritivo, com natureza qualitativa, baseada em artigos do período de 2009 a 2019 e ampliada através de busca em outras fontes e nas bases de dados: eletrônicas, Scientific Electronic Libray Online – SCIELO e na Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. **Resultados:** Foi apresentado que a associação dos conhecimentos teóricos e práticos apresentam dificuldades para que seja realizado: desmotivação profissional, apoio da instituição de ensino, falta de capacitação nos cursos de graduação para abordar a temática. É importante que o professor utilize estratégias que levem o aluno a investigar por si mesmo, mudar a dinâmica da aula, rompendo com o modelo tradicional de ensino. Ainda foi identificado que o livro didático pode ser uma barreira para que o professor utilize estratégias ativas, e que pode ser quebrada se a criatividade e problematizações forem aplicadas. **Conclusão:** Este estudo permitiu observar que são muitos os desafios para uma abordagem metodológica no ensino de ciências naturais. Acredita-se que pode haver melhorias nas condições para novas abordagens de metodologia ao ensinar ciências naturais. Os resultados encontrados neste estudo, apresentam uma iniciativa com sugestões para melhorias na forma como ensinar. Essa ação promove um melhor desenvolvimento do aluno ao relacionar a ciência com as demais disciplinas, de uma forma didática através de novas abordagens.

**Palavras chaves:** métodos alternativos de ensino; ciências; ensino fundamental.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## A HORTA SUSTENTÁVEL COMO PRÁTICA EDUCATIVA EM SAÚDE AMBIENTAL: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

Euana das Chagas<sup>1</sup>; Alexsannia Barbosa Antunes<sup>1</sup>; Gabrielle Palma Feifer<sup>2</sup>; Anna Rebeka Ferreira Oliveira<sup>3</sup>; Reginéa Machado<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup> Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup> Mestranda em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup> Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Os constantes desastres naturais causam destruições impactantes no meio ambiente; enchentes, efeito estufa, poluição do ar, são reflexos das ações impensadas de várias gerações. É necessário que o homem construa uma consciência ambiental, desenvolvida desde sua infância. Para possibilitar a construção de valores e atitudes voltadas para o meio ambiente, é de extrema importância que este tema seja discutido nos currículos escolares, sendo trabalhado de forma prática, com a finalidade de impressionar a criança sobre a urgência de preservar o meio ambiente. **Objetivo:** Analisar a contribuição do projeto de educação ambiental realizado com os alunos do 1º ano do ensino fundamental para a consciência ecológica. **Material e Métodos:** O estudo adotou uma linha qualitativa com caráter descritivo exploratório do tipo relato de experiência feito por entrevista, desta participaram 30 estudantes. A prática foi realizada com alunos do 1º ano do Ensino Fundamental da rede privada de Maringá, participaram 30 alunos, na faixa etária de 6 e 7 anos. Estes produziram uma mini-horta sustentável, desenvolvida em 4 etapas nos meses de março a junho de 2018. **Resultados:** Os discentes consideraram a prática de grande relevância para suas vidas, refletindo a grande importância de trabalhar a preservação da natureza desde a infância, a fim de construir um caráter consciente. Foi possível notar envolvimento com o tema, através das falas e atitudes colhidas durante a prática do projeto. **Conclusão:** As aulas práticas são grandes ferramentas de construção para a educação ambiental, pois favorecem reflexões sobre as consequências das atitudes do homem ao meio ambiente. O professor deve utilizar estratégias pedagógicas para impactar e despertar o interesse dos alunos sobre preservação do meio ambiente, pois estas auxiliam na formação de um caráter responsável tornando-o um cidadão crítico e engajado nas causas ambientais.

**Palavras chaves:** educação ambiental; práticas; sustentabilidade.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## OS DESAFIOS PARA ENSINO DE CIÊNCIAS NO ATUAL CONTEXTO EDUCACIONAL BRASILEIRO

Fabíola Cardoso da Silva<sup>1</sup>; Gabriela Drost<sup>2</sup>; Thaís Nascimento<sup>3</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>4</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>5</sup>

<sup>1 2 3</sup> Acadêmicas de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>4</sup> Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>5</sup> Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A educação brasileira está em constante transformação e neste contexto se faz necessário um ensino científico de qualidade que problematize diferentes visões na ciência. Este ensino está cada vez dificultado nas escolas, e o aluno passou a ser observado muito mais do que um ouvinte, e passou a construir seus próprios conhecimentos. Entretanto, existem dificuldades como falta de recursos para projetos interdisciplinares e salas de aulas superlotadas. Muitos docentes têm dificuldades para discutir assuntos referentes às ciências. **Objetivo:** Identificar na literatura científica os desafios para o ensino de ciências considerando o contexto educacional brasileiro. **Material e Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, encontrados na base de dados CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) utilizando os critérios de inclusão: artigos em português e em espanhol relacionados a temática abordada com os descritores: ensino, ensino de ciências e educação, publicados no ano de 2007 a 2017. Essa busca compreendeu um total de 11 artigos. Utilizando os critérios de busca, foi descartado 01 trabalho que não se enquadrava, resultando um conjunto que foi analisado em sua íntegra na relação com os descritores. **Resultados:** Foi apontado que alguns professores do ensino básico estão indo para às salas de aula sem de fato se aprofundarem no ensino de ciências. Professores sem pensamento crítico, com metodologias de ensino insuficientes, por problemas na formação acadêmica, ficam desestruturados e os com dificuldades escolherem materiais didáticos de qualidade para trabalhar com seus alunos, tendo dificuldades em sair do teórico para a prática. **Conclusão:** Neste estudo foi possível observar que existem muitos desafios para o ensino de ciências na educação básica. Na educação sempre há necessidade de renovação e busca pela ciência, cabe ao docente se disponibilizar a buscar tais resultados para suprir a falta da aprendizagem significativa em seus alunos.

**Palavras-chave:** educação; ensino; ensino de ciências.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## CONFEÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS DA CLIVAGEM DO ZIGOTO PARA O ENSINO DE EMBRIOLOGIA HUMANA

Larissa de Souza Brianezi<sup>1</sup>; Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida<sup>1</sup>; Celso Vitor Alves Queiroz Calomeno<sup>2</sup>; Anne Caroline Santa Rosa<sup>3</sup>; Ana Paula Faquinette<sup>2</sup>; Yasmim Namie Tanoue<sup>2</sup>; Letícia Alexandrino Barilli<sup>1</sup>; Larissa Carla Lauer Schneider<sup>4</sup>; Luzmarina Hernandes<sup>4</sup>; Fernanda Losi Alves de Almeida<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

**Introdução:** Uma das dificuldades no ensino da embriologia humana é a restrição de peças reais para observação pelos alunos, limitando seu estudo ao conteúdo teórico com imagens ilustrativas. A dificuldade em compreender os eventos dinâmicos do desenvolvimento embrionário por uma abordagem apenas teórica é notória. **Objetivo:** Devido à escassez de modelos didáticos para o ensino de embriologia, o objetivo desse trabalho foi elaborar maquetes das etapas da clivagem do zigoto humano de forma a facilitar a compreensão desse tema. **Material e métodos:** As maquetes foram confeccionadas com auxílio de estudo teórico e revisão da literatura do ensino de embriologia. Os modelos didáticos foram elaborados de forma que as estruturas participantes do desenvolvimento embrionário fossem fiéis à realidade, com intuito de relacioná-las às explicações teóricas. Utilizou-se materiais de fácil acesso, como bolas de isopor de diferentes tamanhos, folhas coloridas de EVA, tinta e biscoito para representar cortes transversais do embrião em diferentes etapas da clivagem. **Resultados:** Foram confeccionadas maquetes dos seguintes estágios embrionários: zigoto na primeira clivagem, estágio de dois, quatro e oito blastômeros, mórula e blastocisto tardio. Essas maquetes representaram características importantes de cada estágio embrionário, como a diminuição no tamanho dos blastômeros a cada divisão celular, a permanência temporária da zona pelúcida e manutenção do volume constante do embrião. Os modelos confeccionados foram validados pelas orientadoras do trabalho, os quais mostraram-se aptos para serem aplicados em sala de aula. **Conclusão:** As maquetes produzidas para ilustrar as etapas da clivagem do zigoto humano atenderam à proposta de um material didático mais interativo, permitindo uma melhor visualização tridimensional das estruturas embrionárias e manipulação pelos alunos. Esse material poderá ser utilizado na disciplina de embriologia humana como ferramenta auxiliar no processo de ensino-aprendizagem dos alunos de graduação.

**Palavras-chave:** didática; embrião humano; segmentação.

**Financiador:** Liga Acadêmica de Embriologia Humana (LAEGH)

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA MONITORIA DE HISTOLOGIA NO PROCESSO DE ENSINO-APRENDIZAGEM DA EDUCAÇÃO BÁSICA: UM RELATO DE EXPERIÊNCIA

Paulo Daniel Maria<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Anna Rebeka Oliveira<sup>2</sup>; Brenda Melissa Barros Mota<sup>3</sup>; Waylla Albuquerque de Jesus<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup> Enfermeira, Mestranda – Programa de pós-graduação em biopatologia – Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup> Enfermeira pela Faculdade Adventista Paranaense

<sup>4</sup> Biomédica, Mestranda – Biociências e fisiopatologia – Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR – Docente – Laboratórios de Bioquímica e Ciências Biológicas e do Laboratório de Ciências Morfológicas, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Nas últimas décadas o ensino de biologia vem sendo marcado por uma divisão das aulas em teóricas e práticas, sem associá-las. Com o intuito de aproximá-las, foi realizada aulas monitoradas de alunos do ensino médio (EM) no laboratório de enfermagem, usando peças plásticas e o estudo de casos envolvendo a temática. **Objetivo:** Relatar a experiência de ensino-aprendizagem de monitorias do laboratório de ciências morfológicas, do curso de graduação em enfermagem, de uma faculdade privada da região de Maringá, com alunos do EM de uma escola particular. **Método:** Trata-se de um relato descritivo, exploratório e de caráter qualitativo, das aulas e práticas realizadas no período de julho a novembro de 2017. O estudo ocorreu no laboratório de ciências morfológicas da faculdade adventista paranaense, na qual foram indicados pelo professor 9 discentes da disciplina de biologia do EM, com anuência e presença do professor da disciplina, relacionados aos aspectos histológicos do do corpo humano. **Resultados:** As avaliações coletadas permitiram perceber a melhoria na argumentação dos discentes no que se refere às estruturas histológicas em situações problemas, e sua correlação com o processo ensino e aprendizagem das principais doenças relativas ao conteúdo. A monitoria buscou estabelecer uma relação entre o aluno e uma forma interdisciplinar de aprender, utilizando metodologias ativas de aprendizagem. **Conclusão:** A monitoria proporcionou aos alunos uma vivência e manuseio de instrumentos, que lhes permitiu conhecer com maior abrangência as áreas das ciências biológicas. Ao ser combinado o modelo de práticas expositivas com outras práticas recreativas, as mesmas ofereceram um melhor aproveitamento na aprendizagem dos conceitos durante o processo de ensino do laboratório, ampliando o aprendizado e proporcionando novas formas de ensino, buscando na resolução de problemas uma forma ativa de aprendizagem.

**Palavras-chave:** prática interdisciplinar; laboratório; educação.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências



## REFLEXÕES ACERCA DOS DESAFIOS DO ENSINO DE CIÊNCIAS PARA EDUCAÇÃO DOS SURDOS

Regina dos Santos Moura<sup>1</sup>; Kelly Christian Reis Nicolau<sup>1</sup>; Thaís Nascimento<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicas de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** As temáticas de deficiência e inclusão são assuntos ativos no discurso político, educacional e midiático. O educador encontra muitas dificuldades com o aluno com necessidades educacionais especiais. O grupo dos surdos é um desses, que se distingue por um linguajar específico (gesto-visual), linguagem que impacta na formação dos professores. **Objetivo:** Identificar na literatura científica os desafios para o ensino de ciências na educação de surdos e estratégias utilizadas. **Material e Método:** Trata-se de uma revisão sistemática, utilizando como critério de inclusão artigos em português relacionados à temática abordada, publicados no ano de 2015 a 2019, com os descritores: ensino de ciências, educação inclusiva e educação de surdos, encontrados nas bases de dados SciElo e no portal de periódicos da CAPES. Essa busca compreendeu um total de 38 artigos. Utilizando os critérios de busca, foram descartados 28 trabalhos que não se enquadraram, resultando um conjunto que foi analisado em sua íntegra na relação com os descritores. **Resultados:** Os professores precisam ampliar seus conhecimentos sobre a educação de pessoas com deficiência, em especial os surdos. O ensino de ciências auxilia no entendimento do funcionamento do mecanismo da audição proporcionando sua compreensão, contribuindo para uma assistência humanizada, fornecendo fundamentação para uma educação de qualidade e respeito a todos. É significativo que o docente utilize as novas formas e técnicas pedagógicas ao ensiná-los, percebendo a necessidade do educando e de que maneira ele aprende. A escola precisa se adequar a essa realidade, fornecendo o acompanhamento de um intérprete para o ambiente escolar. **Conclusão:** Inferimos que há falta de profissionais capacitados para receber esses educandos, notou-se também a falta de estudo na área de educação especial e ciências, sobretudo aos deficientes auditivos. O professor de ciências e o intérprete precisam elaborar um plano de aula juntos, planejamento esse que atenda às necessidades desses estudantes.

**Palavras-chave:** ensino de ciências; educação inclusiva; educação de surdos.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## CONTRIBUIÇÕES DO ENSINO DE CIÊNCIAS NA EDUCAÇÃO INFANTIL PARA O DESENVOLVIMENTO DA CIDADANIA

Thais Nascimento Pereira<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Reginéa Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Na Educação Infantil é possível compreender os conceitos básicos que embasam a sociedade tecnológica, sendo estes aprofundados nos anos seguintes. O ensino de ciências contribui ao cidadão tornando-o participante da sociedade na medida que o faz compreender os fenômenos naturais de maneira coerente com a realidade que o cerca, participando da vida em sociedade. Por isso a grande necessidade deste assunto ser trabalhado nos anos iniciais, para que essa concepção seja construída de forma sólida. **Objetivo:** Identificar as influências do ensino de ciências na educação infantil e as contribuições para o desenvolvimento da cidadania do indivíduo. **Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática, utilizando como critérios de inclusão artigos em português relacionados a temática abordada, com os descritores: ensino, ciências, Educação Infantil; publicados no ano de 2011 a 2018, encontrados na bases de dados Scielo (Scientific Electronic Library Online) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa Nível Superior). Essa busca compreendeu um total de 496 artigos. Utilizando os critérios de busca, foram descartados 482 trabalhos que não se enquadraram, resultando um conjunto que foi analisado em sua íntegra na relação com os descritores. **Resultados:** Os artigos selecionados foram discutidos, podendo constatar que o ensino de ciências contribui para a cidadania, porém os professores da educação infantil precisam capacitar essas habilidades para se obter um melhor desempenho dos alunos. **Conclusão:** Este estudo permitiu observar que para desenvolver a cidadania é preciso haver participação da escola e em seguida do educador, pois estes devem desenvolver nas crianças a cidadania através do ensino de ciências utilizando a interdisciplinaridade. Entendendo a necessidade de ensinar de forma significativa, várias metodologias foram apresentadas para que essa aprendizagem aconteça. Ao proporcionar a compreensão em ciências o aluno pode se tornar um ser com pensamento crítico diante da sociedade, podendo participar de forma ativa no ambiente em que vive.

**Palavras-chave:** cidadania; ciências; educação infantil.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências

## METODOLOGIAS ATIVAS NO ENSINO DE CIÊNCIAS: UMA ABORDAGEM TEÓRICA

Zilma Maria Araújo Moraes<sup>1</sup>; Franciely Machado da Silva<sup>1</sup>; Josselyn Lilybeth Solorzano Napa<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicas de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** As metodologias ativas constituem um modelo de ensino que busca desenvolver no estudante a autonomia, destacando o seu papel protagonista no processo de aprendizagem. Além de contribuir para um rompimento no modelo tradicional de ensino, incentiva o aluno a criar novas ideias e ressignificar os conhecimentos adquiridos. **Objetivo:** Refletir sobre as contribuições das metodologias ativas para o ensino de ciências na educação básica. **Método:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, utilizando como critérios de inclusão artigos em língua portuguesa e que abordassem os descritores: metodologias ativas, educação e ciências; publicados no período de 2010 a 2018, nas bases de dados SCIELO, no portal de periódicos da CAPES, RCAAP e B-On (Biblioteca do Conhecimento Online). Essa busca compreendeu um total de 25 artigos. Nos quais foram descartados 15 trabalhos que não se enquadraram, resultando um conjunto que foi analisado em sua íntegra na relação com os descritores. **Resultados:** Foi possível identificar que as metodologias ativas estão se destacando dentro da educação, em todas as suas áreas, especialmente na área de ciências por estar ligada a tecnologia, e devido a abrangência e flexibilidade que propõe. É preciso capacitar a equipe pedagógica para o uso dessa metodologia, pois a teoria não tem poder de transformação em si mesma, a menos que seja compreendida e colocada em prática. Ao serem utilizadas como estratégia para ensinar ciências, deve contemplar projetos e ações, que estimulem o aluno a envolver-se no aprendizado e seja produtor “ativo” dos seus novos saberes. **Conclusão:** Neste estudo foi possível inferir que o professor tem um papel primordial na reorganização dos conhecimentos, bem como necessidade de acesso a novas formas de aplicação, para que possa gerenciar a sala de aula de forma interdisciplinar. Torna-se necessário a capacitação dos profissionais da educação para que esse trabalho seja realizado de forma efetiva.

**Palavras-chave:** metodologias ativas; educação; ciências.

**Área temática:** Educação em Saúde e Ciências



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Patologia

## ESTABELECIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DO 7,2-DIMETILBEZENTRACENO UTILIZANDO A TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Maria Clara Splendor<sup>1</sup>; João Paulo Salvaterra Pasquini<sup>2</sup>; Tania Cristina Alexandrino Becker<sup>3</sup>; Alice Maria de Souza-Kaneshima<sup>4</sup>; Edilson Nobuyoshi Kaneshima<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é amplamente utilizado em experimentos relacionados com a carcinogênese mamária. **Objetivo:** Estabelecer um modelo experimental baseado na técnica da RT-qPCR para avaliação da expressão gênica de genes relacionados com a carcinogênese. **Material e métodos:** 21 ratas *Wistar* com 50 dias de idade foram divididas em dois grupos e tratadas com dose única de 65 mg/Kg de DMBA diluído em 1 mL de óleo de milho (grupo teste) ou 1mL de óleo de milho (grupo controle). As ratas foram eutanasiadas após 140 dias e o RNA do tecido mamário foi extraído através de lise com Trizol. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado e a técnica RT-qPCR foi utilizada para determinar a expressão gênica de seis genes envolvidos na carcinogênese mamária. O software do equipamento StepOne™ Real Time PCR System atribuiu o valor de Quantificação Relativa (QR) igual a 1,0 para todos os genes avaliados no grupo controle. Os valores de QR das amostras do grupo teste podem ser menor ou maior do que 1,0; representando aumento ou diminuição da expressão gênica dos genes avaliados. **Resultados:** Não houve diferenças significativas na avaliação ponderal dos dois grupos avaliados, nem foram observadas massas tumorais palpáveis. No entanto, os genes *AR*, *MAPK1*, *MAPK3* e *PGK1* apresentaram valores de QR entre 8,2 e 16,7 enquanto os genes *CTNNB1* e *CDH1* apresentaram valores de 62,6 e 67,3 respectivamente. **Conclusão:** Apesar da não formação de massas tumorais palpáveis, os resultados obtidos demonstram que o DMBA foi capaz de induzir a carcinogênese mamária, tendo em vista que houve alteração na expressão de genes relacionados com o processo de proliferação e diferenciação celular, abrindo perspectivas para a avaliação de grupos de animais tratados com drogas antineoplásicas ou com extrato bruto de plantas com possível potencial anticâncer.

**Palavras-chave:** DMBA; RT-qPCR; câncer de mama.

**Financiador:** CAPES

**Área temática:** Patologia





International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Saúde coletiva

## DIFERENÇAS RACIAIS NA TAXA DE MORTALIDADE POR CÂNCER COLORRETAL NAS REGIÕES DO BRASIL, PERÍODO 2012 A 2016

Aline Amenencia de Souza<sup>1</sup>; Amanda Caroline Trassi Conteçotto<sup>2</sup>; Jéssica Cristina Zoratto Romoli<sup>3</sup>; Danielle Hoeltgebaum<sup>3</sup>; Daniel Augusto Nunes de Lima<sup>1</sup>; Denise Tiemi Uchida<sup>1</sup>; Raissa Bocchi Pedroso<sup>4</sup>; Miguel Machinski Junior<sup>5</sup>; Ana Carolina Jacinto Alarcão<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências do Alimento, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmicas de Pós-graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Pós-doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente-Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Pós-doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá e Coordenadora associada do Departamento de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Câncer Colorretal (CCR) geralmente é associado a fatores de riscos como: *status* socioeconômico e padrão alimentar. Vários países registraram altas taxas de mortalidade de CCR para a população negra, devido ao acesso dificultado aos serviços de saúde. **Objetivo:** Analisar a taxa de mortalidade de CCR por raça e sexo no Brasil em 5 anos. **Material e métodos:** Os dados óbitos foram extraídos do Departamento de Informática do SUS, entre os anos de 2012 a 2016 por região, sexo e raça (brancos e negros). Os dados populacionais foram cedidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e a taxa de morte calculada, foi analisada através de gráficos e tabelas gerados pelo Excel (Microsoft®). **Resultados:** Maiores taxas de mortalidade por CCR foram registradas no Sul e Sudeste do Brasil. Pessoas negras apresentaram menores números e taxas de morte em todas as regiões analisadas, enquanto a população branca apresentou altos números e taxas de morte para esse câncer. Embora negros predomine na composição da população brasileira e entre os usuários do SUS, estes ainda apresentam os piores indicadores sociais e de saúde. As divergências de CCR entre raças/cor de pele encontradas no presente estudo podem ser devido ao fato da população negra não acompanhar a mesma transição socioeconômica que a população branca vem desenvolvendo nos últimos anos no Brasil, sendo assim ficando menos expostos aos fatores de risco deste câncer, já que é pouco provável que essa diferença seja movida por um fator genético. **Conclusão:** Em vários países as disparidades de CCR entre raças estão sendo atribuídas as diferenças socioeconômicas, enquanto em países desenvolvidos, os negros apresentam maiores taxas de morte devido a diferenças ao acesso a serviços de saúde. No Brasil foi demonstrado menores taxas, presumivelmente pela desigualdade socioeconômica prevalente aqui, diminuindo a exposição aos fatores de risco relacionados ao CCR.

**Palavras-chave:** câncer colorretal; taxa de mortalidade; promoção em saúde.

**Área temática:** Saúde coletiva

## AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS PRÉ ESCOLARES DE UM CENTRO MUNICIPAL DE EDUCAÇÃO INFANTIL DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ-PR, BRASIL

Amanda Caroline Trassi Conteçotto<sup>1</sup>; Aline Amenencia de Souza<sup>2</sup>; Giseli Cristina Pante<sup>3</sup>; Juliana Cristina Castro<sup>4</sup>; Renata Sano Lini<sup>5</sup>; Deborah Thais Palma Scanferla<sup>5</sup>; Danielle Hoeltgebaum<sup>6</sup>; Raul Gomes Aguera<sup>5</sup>; Jéssica Cristina Zoratto Romoli<sup>6</sup>; Miguel Machinski Junior<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Mestrado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-graduação (Doutorado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Pós-doutoranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Acadêmicas de Pós-graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Docente - Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** No Brasil, atualmente há uma prevalência de obesidade, responsável pelo aumento de morbidades associadas. Na fase da infância, a obesidade torna-se cada vez mais comum, portanto, conhecer e monitorar o estado nutricional na infância farão com que as doenças associadas à obesidade que é um dos quadros preocupantes na adolescência possam ser evitadas futuramente. **Objetivo:** Avaliar o estado nutricional de crianças pré-escolares em um Centro Municipal de Educação Infantil no município de Maringá, Brasil. **Material e métodos:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá com o número de parecer 3.397.462, trata-se de uma pesquisa transversal com 131 crianças com idade entre 0 a 5 anos de um Centro de Educação Municipal Infantil. Dados como peso e altura foram coletados por nutricionistas treinadas, e a partir deles foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC), dividindo o peso em quilogramas (kg) pela estatura em metro (m<sup>2</sup>) resultando em um valor expresso em kg/m<sup>2</sup>. Para o diagnóstico do estado nutricional, as crianças foram classificadas conforme o índice IMC/I, encontrado na tabela de Escore-Z da Organização Mundial da Saúde. **Resultados:** Das crianças autorizadas 23, (17,55%) estavam ausentes no período de avaliação nutricional, 8 (6,10%) encontravam-se com excesso de IMC para idade, 70 (53,43%) encontravam-se com IMC adequado para a idade, 15 (11,45%) encontravam-se com vigilância para baixo IMC por idade e 15 (11,45%) encontravam-se com vigilância para IMC elevado por idade. **Conclusão:** Conclui-se que a maior parte dos avaliados apresentaram IMC adequado para a idade, destaca-se o alto percentual de indivíduos com vigilância para baixo IMC por idade e vigilância para elevado IMC por idade, sendo sugestivo implementar ações como palestras para crianças e pais, folhetos informativos, incentivos de introdução à alimentação saudável, entre outros, para a prevenção deste quadro.

**Palavras-chave:** avaliação nutricional; pré-escolares; obesidade.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## CUIDADOS DE ENFERMAGEM A PACIENTES COM HEMOFILIA

Ana Claudia Rodrigues Ferreira<sup>1</sup>; Suellen Dias Fernandes<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos da Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A hemofilia é uma doença hereditária relacionada ao cromossomo X, que dificulta a coagulação sanguínea, dificultando a hemostasia circulatória. A vida de pacientes hemofílicos é limitada a certas atividades e em constante observação, pois havendo sangramento inesperado, é preciso saber lidar com a intercorrência. **Objetivo:** Identificar a vivência do portador de hemofilia e o cuidado da enfermagem perante a doença. **Método:** Trata-se de uma revisão sistemática, utilizando como critério de inclusão artigos em português, que não fossem teses ou monografias, e serem publicados entre 2008 a 2018, encontrados na base de dados Scielo (Scientific Electronic Library Online). Utilizou-se as palavras chaves do MeSH terms: 'hemofilia', 'cuidados de enfermagem' e 'qualidade de vida' **Resultados:** Os artigos selecionados formaram duas categorias: *A vivência do portador de Hemofilia* e *O cuidado da enfermagem perante o portador de Hemofilia*. A primeira apresenta o portador com o sentimento de vulnerabilidade devido a situação que enfrenta, convivendo com o sentimento de impotência e sensação de uma vida anormal. Algo desconfortável é relativo aos familiares por sua superproteção. Percebeu-se um relacionamento interpessoal prejudicado, pela falta de orientação da sociedade que interfere de forma negativa na adaptação do portador. A segunda revela que apesar dos avanços tecnológicos nas áreas da saúde, ainda se tem um número reduzido de profissionais capacitados para exercer diagnóstico e cuidados ao paciente. A enfermagem não deve romper com técnicas e procedimentos apenas, mas deve auxiliar o paciente a ressignificar a vida, a ter controle sobre suas atividades e enxergar a vida de forma positiva. **Conclusão:** O estilo de vida de um hemofílico o leva a um sentimento de impotência pela dependência familiar e por estar exposto a situações inesperadas. O enfermeiro deve agir no fortalecimento de estratégias que auxiliem o paciente a aprender a viver de forma plena, apesar da doença debilitante.

**Palavras-chave:** hemofilia; cuidados de enfermagem; qualidade de vida.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## SAÚDE PREVENTIVA COM ENFOQUE NA IMUNIZAÇÃO: UM OLHAR DA ENFERMAGEM

Camila Cagnam de Oliveira<sup>1</sup>; Gabrielle Palma Feifer<sup>1</sup>; Anna Rebeka Oliveira Ferreira<sup>2</sup>;  
Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Imunização é um conjunto de ações para a resistência do organismo a doenças. Essas práticas são realizadas com antibióticos, vacinas e mudança nos determinantes sociais. O Programa de Nacional de Imunização possui metas que envolvem a erradicação de doenças como o sarampo e o tétano, além de controlar doenças imunopreveníveis e a poliomielite. **Objetivo:** Identificar a relação da vacinação com os cuidados de enfermagem, analisando as causas do déficit na adesão a vacinação, estratégias de incentivo à vacinação e os cuidados de enfermagem durante e após a vacinação. **Materiais e métodos:** Trata-se de um estudo qualitativo, descritivo e exploratório, de revisão sistemática. Realizado levantamento de dados através de artigos científicos nas bases de dados BVS (Biblioteca Virtual de Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Foram selecionadas 438 publicações entre os anos 2008 a 2018. Os seguintes critérios foram seguidos: Temática, publicados em língua portuguesa e disponíveis completos, sendo assim, 16 artigos inclusos. **Resultados:** Estão apresentados em 3 categorias: *motivos que levam a insuficiente adesão da vacinação, estratégias de incentivo e cuidados de enfermagem nesta situação*. A dor provocada pela agulha, medo das reações adversas, traumas de eventos pós-vacina, são os motivos mais comuns para a falta de adesão, sendo remediado por ações como o brinquedo terapêutico, campanhas nacionais de vacinação, ações de vacinação em áreas descobertas e ações da enfermagem na orientação ao paciente sobre a constituição da vacina, seu mecanismo de ação, capacitação dos trabalhadores e atenção aos eventos adversos. **Conclusão:** Para que todas essas ações ocorram, necessita-se de material científico para a capacitação dos profissionais envolvidos. Mesmo na graduação, os profissionais devem se empenhar em pesquisa sobre a temática e produzirem materiais de estudo e atualização para nortear seu saber científico na assistência.

**Palavras-chave:** vacinação; enfermagem; programa de imunização.

**Área temática:** Saúde Coletiva



## RELAÇÕES ENTRE ESTILO DE VIDA E CASOS DE SÍNDROME METABÓLICA

Camilla Jadi dos Santos<sup>1</sup>; Thawany Farias Soares<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Gabrielle Palma Feifer<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A síndrome metabólica (SM) é definida como um grupo de fatores de risco inter-relacionados de origem metabólica, cuja característica principal é a resistência à insulina. Contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, sendo um agravo que impacta substancialmente a população, sua porcentagem na população brasileira varia de 12,4% a 28,5% em homens e de 10,7% a 40,5% em mulheres. A síndrome está relacionada com a alimentação rica em carboidratos e gorduras saturadas, lipodistrofia, obesidade e hábitos de vida incorretos. **Objetivo:** Identificar na literatura a associação entre os hábitos de vida com a SM. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo qualitativo, com caráter descritivo exploratório, do tipo revisão sistemática da literatura. Realizado um levantamento de dados através de artigos científicos encontrados nas seguintes bases de dados Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), com os descritores 'síndrome metabólica', 'alimentação' e 'estilo de vida' do MeSH. Os critérios de inclusão aplicados foram: artigos originais publicados no período de 2011 a 2017 com resumos e textos completos disponíveis no idioma português, realizados no Brasil e que estejam relacionados com a temática. **Resultados:** Foram identificadas relações de uma alimentação com grande ingestão de alimentos refinados, rico em gorduras, carnes vermelhas e bebida alcoólica, associado à alterações bioquímicas desenvolvidas na SM e a prática da atividade física como contribuinte na diminuição de aportes calóricos, favorecendo com a redução dos fatores de risco como o acúmulo de gordura na região abdominal e controle da pressão arterial. **Conclusão:** Foi possível analisar que o comportamento alimentar indevido e um estilo de vida sedentário são fatores desencadeantes da síndrome metabólica, sendo necessário práticas de promoção de saúde para a mudança nos hábitos de vida da população.

**Palavras-chave:** síndrome metabólica; alimentação; estilo de vida.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## CUIDADOS DE ENFERMAGEM NA MELHORIA DA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM NEOPLASIA MAMÁRIA

Carine Correia Deucher<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>; Gabrielle Palma Feifer<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** O câncer de mama é um dos tipos dos cânceres mais prevalentes entre as mulheres no Brasil, correspondendo a cerca de 29% dos casos novos a cada ano. O enfrentamento pessoal e familiar ao câncer de mama é único, possibilitando à enfermagem promover um cuidado integral, compreendendo a subjetividade do sujeito. **Objetivo:** Identificar na literatura os cuidados de enfermagem a pacientes com neoplasia mamária. **Material e métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática, a busca ocorreu nas bases de dados da SciELO (Scientific Electronic Library Online) e Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Os critérios de inclusão foram: artigos dos períodos de 2010 à 2018, textos completos em português e relacionados com a temática. Utilizou-se as palavras-chaves: 'câncer de mama', 'enfermagem' e 'cuidado'. **Resultados:** Pode-se notar que o sentimento de dor vivenciado pelo paciente vai além da dor física, sendo também psicológica, social e espiritual. A questão emocional é considerada um dos maiores desafios frente a doença, pois está totalmente envolta na forma de enfrentamento do indivíduo, refletindo em seu processo de reabilitação. A assistência da enfermagem aos pacientes com neoplasia mamária, tem se mostrado relevante por auxiliar os pacientes e familiares a encontrarem o equilíbrio relacionados ao seu enfrentamento e existência. **Conclusão:** Foi possível compreender que a enfermagem cuida dos aspectos biológicos dos pacientes com neoplasia mamária, porém também devem se atentar a realizar orientação, promoção de saúde, incentivar os indivíduos ao empoderamento, contribuindo com a melhoria da relação do coletivo com a saúde.

**Palavras-chave:** câncer de mama; enfermagem; cuidado.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ATUAÇÃO DO ENFERMEIRO NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE INFANTIL

Gabrielle Palma Feifer<sup>1</sup>; Erismilda Da Silva Pinheiro<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Paulo Daniel Maria<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup> Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal. Cerca de 18 milhões de pessoas estão em condição de obesidade no Brasil. A obesidade infantil representa um problema de saúde pública, gerando um conjunto de alterações que impactam o modo de vida da criança. O enfermeiro, como agente promotor de saúde deve orientar quanto a prevenção deste agravo. **Objetivo:** O objetivo dessa pesquisa é identificar a atuação do enfermeiro na prevenção da obesidade infantil. **Material e métodos:** Trata-se de uma revisão integrativa da literatura. A busca ocorreu no mês de fevereiro a junho de 2019 nas bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), utilizando as palavras-chave: obesidade; cuidados de enfermagem; educação. Foram selecionados 23 (BVS) e 52 (CAPES), dos quais 10 corresponderam a questão norteadora e, dessa forma construíram a amostra final. **Resultados:** a discussão ocorreu em 2 categorias: *Causas e consequências da obesidade infantil* e *Ações do enfermeiro na prevenção da obesidade*. Foi possível constatar a relação da obesidade infantil com fatores genéticos, ambientais, psicológicos, além do sedentarismo e mudanças de hábitos, determinadas pelo meio social, econômico e cultural em que a criança está inserida. O enfermeiro atua fortemente na promoção da saúde, criando estratégias para atuar no período de desenvolvimento da criança desde a gestação. **Conclusão:** A ingestão indevida de alimentos ricos em carboidratos, aliados ao sedentarismo e os fatores psicológicos estão fortemente ligados à obesidade infantil. O enfermeiro necessita realizar uma assistência observando as características culturais, econômicas que influenciam a comunidade a viverem um estilo de vida inadequado, promovendo a saúde e prevenindo doenças.

**Palavras-chave:** obesidade; cuidados de enfermagem; educação.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## TESTAGEM RÁPIDA DE HIV E SÍFILIS NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE DO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE-RS

Isis Aleixo Barone Esquiçati<sup>1</sup>; Daila Alena Raenck Da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Residente de Residência Multiprofissional em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS

<sup>2</sup>Preceptora de Residência Multiprofissional em Saúde Coletiva, Prefeitura Municipal de Porto Alegre/RS

**Introdução:** O Rio Grande do Sul possui a maior incidência de casos de AIDS, sendo que o município Porto Alegre apresenta a maior incidência da doença dentre as capitais do país. O Ministério da Saúde passa a utilizar o Teste Rápido (TR) como alternativa de diagnóstico seguindo as diretrizes do Sistema Único de Saúde para a ampliação do acesso resolutivo do HIV, sífilis e Hepatite B e C. **Objetivo:** O estudo avaliou como encontra-se o processo de descentralização do diagnóstico por TR e descreveu as características dos usuários que buscam a testagem rápida na Gerência Distrital Saúde Centro. **Material e métodos:** O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Possui abordagem quantitativa, retrospectivo e transversal. A amostra incluiu todos os usuários que buscaram TR nas Unidades de Saúde da Atenção Primária no período de janeiro a dezembro de 2017. **Resultados:** Amostra foi composta por 1588 usuários. O predomínio dos usuários é de mulheres, idade média de 33 anos, brancos, escolaridade predominante sendo ensino fundamental incompleto, sendo 21,4% gestantes. 266(16,8%) apresentam-se em situação de rua. Referente aos TR, 111(7,0%) foram reagentes para HIV, 211(13,3%) sífilis reagente, 07 (0,4%) hepatite B reagente e 21(1,3%) hepatite C reagente. 54(3,4%) dos indivíduos reagentes para HIV receberam solicitação de exames complementares e 158(9,9%) com exames de sífilis reagente foram solicitados exames confirmatórios. A equipe do Consultório na rua apresentou a maior quantidade de testes realizados 277(17,4). Apenas uma unidade possui atendimentos por demanda espontânea. **Conclusão:** As características da população em estudo são de jovens, brancos, ensino fundamental incompleto e mulheres. A equipe do Consultório na rua apresentou maior número de TR devido ao incentivo de atendimento à população mais vulnerável. A maioria das unidades realizam atendimentos mediante agendamentos, o que afeta a descentralização do diagnóstico.

**Palavras-chave:** teste rápido; HIV; SUS.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ATUAÇÃO DO ENFERMEIRO NA ASSISTÊNCIA DO PACIENTE COM SÍNDROME DE DOWN

Karinne Lauany de Arruda do Rosário<sup>1</sup>; Camila Cagnan de Oliveira<sup>1</sup>; Larissa Barbosa Pascoto<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

**Introdução:** A síndrome de Down é uma alteração genética do cromossomo 21 afetando o desenvolvimento do feto, alterando sistemas do corpo, e obtendo alterações em características físicas, cognitivas e fisiológicas. Com prevalência de 1,13/1000 nascidos vivos, o diagnóstico sendo realizado durante a gestação através de amniocentese, sendo possível iniciar o tratamento para amenizar os agravos motores e cognitivos. O auxílio da enfermagem à família é de extrema importância, com orientações sobre as limitações, e possibilidades e necessidades do cuidado com o paciente. **Objetivo:** Descrever o papel do enfermeiro no cuidar de indivíduos com síndrome de Down. **Método:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, utilizando 10 artigos como critério de inclusão, artigos originais publicados no período de 2014 a 2019, com resumos e textos completos disponíveis no idioma em português, encontrados nas bases de dados da SciELO (Scientific Electronic Library Online), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). **Resultados:** Identificou-se que o paciente com Down possui necessidades específicas, e por isso, a vida deste pode ser imersa em situações de sofrimento constantes, sobretudo o psíquico. Nesse sentido, a atuação do enfermeiro enquanto aconselhador em saúde, pode ser positiva, favorecendo melhor aceitação pessoal, auxiliando a lidar com necessidades específicas e oferecendo o suporte ainda para a família. **Conclusão:** Inferimos que há necessidades de estratégias que devam ser desenvolvidas a partir de dados levantados em pesquisas de campo, para que assim seja proporcionado um programa/ estilo para a vida do paciente. O cuidado de enfermagem precisa ser acompanhado de estudo das situações genéticas do paciente e de seu esclarecimento juntos aos membros da família. Ressalta-se a necessidade da equipe multidisciplinar para a assistência aconteça, e que os profissionais atendam de forma segura, ética e humanizada às situações cotidianas e inerentes a condição do paciente.

**Palavras-chaves:** síndrome de Down; cuidados de enfermagem; relações familiares.

**Área temática:** Saúde Coletiva



## VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E EDUCAÇÃO EM SAÚDE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM ÁREA ENDÊMICA DE MARINGÁ-PR, 2018-2019

Karla Larissa Trassi Ganaza<sup>1</sup>, Mariana Zanin<sup>2</sup>, Aline Ávila Brustolin<sup>3</sup>, Izabel Galhardo Demarchi<sup>4</sup>, Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é endêmica no noroeste do Paraná, sendo fundamental a vigilância epidemiológica da doença na região. **Objetivo:** Verificar o perfil epidemiológico da LTA em um bairro endêmico de Maringá-PR e promover a educação em saúde no local. **Material e métodos:** Este estudo foi desenvolvido entre agosto/2018 e julho/2019, no bairro Borba Gato. Foram incluídos no estudo residentes do bairro com e sem histórico da doença (Número do parecer COPEP/UEM: 2.609.591). Durante visitas domiciliares, foi aplicado um questionário e realizada a coleta de amostra de sangue dos participantes para realização do exame de imunofluorescência indireta (IFI) (positivo: título  $\geq$  a 40). Indivíduos com lesão ativa foram submetidos a realização do exame parasitológico direto (positivo: presença de formas amastigotas). **Resultados:** Dos 34 pacientes com histórico de LTA, sete ainda residiam no bairro e tiveram seu acompanhamento de saúde realizado. Destes, dois apresentaram título superior a 40 na IFI. Um total de 69 indivíduos sem histórico da doença participaram do estudo: um apresentou lesão cutânea e resultado dos exames parasitológico direto e IFI positivo, sendo encaminhado para realização do tratamento; dois apresentaram título igual a 40 sem possuir lesões ativas; 34 não apresentaram lesões cutâneas e tiveram sorologia negativa; e 32 pacientes estão sendo contactados para realização do exame. Foram distribuídos panfletos educativos sobre a LTA para a população do bairro. Um ciclo de palestras com profissionais da Unidade Básica de Saúde Iguazu, alunos e professores do Centro da Juventude foi realizado para conscientização acerca do modo de transmissão da LTA, fatores preditores e medidas preventivas. **Conclusão:** A LTA permanece endêmica no bairro Borba Gato, sendo necessária a vigilância epidemiológica da doença e o desenvolvimento de atividades de educação em saúde continuada para o alcance da redução do número de casos e do controle da doença na região.

**Palavras-chave:** leishmaniose tegumentar americana; vigilância epidemiológica; educação em saúde.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM AO PORTADOR DE FIBROSE CÍSTICA

Katriel de Lima Oliveira<sup>1</sup>; Beatriz Pereira<sup>1</sup>; Anna Rebeka Oliveira Ferreira<sup>2</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Enfermeira, Mestranda em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva e progressiva, caracterizada pelo acúmulo de muco nas vias aéreas, devido à alta concentração de proteínas. Tal característica torna o paciente propenso ao acúmulo de bactérias que, por sua vez, causam diversas infecções e consequentes danos aos pulmões. Desse modo torna-se fundamental a atuação de profissionais capacitados tornando o tratamento mais eficaz. **Objetivo:** Identificar na literatura publicada a atuação do enfermeiro na assistência ao portador da fibrose cística, relatando as principais estratégias para viabilizar a qualidade de vida do paciente e a importância do relacionamento no âmbito hospitalar. **Material e métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, utilizando como critérios de inclusão artigos científicos em português relacionados com a temática abordada, publicados no período de 2010 a 2018, encontrados nas bases de dados SCIELO (Scientific Electronic Library), PUBMED (National Library of Medicine), BVS (Biblioteca Virtual de Saúde) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), utilizando como descritores: assistência de enfermagem, fibrose cística e família. **Resultados:** Identificou-se que nem sempre os pacientes aderem ao tratamento e compete à equipe de enfermagem elaborar estratégias para proporcionar melhor aceitação da doença, controle eficaz dos sintomas e promover a interação dos familiares no processo do cuidado. A principal estratégia a ser considerada no enfrentamento da doença é a possibilidade de uma vida normal, que não circunde a enfermidade, mas que seja norteada para a vida. **Conclusão:** Pode-se perceber a necessidade de um cuidado multiprofissional, não apenas visualizando suas dimensões biológicas, mas sim à integralidade por meio do autocuidado. A qualidade da assistência oferecida pela equipe viabiliza grandemente o processo de enfrentamento da doença, sendo responsável por colocar em prática estratégias que melhorem o processo da hospitalização, visando uma experiência menos dolorosa.

**Palavras-chave:** assistência de enfermagem; fibrose cística; família.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## A INFLUÊNCIA DA EPIGENÉTICA NOS DISTÚRBIOS MENTAIS: REFLEXÕES SOBRE AS PRÁTICAS DE ASSISTÊNCIA EM SAÚDE

Kemily Fonseca Argilero<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Entender a etiologia genética dos distúrbios mentais é tarefa complexa, pois suas causas podem ser multifatoriais. A epigenética aparece como ferramenta para abordar a relação desses fatores, que podem ser desde o envolvimento de genes, até o estilo de vida e o ambiente a que se expõe. **Objetivo:** Descrever a relação da epigenética com distúrbios mentais, apontar estratégias e ações terapêuticas para os mesmos, por meio de publicações científicas. **Método:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, utilizando como critérios de inclusão artigos em português que tenham relação com a temática abordada, publicados entre os anos de 2012 a 2018, encontrados nas seguintes bases de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Base de Dados Latino-Americana de Informação Bibliográfica em Ciências da Saúde (LILACS). Para seleção dos artigos, definiram-se os seguintes descritores: 'epigenética', 'distúrbios mentais' e 'enfrentamento familiar', segundo os MeSH. **Resultados:** Através dos artigos selecionados foi possível notar que a etiologia dos distúrbios mentais é multifatorial e muitas vezes apresentam incertezas, porém existem diversos estudos para compreender melhor o assunto. Enquanto estes ocorrem, muitas famílias enfrentam mudanças de rotina na vida diária devido ao surgimento sem aviso prévio de um distúrbio mental, provocando a sobrecarga dos membros. Felizmente existem programas socioeducativos e de apoio ao familiar e paciente que estão passando por tais transições e desejam ajuda. **Conclusão:** Os estudos utilizados apontaram a relação multifatorial da doença, principalmente nas áreas de genética, neuroquímica e ambiental. Apesar dos programas de intervenção e auxílio, ainda há necessidade de expandir o assunto e a capacitação dos profissionais; levando em consideração que vem se tornando mais comum falar em doenças mentais, isso devido a muitos fatores, principalmente relacionado à junção da maior vulnerabilidade e falta de sentido de vida das pessoas com as mudanças ambientais e sociais.

**Palavras-chave:** epigenética; distúrbios mentais; enfrentamento familiar.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## CUIDADOS DA ENFERMAGEM NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE INFANTIL

Larissa Millnitz<sup>1</sup>; Fernanda Silva Ribeiro<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A prevalência da obesidade mundial aumentou de forma significativa. É um problema de saúde pública e de acompanhamento necessário dos profissionais de saúde. A enfermagem, enquanto mais próxima do paciente, atua nas ações de prevenção, detecção precoce e tratamento da obesidade infantil. **Objetivo:** Descrever os cuidados de enfermagem na prevenção da obesidade infantil. **Material e Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, realizada através da busca na biblioteca digital SciElo (Scientific Electronic Library Online) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com a associação dos descritores 'Obesidade Infantil', 'Prevenção' e 'Enfermagem'. Como critérios de inclusão foram aplicados: artigos que estivessem em português, que abordassem a temática pesquisada e fossem disponibilizados na íntegra. **Resultado:** Os periódicos foram lidos na íntegra, 15 artigos correspondiam aos critérios estabelecidos. Identificou-se que lidar com a problemática da obesidade infantil é tarefa que demanda múltiplas habilidades dos profissionais de saúde, bem como a associação com instituições parceiras que motivem o viver saudável e equipe multidisciplinar. Várias estratégias têm sido utilizadas para este fim, e tem se demonstrado serem positivas: como games, e a abordagem desse tema no ambiente escolar. A enfermagem deve estar atenta ao pré-natal, orientando os pais sobre a alimentação e os cuidados aos agentes gordurosos a que são expostos. Deve estar atenta no cuidado do binômio mãe/filho a fim de que se fale uma assistência completa. **Conclusão:** A enfermagem tem um importante papel na prevenção da obesidade infantil desde o período de gestação e seu cuidado se estende até o diagnóstico e tratamento do problema. O trabalho multiprofissional, compartilhando técnicas e métodos sob diferentes aspectos, pode contribuir para um resultado eficiente nesse cuidado. Por isso, equipe de enfermagem deve estar capacitada para que sejam a base de sua prática conquistando o empoderamento da profissão.

**Palavras-chave:** obesidade Infantil; prevenção; enfermagem em saúde comunitária.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ATUAÇÃO DO ENFERMEIRO NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DE MAMA: UM OLHAR DO ACADÊMICO DE ENFERMAGEM

Léo Sá de Souza<sup>1</sup>; Hortência Gomes Lima<sup>1</sup>; Jéssica Amorim Lisboa<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A neoplasia mamária é a mais recorrente no Brasil, sua prevalência é de 59.700 casos, equivalente a 29,5% da incidência dos cânceres em mulheres. Uma doença multifatorial, que acarreta mudanças na vida do paciente e na família. Nesse contexto, a atuação do enfermeiro é de proporcionar ao paciente melhor assistência em saúde, visando diminuir o impacto pela ausência da mama. **Objetivo:** Apresentar a atuação do enfermeiro na prevenção das neoplasias mamárias. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão sistemática qualitativa. A pesquisa foi realizada em: SciELO (Scientific Electronic Library Online) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), com publicações do período de 2008 a 2018, usando os descritores: prevenção, câncer de mama e enfermagem. Foram selecionados 15 artigos de acordo com os critérios de inclusão de um total de 59. Os critérios de inclusão foram: estarem publicados completos em Português, abordarem a temática e não serem monografias ou teses. **Resultados:** O enfermeiro é agente promotor de saúde, devendo educar em saúde. Estas ações devem ser realizadas de forma persuasiva, influenciando o indivíduo a melhorar o estilo de vida e a tomar atitudes que diminuam os riscos. A associação com a equipe multiprofissional foi ressaltada para que as ações educativas possam ser mais eficazes. Há a necessidade de um olhar dos profissionais, com os pacientes internados, devendo atentar-se ao exame físico completo e instruções para que o paciente consiga se examinar. **Conclusão:** O enfermeiro e a equipe multiprofissional se juntam para implementar ações que eduquem em saúde, levando a população a aderir um estilo de vida preventivo. Ressaltamos a importância dos acadêmicos de enfermagem refletirem sobre essa realidade, para que desenvolvam sensibilidades para lidarem com este problema.

**Palavras-chaves:** prevenção; câncer de mama; enfermagem.

**Área temática:** Saúde Coletiva



## ASSISTÊNCIA DA ENFERMAGEM AO PORTADOR DE ANEMIA FALCIFORME

Mariana Jardim Fraga<sup>1</sup>; Gabrielle Palma Feifer<sup>1</sup>; Waylla Albuquerque de Jesus<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A anemia falciforme é uma doença genética, hereditária e crônica, devido ao distúrbio na forma da hemácia, responsável pelo transporte de oxigênio corporal, assumindo a forma de foice, do que diminui seu tempo de vida. Isso causa diversos transtornos dos órgãos e tecidos, as principais são a cristalização do sangue e a formação de trombos por viscosidade sanguínea. A enfermagem deve considerar os sintomas físicos e psicossociais para cuidar de forma holística e integral. **Objetivo:** Identificar na literatura científica como o enfermeiro deve assistir ao paciente com anemia falciforme, devido aos impactos em sua qualidade de vida. **Material e Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, nas bases de dados SciELO (Biblioteca Eletrônica Científica Online), no Portal de Periódicos da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), no período de 2013 a 2019, usando os descritores “assistência de enfermagem”, “anemia falciforme” e “assistência integral à saúde”. Foram selecionados artigos em inglês e português, foram excluídas as repetições e aqueles que abordassem o assunto para apenas uma faixa etária ou grupo exclusivo. **Resultados:** Foram incluídos 13 artigos que correspondiam aos critérios de inclusão estabelecidos. O cuidado ao paciente com anemia falciforme deve ir além do aspecto biológico, atuando na orientação gênica da família e portadores, cuidados com os hábitos/estilo de vida, orientação no setor de emergência, na atenção primária, diagnóstico e tratamento, sem deixar a capacitação da família. **Conclusão:** O enfermeiro é o preconizador do cuidado e deve se capacitar continuamente para prestar uma assistência integral ao paciente com anemia falciforme, criando estratégias e intervenções que abrangem as diferentes dimensões, a dor e a subjetividade do ser humano.

**Palavras chaves:** assistência de enfermagem; anemia falciforme; assistência integral à saúde.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## A IMPORTÂNCIA DA AFETIVIDADE NO PROCESSO DE ENSINO E APRENDIZAGEM

Marília Rafaela dos Santos Lemos<sup>1</sup>; Marcella Oliveira Tolêdo<sup>2</sup>; Rosa Maria Rodrigues Barros<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente – Departamento Licenciatura em Pedagogia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** Estudos de Wallon e Vygotsky enfatizam a afetividade e a razão como abordagens que se complementam. Vygotsky ao abordar a prática escolar, discutiu em especial o papel da afetividade no processo ensino-aprendizagem. Henri Wallon dedicou seus estudos ao desenvolvimento do indivíduo com base em sua interação com o meio e a integração da afetividade e cognitivo, de modo que o estudo da criança demanda a análise do meio em que está inserida. **Objetivo:** O presente artigo é oriundo de uma pesquisa de contornos bibliográficos, cujos objeto se constituem em realizar um levantamento de documentos científicos a respeito da importância da afetividade no ensino-aprendizagem, analisando a atuação destas nos encaminhamentos desenvolvidos em sala de aula e potencializando o processo. Visando compreender o papel do professor na promoção da aprendizagem na Educação Infantil. **Material e métodos:** Configurou-se como uma pesquisa de revisão sistemática analisando diversas publicações, entre artigos em português e revistas com base de dados SCIELO e CAPES com publicações no ano de 2009 a 2017, com os seguintes descritores: afetividade, emoções, desenvolvimento e aprendizagem. **Resultados:** Os resultados da pesquisa apontaram que há uma carência de discussões mais aprofundadas acerca das questões estratégicas? As relações entre afetividade e a construção racional do conhecimento em sala de aula e a mediação do professor neste processo. **Conclusão:** Sem a pretensão de conclusividade das discussões apontadas neste artigo, observou-se mediante ao estudo, que a criança em seu processo de escolarização necessita interagir nos espaços e sobretudo com o professor de modo que a afetividade representa condição importante no processo de desenvolvimento cognitivo.

**Palavras-chave:** afetividade; desenvolvimento; aprendizagem.

**Área temática:** Saúde Coletiva.

## IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS APROVADOS COMO MEDICAMENTOS PELA ANVISA

Mateus Joacir Benvenuto<sup>1</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Aluno de Pós-graduação (mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** é evidente o avanço do conhecimento sobre a microbiota intestinal e seus efeitos na saúde humana. Apesar disso, a oferta regulamentada dos medicamentos probióticos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pouco avançou nos últimos anos. **Objetivo:** identificar as espécies de microorganismos aprovadas como medicamentos probióticos pela ANVISA. **Material e Métodos:** inicialmente, uma busca detalhada de gêneros de microorganismos com efeito probiótico comprovado foi feita na base de dados PubMed. Outros gêneros foram pesquisados em diversos websites de venda on-line de medicamentos. A seguir, cada gênero identificado pela pesquisa foi consultado na lista de medicamentos aprovados pela ANVISA. **Resultados:** atualmente, apenas 3 espécies de microorganismos são aprovadas como medicamento pela ANVISA: *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces boulardii-17*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus cereus*. Existem outros microrganismos aprovados para consumo na categoria de alimentos. As diferentes espécies estão disponíveis em 12 marcas comerciais, sendo que todas contem uma única espécie de microorganismo. **Conclusão:** o número de medicamentos probióticos aprovados no Brasil é ainda pequeno considerando o grande número de espécies com efeito probiótico comprovado.

**Palavras-chave:** probióticos; medicação; ANVISA.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM NA MELHORIA DA QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES HEMOFÍLICOS

Sara Andressa Caldeirão Janz<sup>1</sup>; Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Paulo Daniel Maria<sup>1</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup> Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A hemofilia é uma doença hereditária caracterizada pela alteração no processo de coagulação sanguínea. O dia a dia do portador do hemofílico envolve cuidados com hemorragias, hematomas e sangramentos excessivos. Quanto mais cedo se iniciam os tratamentos, menos sequelas deverão persistirem. Entende-se que a assistência de enfermagem na melhoria da qualidade de vida de pacientes hemofílicos é de extrema importância. **Objetivo:** Identificar na literatura científica a atuação do enfermeiro no cuidado ao paciente hemofílico. **Material e métodos:** Descritores utilizados foram “cuidado de enfermagem; hemofilias; qualidade de vida”. Trata-se de uma revisão qualitativa da literatura, utilizando publicações do período de 2003 a 2016, encontrados na base de dados Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Foram encontradas 147 publicações, selecionados 27 artigos que foram lidos na íntegra, dos quais 8 responderam à questão norteadora. **Resultados:** Os estudos demonstram que a atuação do enfermeiro no cuidado ao paciente hemofílico é imprescindível, e a assistência de enfermagem deve observar o alívio da dor, cuidados com administração de analgésicos, orientações sobre a prevenção de sangramentos, de forma humanizada, promovendo ações de autoconfiança e controle da própria vida, a fim de melhorá-la. **Conclusão:** Inferimos que o enfermeiro possui grande responsabilidade por disseminar a cultura de segurança ao paciente. Deve ainda orientar sobre os procedimentos necessários ao dia a dia, a fim de reduzir os agravos. Reconhece-se a importância da educação em saúde, para que tenham melhorias no processo de autocuidado.

**Palavras-chave:** cuidado de enfermagem; hemofilias; qualidade de vida.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ASSISTÊNCIA DE PROFISSIONAIS DA SAÚDE NO COMPORTAMENTO SUICIDA

Vitor Olívio Rodrigues Alves<sup>1</sup>; Cleidiane Farias Barth Souza<sup>1</sup>; Erilayne Silva Santana<sup>1</sup>;  
Wanderson Rocha Oliveira<sup>2</sup>; Márcio Fraiberg Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense.

**Introdução:** O suicídio cresce cada vez mais no mundo; no território Sul-Americano, o Brasil ganha destaque nesta problemática, pois é um de nove países com maiores números de suicídios. Esta realidade traz perspectivas em longa escala que preocupam os serviços de saúde. Está relacionado com a baixa satisfação com a própria vida, podendo estar associado a questões somatogênicas e/ou psicogênicas. Nesse contexto, as ações dos profissionais de saúde devem ser assertivas para reverter o quadro. A literatura apresenta comportamentos moralistas e comentários irônicos dos profissionais que repercutem negativamente no paciente. **Objetivo:** Identificar na literatura publicada as ações de profissionais da saúde no comportamento suicida. **Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura. Os dados foram obtidos através das bases de dados SciELO (Scientific Electronic Library Online) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Os critérios de inclusão: artigos em português, relacionados à temática, e publicados no período de 2014 a 2019. Utilizados os descritores: 'comportamento suicida', 'profissional' e 'saúde mental'. **Resultados:** Foram selecionados 14 trabalhos para análise. O indivíduo que sofre com tentações de suicídio não sofre sozinho, pois a família enfrenta dificuldades nesses momentos. São estigmas gerados pelas repercussões do caso, necessitando das intervenções profissionais, conseguindo ser um apoio ao paciente. Nesse sentido, o profissional de saúde precisa desenvolver estratégias humanizadas, reconhecendo às demandas específicas, com maneiras empáticas, em conjunto com a assistência multiprofissional. Reconhece-se a necessidade de melhorias na formação nas áreas de saúde mental, a fim que os profissionais estejam capacitados ao lidarem com o suicídio. **Conclusão:** Inferimos a problemática envolvendo o tema, a necessidade de novos estudos, bem como a escassez dos mesmos. Foi observado que os profissionais demandam de uma maior qualificação e especialização efetuando melhor tratamento para o indivíduo com comportamento suicida, em associação a rede de acompanhamento familiar.

**Palavras-chave:** comportamento suicida; profissional; saúde mental.

**Área temática:** Saúde Coletiva



## MORTALIDADE BRASILEIRA POR OBESIDADE: O REFLEXO DA TRANSIÇÃO NUTRICIONAL

Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Pamela dos Reis Salcedo<sup>2</sup>; Angela Ribeiro Vidal Cypriano Ramos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Docente de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>3</sup>Docente - Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** A obesidade é considerada problema de saúde pública mundial. É fator de risco no surgimento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis. No Caribe e América Latina, representa a maior ameaça nutricional. No Brasil, 56,9% da população apresenta sobrepeso e quase 30 milhões são considerados obesos. Aumentou a magnitude do problema pelas transições demográfica, epidemiológica e nutricional ocorridas no Brasil, sendo a última mais relevante.

**Objetivo:** Verificar a mortalidade por obesidade na população brasileira do período de 2006 a 2016. **Metodologia:** Estudo epidemiológico, descritivo, de série temporal. A população foi composta por brasileiros que foram a óbito em decorrência de obesidade e outras formas de hiperalimentação, na faixa etária de 5 a 80 anos de idade no período de 2006 a 2016. Os dados de mortalidade por regiões foram extraídos do Sistema de Informações de Mortalidade, disponíveis no DATASUS. Calculou-se as taxas de mortalidade/região a cada 100.000 habitantes. Os dados foram digitados em planilha do *Microsoft Office Excel* e, posteriormente, analisados por estatística descritiva. **Resultados:** O maior número de óbitos por obesidade e hiperalimentação ocorreu na população feminina da região sudeste (7828 óbitos). No mesmo período a região Sul apresentou as maiores taxas de mortalidade geral, de 63,6% de 2006 para 2016. Na análise da série temporal observou-se crescimento na mortalidade em todas as regiões, principalmente entre 2006 a 2011. A região Sul apresentou as maiores taxas de mortalidade no período, com ápice em 2013. Entre 2013 a 2014 quatro regiões brasileiras tiveram diminuição da mortalidade, e apenas a região norte aumentou. **Conclusão:** Verificou-se aumento nas taxas de mortalidade em todas as regiões brasileiras. O crescimento mais acentuado ocorreu entre os anos de 2006 a 2011. O conhecimento desta realidade é importante para o planejamento de ações de saúde voltadas à prevenção de agravos relacionados à hiperalimentação.

**Palavras-chave:** obesidade; epidemiologia; alimentação.

**Área temática:** Saúde Coletiva

## ASSISTÊNCIA DE ENFERMAGEM NO PARTO HUMANIZADO

Yasmim Farias de Brito<sup>1</sup>; Kelly Cristine Piolli Alvarez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica da Graduação de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

<sup>2</sup>Doutoranda em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A assistência humanizada da enfermagem durante o processo do parto é de alta relevância para a mãe se sentir mais preparada para esse momento único em sua vida, no qual a parturiente deve sofrer menos intervenções possíveis e fazer desse acontecimento um ato fisiológico e natural para favorecer o seu encorajamento e melhor capacidade do seu papel na maternidade, oferecendo bem-estar, estabilidade da saúde, além do cuidado holístico.

**Objetivo:** Identificar os benefícios da condução do parto humanizado pela enfermagem.

**Material e métodos:** Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, utilizando-se da busca de artigos nas bases de dados: Scielo (*Scientific Electronic Library Online*), LILACS (*Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde*) e BDEF. Tendo como critérios de inclusão os artigos completos em português e com foco na temática, adotando um recorte temporal daqueles artigos publicados no período de 2002 a 2018. Como critérios de exclusão adotou-se: artigos na modalidade fotocópia, revisão de literatura, publicações como monografias, dissertações e teses. Para a pesquisa os descritores foram: gravidez, parto humanizado e enfermagem. **Resultados:** Observou-se que as mulheres que vivenciaram esse tipo de parto possuíam um índice de morbimortalidade materna e perinatal diminuído, uso de formas não farmacológicas para manejo da dor eficazes, menor inquietação e ansiedade, maior segurança e confiança nos profissionais, promovendo uma aconchegante experiência, além do aspecto biológico. **Conclusão:** Nesse estudo evidenciou-se a importância do incentivo as práticas de humanização do parto, bem como discutir ações relacionadas á sua aplicação entre as equipes profissionais para melhor qualidade desse atendimento integral a gestante.

**Palavras-chave:** assistência; parto; humanização.

**Área temática:** Saúde Coletiva



International Meeting  
of Biosciences  
& Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

# Toxicologia

## EXPOSIÇÃO AO ESCITALOPRAM NA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS CAUSA ABORTO E MALFORMAÇÕES EM FETOS

Camila Salvador Sestario<sup>1</sup>; Marjori Frítola Yokoyama<sup>2</sup>; Bruna Santos Ezequiel<sup>3</sup>; Eduarda Vicentini Menezes<sup>3</sup>; Maria José Sparça Salles<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>4</sup>Docente- Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

**Introdução:** Há poucos relatos na literatura sobre a segurança da administração do fármaco Escitalopram (ESC) no período gestacional e de seus possíveis efeitos teratogênicos em fetos. **Objetivo:** Investigar se a administração de Escitalopram durante a prenhez de camundongos induz toxicidade materna e teratogenicidade na prole. **Material e métodos:** Estudo experimental, com aprovação da Comitê de Ética no Uso de Animais, nº 17937.2017.35. Grupos tratado G1 e controle G0 (n=15 por grupo). Administração de ESC (G1) e solução salina (G0) durante a gestação e eutanásia no 18º dia. Análise estatística: teste t de Student e Exato de Fisher. **Resultados:** Os parâmetros de desenvolvimento intrauterino que apresentaram alterações foram: número de reabsorções (G0: [0,93 ± 0,24]; G1: [3,33 ± 0,51]), perda pós-implantacional (G0: [3,95 ± 1,34], G1: [13,75 ± 3,62]) e redução da viabilidade fetal: (G0: [97,30 ± 1,00]; G1: [81,09 ± 6,22]). Em relação à formação fetal, o grupo tratado apresentou malformações viscerais com frequência significativa: fissura de palato (G0: [1,0%], G1: [11,86%]) e rins diminuídos (G0: [0%]; G1: [10,17%]). Em relação às malformações esqueléticas, observou-se maior frequência nos seguintes parâmetros: ossificação incompleta de supraoccipital (G0: [0%], G1: [15,25%]), ausência de costelas (G0: [0%]; G1: [8,47%]), fenda palatina (G0: [0%]; G1 [15,25%]) e ausência de uma ou mais falanges dos pés (G0: [1,0%]; G1: [18,64%]). **Conclusão:** Os resultados sugerem que o ESC é uma droga com potencial embriotóxico e teratogênico. Nesse sentido, até que surjam estudos prospectivos, se faz necessário uma maior cautela na prescrição da droga para gestantes.

**Palavras-chave:** camundongo; antidepressivos; malformações.

**Financiador (es):** Capes

**Área temática:** Toxicologia

## PADRONIZAÇÃO DA DERIVATIZAÇÃO E DA TÉCNICA DE DPX PARA DETERMINAÇÃO DE ETILENOTIUREIA NA URINA

Jéssica Cristina Zoratto Romoli<sup>1</sup>; Deborah Thais Palma Scanferla<sup>2</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Giseli Cristina Pante<sup>3</sup>; Camila Marchioni<sup>4</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4</sup>, Miguel Machinski Junior<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** O metabólito etilenotiureia (ETU) na urina pode ser utilizado como biomarcador em trabalhadores expostos a fungicidas. A baixa volatilidade da molécula de ETU impede a análise direta por Cromatografia Gasosa (CG), sendo necessário o processo de derivatização, que também melhora a resposta no Espectrômetro de Massas (EM). A técnica de extração em ponteira descartável (DPX) é uma miniaturização da extração em fase sólida, utilizando ponteiras descartáveis contendo a fase sortiva entre dois filtros. **Objetivo:** Padronizar a derivatização e avaliar a eficiência da DPX para determinação de ETU em urina por CG/EM. **Material e métodos:** A derivatização (acetonitrila-BSTFA-*t*-BuMe<sub>2</sub>Si-Cl, 5:4:1) foi baseada em Fustinoni et al. (2005). Avaliou-se: tempo de permanência em banho de água (BA) ou estufa (60°C) por 30, 60 ou 90min e volume do agente derivatizante (50 ou 100µL). Para a extração de ETU da urina por DPX, utilizou-se acetonitrila (100µL) para o condicionamento do celite, a urina enriquecida (8µL, 200µg/L) foi misturada dinamicamente, após 1 min, 100µL acetonitrila-água (2:1) para limpeza e 200µL diclorometano para eluição do analito. **Resultados:** A derivatização em estufa por 30 min apresentou melhor perfil cromatográfico. Em relação ao volume de derivatizante, o valor médio das áreas dos picos cromatográficos para 50 e 100µL foram 37683±4628 e 130519±6169, respectivamente. Portanto, o volume de 100µL foi utilizado nos ensaios subsequentes. A extração por DPX mostrou-se eficiente, sendo que a fase sortiva adsorveu adequadamente o analito. No entanto, o cromatograma apresenta alguns picos interferentes provenientes da urina. Assim, a limpeza será melhor avaliada. **Conclusão:** O processo de derivatização, antes realizado *overnight* (16 h), mostrou ser eficiente em estufa por 30 min. A DPX permitiu uma extração de ETU rápida, econômica e com baixo consumo de solvente orgânico/material biológico.

**Palavras-chave:** etilenotiureia; derivatização química; DPX.

**Financiador (es):** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Área temática:** Toxicologia.



## PERFIL DE POSITIVIDADE PARA COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE PACIENTES INTERNADOS EM CLÍNICA DE RECUPERAÇÃO EM MARINGÁ-PR

Jéssica Yuri Sakurada<sup>1</sup>; Deborah Thais Palma Scanferla<sup>2</sup>; Mariana Aparecida Oliveira Madia<sup>2</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas de 2018, cerca de 18,2 milhões de pessoas fizeram uso de cocaína, no Brasil são 4,4 milhões. A investigação dos perfis de uso auxilia na estratégia de prevenção. **Objetivo:** Avaliação do perfil de resultados positivos para cocaína em amostras obtidas de internos de clínicas de recuperação. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo, descritivo e quantitativo, aprovado pelo Comitê de Ética COPEP/UEM (nº 2.155.847). Catorze amostras de cabelo, obtidas de indivíduos do sexo masculino e internados em clínicas de recuperação no município de Maringá-PR, foram analisadas por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas. Após assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os internos participaram de entrevista para análise de variáveis: associação com outras drogas, tempo de uso e idade de início do consumo de drogas. Os dados foram compilados no *software Microsoft Office Excel® 10.0* e analisados por meio de estatística simples. **Resultados:** As amostras, em sua totalidade, foram positivas para cocaína (COC) e benzoilecgonina (principal produto de biotransformação). O cocaetileno, metabólito do uso combinado com álcool não esteve presente em 3 amostras, corroborando com o relato dos pacientes. A maioria dos pacientes relatou fazer o uso de COC concomitante a duas ou mais drogas (87,7%) como álcool, maconha ou crack. Segundo a classificação de uso de COC proposta por Gambelunghe *et al.* (2015), 5 amostras foram classificadas como “uso leve” (0,5 - 3ng/mg), 5 foram classificadas como de “uso moderado” (3,1 - 10ng/mg) e 4 amostras como “uso pesado” (10,1 - 40ng/mg). O tempo de uso das substâncias variou de 10 a 23 anos, iniciando-se entre 13 a 18 anos de idade. **Conclusão:** A classificação de uso de COC corrobora com o tempo extenso do consumo de drogas pelos usuários. É necessária a prevenção primária ao uso de drogas, pelo seu início precoce na adolescência.

**Palavras-chave:** cocaína; dependência química; comunidade terapêutica.

**Área temática:** Toxicologia

## TENTATIVAS DE SUICÍDIO POR MEDICAMENTOS EM JOVENS ATENDIDOS PELO CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES DE MARINGÁ, PARANÁ

Paula Pessoa Moreira<sup>1</sup>; Amanda Beatriz Barros<sup>2</sup>; Mariana Aparecida Oliveira Madia<sup>1</sup>; Magda Lúcia Félix de Oliveira<sup>3</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo

<sup>3</sup> Docente – Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá/UEM.

<sup>4</sup> Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá/UEM.

**Introdução:** As intoxicações por tentativa de suicídio tendem a ser mais agravantes, pelas escolhas do medicamento, ingestões de maior quantidade e exposições prolongadas causadas pelo retardo no atendimento inicial. **Objetivo:** Analisar o perfil epidemiológico das tentativas de suicídio de jovens por intoxicações medicamentosas atendidas pelo Centro de Controle de Intoxicação (CCI) do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM), observando características relacionadas às intoxicações. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo descritivo exploratório, de fichas epidemiológicas registradas no CCI HURM do município de Maringá, Paraná, durante janeiro de 2011 a dezembro de 2015. O projeto foi aprovado pelo Comitê permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá sob parecer nº 1.835.352/2016 e pela Comissão de Regulamentação das Atividades Acadêmicas (COREA) do HURM. A coleta de dados foi realizada por busca ativa nas fichas e analisados por estatística descritiva simples. A faixa etária definida foi de 12 a 20 anos. **Resultados:** 27 casos de tentativa de suicídio por medicação foram registrados, 78,5% eram mulheres e dois pacientes estavam em sua segunda tentativa. A maioria aconteceu na residência do paciente. 50% dos pacientes tiveram como motivo das tentativas de suicídio conflitos familiares, 14,2% conflitos amorosos e 35,7% não informaram o motivo. 78,5% dos pacientes realizaram a tentativa utilizando drogas psicoativas. Onze pacientes tiveram alta hospitalar, um foi a óbito e dois foram transferidos para serviço de referência de tratamento para saúde mental. **Conclusão:** O presente estudo permitiu caracterizar o perfil clínico das tentativas de suicídio de jovens, evidenciando medicamentos psicoativos e conflitos familiares como principal característica das tentativas. É de extrema importância conhecer o perfil das tentativas de suicídio para que se possam elaborar estratégias de prevenção e tratamento.

**Palavras-chave:** tentativa de suicídio; intoxicação; medicamentos.

**Área temática:** Toxicologia

## CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL DE FLORICULTORES À PRAGUCIDAS INIBIDORES DAS COLINESTERASES – RESULTADOS PRELIMINARES

Raul Gomes Aguera<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>1</sup>; Amanda de Paula Coelho Siqueira<sup>2</sup>; Camila da Silva Freires<sup>2</sup>; Samuel Botião Nerilo; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

**Introdução:** Sabe-se que, para a cultura de flores, o uso de agrotóxicos é necessário em todas as fases de produção, dentre estes os inseticidas inibidores das colinesterases podem causar importantes quadros de intoxicação. A exposição a estes pragucidas em associação com a falta de proteção dos trabalhadores pode aumentar o risco de intoxicação. **Objetivo:** Caracterizar a população de floricultores exposta a inseticidas inibidores das colinesterases em Marialva-PR.

**Material e métodos:** Estudo quantitativo, realizado em Marialva-PR, com trabalhadores que relataram uso de inibidores das colinesterases. Foram realizadas visitas técnicas às propriedades e os dados foram obtidos mediante um instrumento de entrevista, desenvolvido com base no “Roteiro de Avaliações das Intoxicações Crônicas por Agrotóxicos da Secretaria de Saúde do Paraná”. Os dados foram compilados no software Microsoft Office Excel™ e analisados por meio de estatística descritiva simples. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (número 3.314.720) da Universidade Estadual de Maringá. **Resultados:** Inicialmente foram entrevistados 13 homens e 6 mulheres, com média de idade de 45,42 (± 13,26) anos. Em relação a escolaridade, a maioria possuía ensino fundamental incompleto (47,37%) e a renda familiar entre 1.000 a 7.000 reais. Quanto ao uso de equipamentos de proteção individual (EPI), 77,7% responderam fazer uso inadequado de EPI e 22,2% não usa qualquer tipo de EPI. Os sintomas relatados que podem estar relacionados ao uso de agrotóxicos, sem proteção são: cefaléia (26,32%), tontura (26,32%), incontinência urinária (26,32%), taquicardia (21,05%), fraqueza muscular (15,79%), confusão mental (15,79%), tremores (15,79%), visão turva (10,53%), náusea (10,53%), incontinência fecal (10,53%), sudorese (5,26%) e dispneia (5,26%). **Conclusão:** Os dados preliminares mostram a presença de sinais e sintomas clínicos entre os floricultores compatíveis com quadros de intoxicações por pragucidas inibidores da colinesterase e o uso inadequado dos EPI's, podendo estar relacionadas à exposição aos agrotóxicos.

**Palavras-chave:** intoxicação; cultura de flores; agrotóxicos.

**Financiador:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

**Área temática:** Toxicologia

## CARACTERIZAÇÃO DO TABAGISMO ENTRE OS ACADÊMICOS DO CURSO DE BIOMEDICINA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Renata Sano Lini<sup>1</sup>; Ingrid Garcia de Araujo<sup>2</sup>; Danielle Hoeltgebaum<sup>3</sup>; Celso Ivam Conegero<sup>4</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Estudos revelam que o tabaco é a segunda droga mais consumida entre os universitários. O seu uso por profissionais em formação da área de saúde gera grande preocupação, visto que estes são considerados exemplos de comportamento pela população. **Objetivo:** Conhecer os hábitos de tabagismo entre universitários do curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá (UEM), matriculados no ano de 2018. **Material e métodos:** Estudo descritivo realizado por meio de um questionário anônimo. Os resultados foram tabelados e analisados através do software Microsoft Excel®. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá – COPEP/UEM, CAAE nº 27405014.8.000.0104, todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. **Resultados:** A população de estudo foi composta por 104 alunos sendo 18,27% homens e 81,73% mulheres, com faixa etária de 17 a 26 anos. A frequência de tabagistas foi de 5,77% entre os estudantes, sendo que 91,35% não eram fumantes e 2,88% eram ex-fumantes. Todos os entrevistados (100%) admitiram ter conhecimento sobre os malefícios à saúde causados pelo tabaco. Mais da metade dos participantes (52,89%) informaram conviver com tabagistas, sendo que em 23,08% dos casos a convivência ocorre em mais de um ambiente e o maior convívio acontece entre os amigos (47,67%). A frequência de uso do narguilé foi maior que a de fumantes, 18,27% dos estudantes disseram que utilizam narguilé, 19,23% já fizeram uso no passado e 62,50% relataram não utilizar. Para os estudantes de Biomedicina, a melhor forma de contribuição para o controle do tabagismo é por meio de palestras (44,44%). **Conclusão:** Os resultados mostram que alguns universitários são tabagistas e fazem uso de narguilé, mesmo sabendo das consequências à saúde provocadas pelo uso do tabaco. Isso evidencia a necessidade de políticas de prevenção de tabagismo entre os jovens adultos.

**Palavras-chave:** tabaco; narguilé; universitários.

**Área temática:** Toxicologia



International Meeting  
of Biosciences  
&  
Physiopathology  
Simpósio de Biociências  
Aplicadas à Farmácia

## Vigilância em saúde e ambiental



## EFEITO LARVICIDA E OVOCIDA DE EXTRATOS DE *Crotalaria pallida* SOBRE O VETOR ARBOVIRÍDICO, *Aedes aegypti*

Alex Martins Machado<sup>1</sup>; Taiana Gabriela Barbosa Souza<sup>2</sup>; Beatriz Ayumi Takagi<sup>3</sup>; Luiz Gustavo Bernardes<sup>4</sup>; Aline Rafaela da Silva Rodrigues Machado<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Docente de Graduação em Medicina, Imunologia e Virologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Medicina, Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

<sup>3</sup>Acadêmica do curso de Biologia, Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

<sup>4</sup>Farmacêutico – Técnico de Laboratório – Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

<sup>5</sup>Docente de Graduação em Medicina, Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS

**Introdução:** O surgimento de resistência aos inseticidas tem causado dificuldades no controle do *Aedes aegypti* estimulando à busca por compostos larvicidas naturais. A *Crotalaria pallida*, conhecida popularmente por sua ação repelente, carece de dados científicos quanto à suas propriedades. **Objetivo:** Verificar o potencial larvicida/ovocida de extratos de *C. pallida* em *A. aegypti*. **Material e métodos:** Folhas de *C. pallida* foram submetidos a extração com solventes etanólicos (EtOH) e metanólicos (MetOH). A ação larvicida foi determinada utilizando 20 larvas (L1, cepa Rockefeller) através do contato com cada extrato (500 µg/ml diluídos em DMSO) por 24 horas (testes em triplicata). Testes semelhantes com diluições de 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml foram realizados para determinação da dose letal (DL90 e DL50). A DL50 foi utilizada para determinação da ação larvicida nos diferentes *instars* larvais para ambos extratos. Para a análise ovocida, ovos foram colocados em contato com os compostos (MetOH e EtOH a 500 µg/ml) por 10 minutos e transferidos posteriormente para água limpa para eclosão (Teste de contato). Também foram deixados ovos para eclosão em água contendo 500 µg/ml dos extratos (Teste de eclosão). Todos os resultados foram submetidos a análise estatística. **Resultado:** Observou-se ação larvicida com morte de 100% (MetOH) e 90% (EtOH) na concentração de 500 µg/ml. A DL50 e DL90 foram de 245,79 e 486,52 µg/ml respectivamente para MetOH e 262,02 e 615,11 µg/ml respectivamente para EtOH. Observou-se ainda uniformidade na capacidade larvicida dos compostos nos diferentes *instars* larvais utilizando DL50 (letalidade de 55% (MetOH) e 48% (EtOH)). Ambos extratos também inibiram a eclosão dos ovos em 95% (MetOH) e 90% (EtOH) no teste de contato e 100% no teste de eclosão. As análises estatísticas mostraram significância entre a concentração do extrato e a mortalidade das larvas. **Conclusão:** Trata-se de um resultado promissor no combate ao vetor *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** biolarvicida; controle vetorial; dengue.

**Financiador (es):** CNPq e UFMS

**Área temática:** Vigilância em Saúde e Ambiental



A Biociência está nos seus genes.  
**Até a próxima edição!**

Atenciosamente,  
**Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana**  
Proponente do evento

**Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia

**Comissão organizadora do evento**

Fone: (44)3011-4805  
simposiopbf@gmail.com – [www.pbf.uem.br](http://www.pbf.uem.br)