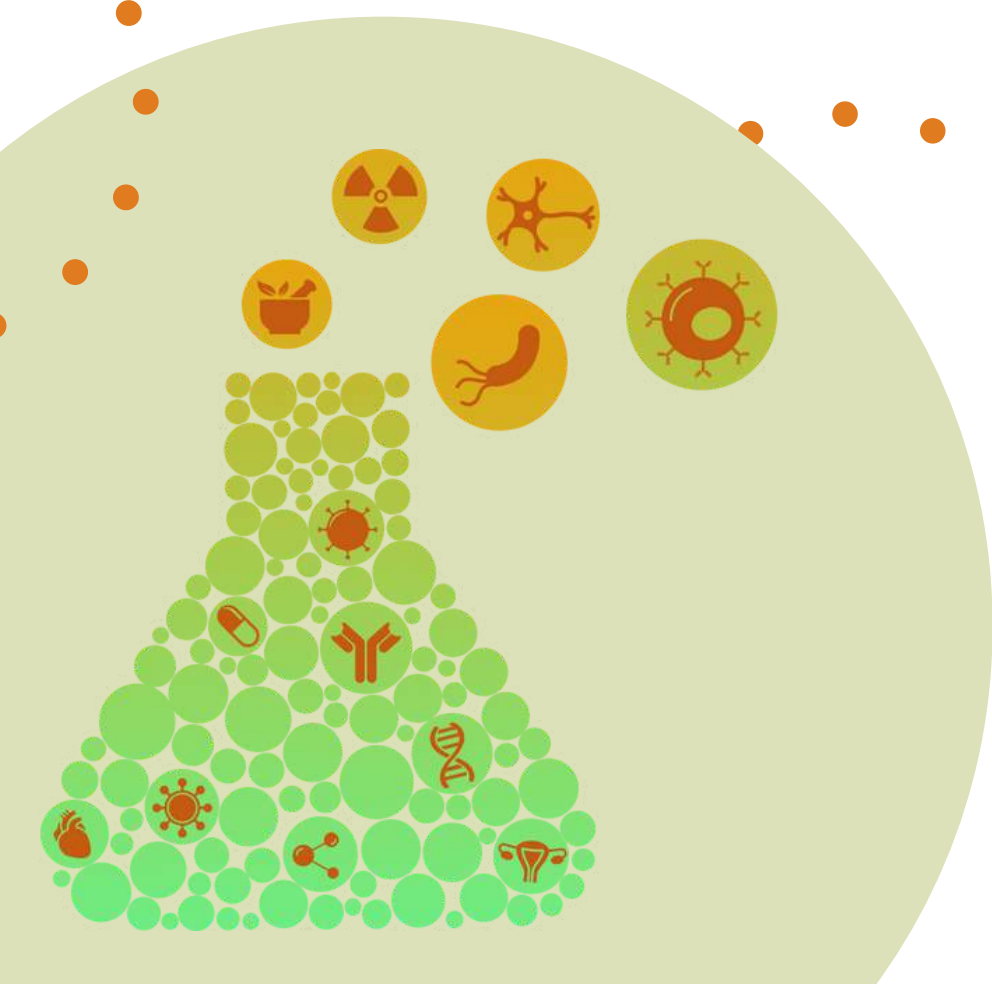


# 9<sup>o</sup> International Meeting of Biosciences and Physiopathology

*13<sup>o</sup> Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia*

ANAIS  
2022



# APRESENTAÇÃO

---

No Anais do 9th International Meeting of Biosciences and Physiopathology e 13º 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, da Universidade Estadual de Maringá, realizado de 14 a 16 de setembro de 2022.

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. Miguel Machinski Junior - Diretor

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscila Garcia Marques - Diretora Adjunta

## DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini - Chefe

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vânia Ramos Sela da Silva - Chefe Adjunta

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Aparecida Galerani Mossini - Coordenadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Érika Seki Kioshima Cotica - Coordenadora Adjunta

Vânia Azevedo Cardoso - Secretária

## COORDENAÇÃO GERAL

Profª Drª Simone Aparecida Galerani Mossini  
Profª Drª Érika Seki Kioshima Cotica  
Profª Drª Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça  
Profª Drª Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli  
Profª Drª Isis Regina Grenier Capoci  
Profª Drª Joana Maira Valentini Zacarias  
Profª Drª Jaqueline de Carvalho Rinaldi

## COMISSÃO ORGANIZADORA

Amanda Pohlmann Bonfim  
Hellen Carla Rickli  
João Paulo Salvaterra Pasquini  
Lincoln Luís Silva  
Lucimara Rodrigues Carobeli  
Maiara Vanusa Guedes Ribeiro  
Matheus Braga  
Monica de Souza Ferreira de Mattos  
Renata Sano Lini  
Ruan Rompato Vieira

# SUMÁRIO

---

## RESUMOS EXPANDIDOS

### Panorama e enfrentamento das Infecções bacterianas

TERAPÊUTICA ANTIBACTERIANA NO TRATAMENTO DE BACTEREMIA POR <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS COMBINADO A VERAPAMIL EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS.....	18
CRIAÇÃO DE UMA FERRAMENTA DE ACOMPANHAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO.....	25
POPULATION PHARMACOKINETICS OF AMOXICILLIN IN HEALTHY ADULTS.....	30

### Atualizações em Biociências e Fisiopatologia

ALTERAÇÕES DO DUODENO DE HAMSTERS SUBMETIDOS A INFECÇÃO POR DIFERENTES CEPAS DE <i>Leishmania Viannia braziliensis</i> .....	34
SLEEP ANALYSIS OF CHILDREN AGED 6 TO 10 YEARS AND ITS COMPARISON WITH CHILDREN WITH ATTENTION DEFICIT HYPERACTIVITY DISORDER (ADHD) IN PANDEMIC.....	40
SAÚDE EMOCIONAL DE ADOLESCENTES DE UM COLÉGIO INTERNO NO PARANÁ.....	45

### Abordagens biotecnológicas com foco no diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças

EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E REABSORÇÃO ALVEOLAR APÓS A INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL E TRATAMENTO COM GEL DE <i>Limonium brasiliense</i> EM RATOS WISTAR.....	51
PRODUÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA SORODIAGNÓSTICO DA DENGUE.....	57
ATIVIDADE DA ERITROSINA B EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CÂNCER CERVICAL ATRAVÉS DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	63
MECHANISMS OF ACTION OF ARTEPILLIN C AGAINST BREAST CANCER CELLS.....	69

### Saúde cardiometabólica na exposição a substâncias químicas

EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR PROGRAMAÇÃO NA LACTAÇÃO SOBRE O INTESTINO DE CAMUNDONGOS BALB/c.....	75
ESTUDO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM TRABALHADORES DA AGRICULTURA FAMILIAR EXPOSTOS CRONICAMENTE A AGROTÓXICOS.....	82

TREATMENT WITH RITALIN® DURING ADOLESCENCE PROGRAM GLYCEMIC HOMEOSTASIS DYSFUNCTION IN ADULT RATS.....	88
LOW PROTEIN DIET DURING PERI-PUBERTAL LIFE PROGRAMS TO CARDIAC HYPERTROPHY AND RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM DYSFUNCTION IN MALE ADULT RATS.....	94

### Vigilância epidemiológica e laboratorial da COVID -19

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES ADULTOS INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL MARINGÁ (HUM) COM SUSPEITA DE COVID-19 EM DIFERENTES MOMENTOS DA PANDEMIA.....	99
IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID-19 NA LOGISTICA DE MEDICAMENTOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO NO NOROESTE DO PARANÁ.....	104
OPTIMIZATION OF COVID-19 VACCINATION POINTS IN PARANÁ USING SPATIAL ANALYSIS.....	109
ASSOCIATION OF HLA GENE POLYMORPHISM WITH COVID-19: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS.....	115

### Novos estudos em Imunogenética

ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES PORTADORES DE HANSENÍASE E SEUS ENDOFENÓTIPOS EM POPULAÇÕES DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ-BRASIL.....	121
ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DE HLA-G NA IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE.....	127
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS ALELOS HLA DE CLASSE I NA PATOGÊNESE DA ESPONDILITE ANQUILOSANTE EM UMA POPULAÇÃO DA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ.....	132
AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS FY*A E FY*B DO ANTÍGENO ERITROCITÁRIO DUFFY EM PACIENTES COM DIFERENTES QUADROS CLÍNICOS DE COVID-19.....	137

### Diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas

<i>In vitro</i> ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CURCUMIN-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY ON <i>Sporothrix brasiliensis</i> .....	142
<i>Trichophyton rubrum</i> complex AZOLE RESISTANT IS PHOTOINACTIVATED BY NANOENCAPSULATED HYPERICIN.....	148
<i>Candida albicans</i> orf19.36.1 SEEMS NOT TO BE ESSENTIAL FOR VIRULENCE.....	154
ERADICATION OF <i>Fusarium</i> sp. BY PHOTODYNAMIC THERAPY IN ONYCHOMYCOSIS CASES.....	160

## RESUMOS SIMPLES

### Bioquímica Clínica

INSIGHTS INTO URICOSURIA IN CHILDREN.....	166
CITRATO URINÁRIO EM CRIANÇAS NÃO LITIÁSICAS.....	167

### Citologia Clínica

SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF HYPERICIN NANOENCAPSULATED WITH PLURONIC F127 IN BREAST CANCER CELL.....	168
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.....	169

### Epidemiologia

AVALIAÇÃO, EM ADOLESCENTES, DAS CONDIÇÕES DE DEPRESSÃO APÓS A PANDEMIA DE COVID-19.....	170
FATORES SOCIOECONÔMICOS E CLÍNICOS QUE PREDISPÕE PACIENTES COM COVID-19 A UM MAU PROGNÓSTICO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	171
DECORRÊNCIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE EM ADOLESCENTES: UMA ANÁLISE PÓS PANDEMIA E RETORNO ÀS AULAS ESCOLARES.....	172
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE ARANEÍSMO NO PARANÁ.....	173
FATORES DE RISCO DE INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASES.....	174
AVALIAÇÃO DOS ESTADOS EMOCIONAIS DE DEPRESSÃO, ANSIEDADE E ESTRESSE EM TRABALHADORES RURAIS NO PARANÁ.....	175
PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES CARDÍACAS EM ATLETAS COM COVID-19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	176
SAÚDE EMOCIONAL DE ADOLESCENTES APÓS PANDEMIA DE COVID-19.....	177

### Farmacognosia

PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND IN VITRO ANTIOXIDANT POTENTIAL FROM <i>Psychotria phyllocalymoides</i> .....	178
--	-----

### Fisiologia

EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO NA ÁREA DOS ADIPÓCITOS DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS TRANSGÊNICOS PARA ApoCIII HUMANA.....	179
--	-----

### Farmacologia

POTENCIAL AÇÃO ANTI-OBESIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA SEMENTE DE <i>TAMARINDUS INDICA</i> .....	180
--	-----



POTENCIAL AÇÃO ANTIHIPERGLICÊMICA DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE <i>Malpighia emarginata</i> : ESTUDOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .....	181
EFEITO DO BOLDINE SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATO EM FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO.....	182

### Imunogenética

ASSOCIAÇÃO DO SNV rs1800896 DE IL10 COM A GRAVIDADE DA COVID-19.....	183
CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES COM COVID-19 ATENDIDOS NO HOSPITAL PARANÁ EM MARINGÁ.....	184
AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -174C>G DO GENE IL6 EM PACIENTES COM COVID-19.....	185

### Imunologia

IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS T-CAR EM DOENÇAS ONCO-HEMATOLÓGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS B: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE REVISÕES SISTEMÁTICAS.....	186
INFLUÊNCIA DA DEPRESSÃO E DO ESTRESSE NOS MECANISMOS EFETORES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE REVISÕES SISTEMÁTICAS.....	187
CITOCINAS SÉRICAS EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR SARS- CoV-2: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	188

### Microbiologia

HEMATOLOGICAL PROFILE AND BIOCHEMICAL MARKERS OF COVID-19 DEATH COHORT IN REGIONAL UNIVERSITY HOSPITAL OF MARINGÁ.....	189
HIGIENE DAS MÃOS NO AMBIENTE HOSPITALAR ENTRE PROFISSIONAIS, RESIDENTES E ESTUDANTES: SERÁ QUE ESTAMOS FAZENDO A NOSSA PARTE?..	190
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE <i>Fusarium</i> spp.....	191
AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE CARVACROL E NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA <i>Salmonella</i> spp.....	192
PREVALÊNCIA DE <i>Acinetobacter baumannii</i> E <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA COVID EM HOSPITAL ESCOLA.....	193
ONICOMICOSE NÃO DERMATOFÍTICA IDENTIFICADA EM PACIENTES ATENDIDOS PELO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA MÉDICA EM UMA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ.....	194

CARACTERIZAÇÃO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL POR <i>Candida tropicalis</i> EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NÃO-DIABÉTICOS.....	195
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FORMAS LEVEDURIFORMES DE <i>Paracoccidioides</i> spp.....	196
AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM HIPERICINA HIDROSSOLÚVEL EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE <i>Candida albicans</i> .....	197
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE COMPOSTO POR MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	198
A INCIDÊNCIA DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO EM IDOSOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA.....	199
AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM HEMOCULTURAS DE PACIENTES INTERNADOS EM DUAS UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL ENSINO: UTI GERAL E UTI COVID-19....	200
ATIVIDADE DE NOVAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS.....	201
USO DO OZÔNIO PARA DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAIS MÉDICOS E HOSPITALARES.....	202

## Morfologia

IDADE E OBESIDADE INTERFEREM NA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO MUSCULAR DOS TIPOS I E III EM RATOS EXERCITADOS.....	203
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE REDUZ O PESO DO FÍGADO E DA GORDURA RETROPERITONEAL DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA.....	204
ANÁLISE SOBRE A INFLUÊNCIA DA SUPEREXPRESSÃO DE APO-CIII NO RECRUTAMENTO DE MASTÓCITOS EM PRÓSTATA DE CAMUNDONGO.....	205
A INFECÇÃO CRÔNICA PELO <i>Toxoplasma gondii</i> COM/SEM <i>E. purpurea</i> REDUZ A PROPORÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS DO TIPO III NA PRÓSTATA ANTERIOR DE RATOS.....	206
O USO DA <i>Equinacea purpurea</i> REDUZ OS IMPACTOS DA INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> NOS MASTÓCITOS DA PRÓSTATA ANTERIOR DE RATOS.....	207
O USO DE <i>Equinacea purpurea</i> E/OU PIRIMETAMINA ALTERAM A PROPORÇÃO DOS COMPARTIMENTOS GLANDULARES DA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS INFECTADOS POR <i>T. gondii</i> .....	208
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE PIRIMETAMINA E/OU <i>Equinacea purpurea</i> EM NEURÔNIOS DA CÁPSULA PROSTÁTICA DE RATOS COM INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	209
A INFECÇÃO AGUDA E CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> IMPACTA DIFERENCIALMENTE NA CONTAGEM TOTAL DE FOLÍCULOS OVARIANOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	210

O USO DE <i>Echinacea purpurea</i> E/OU DE PIRIMETAMINA NA INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> REDUZEM O COMPARTIMENTO ESTROMAL DA PRÓSTATA ANTERIOR DE RATOS.....	211
OPTIMIZED PERFUSION PROTOCOL FOR WHOLE-OVARY DECELLULARIZATION: A STRUCTURAL AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION.....	212
CURCUMINA NANOENCAPSULADA REDUZ O EDEMA DE PATA DE RATOS COM ARTRITE REUMATOIDE.....	213

### Parasitologia

AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO DUODENO DE HAMSTERS INFECTADOS POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	214
POTENCIAL GIARDICIDA DE DERIVADO DA <i>Camellia sinensis</i> EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS.....	215
CITOTOXICIDADE DA HIPERICINA LIVRE E ENCAPSULADA COM F127 PARA MONÓCITOS HUMANOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA.....	216
EVIDÊNCIAS DA RELAÇÃO ENTRE A INFECÇÃO POR PROTOZOÁRIOS E A MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	217
INFLUÊNCIA DAS INFECÇÕES HELMÍNTICAS NA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA- UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	218
EFEITOS DA IMUNOESTIMULAÇÃO COM <i>Echinacea purpurea</i> E DA INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO DE RATOS WISTAR.....	219

### Patologia

EFEITO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS DO JOELHO DE RATOS OBESOS.....	220
NÍVEIS DE INTERLEUCINA-17 E INTERLEUCINA-10 EM RATOS OBESOS DE DIFERENTES IDADES SUBMETIDOS AO TREINAMENTO.....	221
QUANTIFICAÇÃO DE HIPERPLASIAS E DISPLASIAS NO CÓLON DE ROEDORES INDUZIDOS COM 1,2-DIMETILHIDRAZINA E TRATADOS COM PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA E ARTEPILLIN C.....	222
EFEITO DO METOTREXATO, DA CURCUMINA LIVRE E NANOENCAPSULADA NA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS DO JOELHO DE RATOS ARTRÍTICOS.....	223

### Saúde coletiva

EFICÁCIA DE DOIS ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA NA PREDIÇÃO DO ABANDONO DO TABACO EM PACIENTES ATENDIDOS POR UM CENTRO DE TRATAMENTO AOS FUMANTES NO BRASIL.....	224
AVALIAÇÃO DA CONCILIAÇÃO MEDICAMENTOSA NO PRONTO ATENDIMENTO EM UM HOSPITAL ESCOLA.....	225

## Toxicologia

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE VITICULTORES EXPOSTOS AOS FUNGICIDAS ETILENO-BISDITIOCARBAMATOS.....	226
INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS NO BRASIL: PERÍODO ANTERIOR E DURANTE A PANDEMIA DE CORONAVÍRUS.....	227
AGROTÓXICOS E EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA UTILIZADOS POR TRABALHADORES RURAIS DO MUNICÍPIO DE MARIALVA/PR.....	228
INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICO AGRÍCOLA RELACIONADO A TENTATIVA DE SUICÍDIO NO BRASIL EM 2021.....	229
INTOXICAÇÕES AGUDAS E PERCEPÇÃO DE AGRICULTORES EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE A AGROTÓXICOS.....	230
CASOS NOTIFICADOS DE INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS NO ESTADO DO PARANÁ RELACIONADAS AS TENTATIVAS DE SUICÍDIO EM 2021: LEVANTAMENTO DE DADOS OFICIAIS DA PLATAFORMA DATASUS.....	231
INTOXICAÇÕES POR DROGAS DE ABUSO NO ESTADO DO PARANÁ DE 2016 A 2020.....	232
CASOS NOTIFICADOS DE ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS NO ESTADO DO PARANÁ NO ANO DE 2021: LEVANTAMENTO DE DADOS OFICIAIS DA PLATAFORMA DATASUS.....	233
PERFIL DO USO DE ÁLCOOL, TABACO E OUTRAS DROGAS EM UNIVERSITÁRIOS DA ÁREA DE SAÚDE DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA.....	234
AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DO FUNGICIDA RIDOMIL GOLD MZ® EM BIOENSAIO COM <i>Allium cepa</i> .....	235
DADOS OFICIAIS DAS NOTIFICAÇÕES DE INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS AGRÍCOLAS RELACIONADOS A INGESTÃO DE ALIMENTOS E BEBIDAS NO BRASIL NOS ÚLTIMOS CINCO ANOS.....	236
RELATOS DE ACIDENTES OFÍDICOS NO PARANÁ EM 2021.....	237
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS COLETADOS NA PLATAFORMA DATASUS: PERFIL DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR NO BRASIL DURANTE A PANDEMIA (2019, 2020 e 2021).....	328
CASOS NOTIFICADOS DE ACIDENTES CAUSADOS POR ESCORPIÕES NO ESTADO DO PARANÁ REFERENTE AO ANO DE 2021: LEVANTAMENTO DE DADOS DA PLATAFORMA DATASUS.....	239
EFEITOS CLASTOGÊNICOS E ANEUGÊNICOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL DE AGRICULTORES EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS.....	240



## TERAPÊUTICA ANTIBACTERIANA NO TRATAMENTO DE BACTEREMIA POR *Staphylococcus aureus*

Elaine Cristina Birssi<sup>1</sup>; Daniela Dambroso Altafini<sup>2</sup>; Felipe Carnaval Costa<sup>3</sup>; Jhonny Kendy Okuma<sup>3</sup>; James Albiero<sup>4</sup>; Rafael Renato Brondani Moreira<sup>5</sup>; Fabrícia Gimenes<sup>6</sup>; Samara Felicia da Silva<sup>1</sup>; Patrícia de Mattos Andriato<sup>7</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup>Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário Regional de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Assistência Farmacêutica (PROFAR), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, PR

<sup>6</sup>Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>7</sup>Farmacêutica Clínica, Hospital Universitário Regional de Maringá, Maringá, PR

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

### 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo, que tem sido encontrado colonizando a pele e membranas mucosas de 40% dos indivíduos. De acordo com o perfil de susceptibilidade à oxacilina, os isolados de *S. aureus* podem ser classificados em sensível ou resistente à oxacilina (OSSA ou ORSA), sendo importantes patógenos de interesse médico e responsáveis por diversas manifestações clínicas, desde quadros simples a potencialmente fatais (1, 2).

Diferenciar se a infecção de corrente sanguínea (ICS) é causada por ORSA ou OSSA, é importante para escolha terapêutica, pois essa distinção representa importantes implicações clínicas. A escolha da terapêutica antibacteriana para um determinado paciente, depende de diversos parâmetros associados ao microrganismo, à doença ao paciente, resistência bacteriana, gravidade clínica, comorbidades e permanência hospitalar (2).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou alta prioridade (grupo 2) para cepas ORSA e com sensibilidade intermediária ou resistente a vancomicina por representar uma ameaça à saúde humana principalmente se estas estão associadas a infecções graves, como bacteremia, pois podem impactar em altas taxas de morbidade, mortalidade e internações prolongadas, elevando os custos dos serviços de saúde de maneira significativa a nível mundial (3-7).

As bacteremias também chamadas de ICS é descrita pela existência de um microrganismo em uma ou mais hemoculturas que quando não tratada pode levar ao quadro de sepse e morte. Essa infecção pode ser adquirida em ambientes relacionados a assistência à saúde ou da comunidade, sendo *S. aureus*, um dos principais agentes destas infecções. Diversos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento desse quadro infeccioso, como o uso de dispositivos invasivos, sexo, idade dos pacientes, tipo de unidade de internação, manifestações clínicas, comorbidades e imunossupressão (8, 9).

Está bem estabelecido que cepas de OSSA, apresentam uma ampla sensibilidade a maioria dos antibacterianos, inclusive ao grupo das penicilinas antiestafilocócicas. Já os isolados de ORSA, são frequentemente multirresistentes e além da resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos podem apresentar também resistência aos antibacterianos de diferentes classes. O principal mecanismo para a resistência a oxacilina em *S. aureus*, é a produção de uma proteína ligadora de penicilina, do inglês, *penicillin-binding protein* (PBP) alterada, com baixa afinidade a todos os  $\beta$ -lactâmicos. A PBP é codificada pelo gene *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC*, *mecD*, *mecE*). Originalmente foi caracterizado o gene *mecA* sendo posteriormente, classificados os demais como variantes do gene *mecA* com base na similaridade da sequência nucleotídica. A ampla disseminação do gene *mecA* entre os estafilococos levou a estudos que comprovaram que este gene é

carreado por elementos genéticos móveis denominados cassetes cromossômicos estafilocócicos, *Staphylococcal Cassete Chromosome mec* (SCCmec). Atualmente, são descritos 13 tipos SCCmec nominados de (I-XIII). Para o tratamento de isolados ORSA, a vancomicina tem sido o fármaco de escolha desde os anos 80, porém, no final dos anos 90, isolados VISA (*vancomycin-intermediate S. aureus*) começaram a ser descritos, chegando até as cepas *vancomycin-resistant S. aureus* VRSA no início dos anos 2000. Estes isolados ORSA e também resistentes ou intermediários para vancomicina ainda estão em baixa frequência em todo o mundo, no entanto já são de grande preocupação pois a terapia nestes casos é extremamente complexa resultando em infecções complicadas e hospitalizações prolongadas, necessitando de novas opções terapêuticas (4, 10, 11).

Para bacteremias causadas por OSSA, o tratamento de escolha baseia-se antibacterianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente a oxacilina, devido menor nefrotoxicidade e resultados favoráveis. Para alergia a estes compostos, outros fármacos que demonstrarem efetividade *in vitro* poderão ser utilizados. Já para ICS por ORSA, o tratamento é direcionada na administração de vancomicina ou daptomicina (13). Outros antimicrobianos como a Linezolida, uma oxazolidinona bacteriostática, e a ceftarolina uma cefalosporinas de quinta geração, são indicados para tratar ICS por ORSA quando os fármacos de primeira escolha são contraindicados, visando obter mais opções terapêuticas no âmbito da monoterapia ou terapia combinada, almejando a obtenção de sucesso terapêutico, aumento da sobrevida, ausências de sintomas, erradicação microbiológica e a inexistência de novas complicações ou focos metastático (12).

Considerando a importância do conhecimento da terapêutica utilizada em relação microrganismos envolvidos nas ICS, o objetivo desse trabalho foi analisar a frequência do isolados de ORSA e OSSA recuperado de ICS e avaliar os antibacterianos utilizados no tratamento de pacientes com essas infecções.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Tipo e local do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional, realizado no Hospital Regional de Maringá (HUM). Uma instituição pública de saúde, que dispõe de 173 leitos em sua totalidade, oferecendo serviços médicos gerais e avançados de diagnóstico, voltado para o atendimento da população de Maringá e região.

### 2.2. Seleção e coleta dos dados

Foram incluídos no estudo todos os pacientes  $\geq 18$  anos, de ambos os sexos e admitidos nos diversos setores do HUM durante o período compreendido entre janeiro 2013 a dezembro 2021, com diagnóstico positivo de bacteremia para *S. aureus* resistente ou sensível à oxacilina (ORSA ou OSSA). Os dados clínicos gerais dos pacientes selecionados, a prescrição de antibacterianos, identificação das bactérias e o perfil de sensibilidade dos antibacterianos testados foram adquiridos através da plataforma de prontuários eletrônicos (GSUS) e viabilizado pelo Laboratório de Análises Clínicas do LAC/HUM por meio dos equipamentos automatizados BD BACTEC™ FX e a identificação microbiológica pelo BD Phoenix™ (BD *Diagnostic Systems, Sparks, MD*).

### 2.4. Processamento e análise de dados

Os dados obtidos foram organizados em planilhas utilizando o Microsoft Excel 2007 (*Microsoft®*) e posteriormente analisados pelo SPSS (*Statistics*), versão 23.0 para Windows (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) e Minitab®-18 (*Statistical Software*). Realizou-se análises para identificar a ocorrência de infecção por ORSA e OSSA, utilizando os testes de qui-quadrado, ou exato de Fisher, em caso de variáveis categóricas e o teste Mann-Whitney, em caso de variáveis contínuas. Os dados foram considerados significantes se as variáveis apresentarem um valor de  $p < 0,05$ . O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEM (parecer 2.093.342/CAAE 63610816.0.0000.0104 e parecer 4.808.018/CAAE 47908021.9.0000.0104).

## 3. RESULTADOS

Foram identificados 147 pacientes com diagnóstico de bacteremia relacionada a *S. aureus* como agente causal, entre janeiro de 2013 e dezembro 2021. Destes, 42 foram excluídos por apresentarem idade  $< 18$  anos e outros 7 pela ausência de identificação de antibacterianos prescritos durante o período de internação, impossibilitando a análise terapêutica antibacteriana. Dos 98 pacientes restantes, 22 foram incluídos no grupo de pacientes com bacteremia ORSA e 76 no grupo de pacientes com bacteremia OSSA.

Avaliando as seguintes variáveis (gênero, idade, diagnóstico inicial, unidade de internação, e desfecho), verificou-se que não houve distinção entre gênero para os grupos ORSA e OSSA assim como idade, diagnóstico inicial e desfecho, porém na análise da variável “unidade de internação” verificou-se uma diferença significativa de pacientes com ICS-ORSA ou ICS-OSSA. Na clínica médica a maioria das ICS foram por ORSA ( $p < 0,045$ ) e o pronto atendimento eram OSSA ( $p < 0,014$ ).

Todos os isolados de *S. aureus* avaliados neste estudo, independentemente da sensibilidade a oxacilina, foram 100% sensíveis vancomicina, linezolida e daptomicina. Para o antibacteriano sulfametoxazol-trimetoprima 95,9% foram sensíveis e para a oxacilina a sensibilidade ocorreu em 77,6% dos isolados de *S*

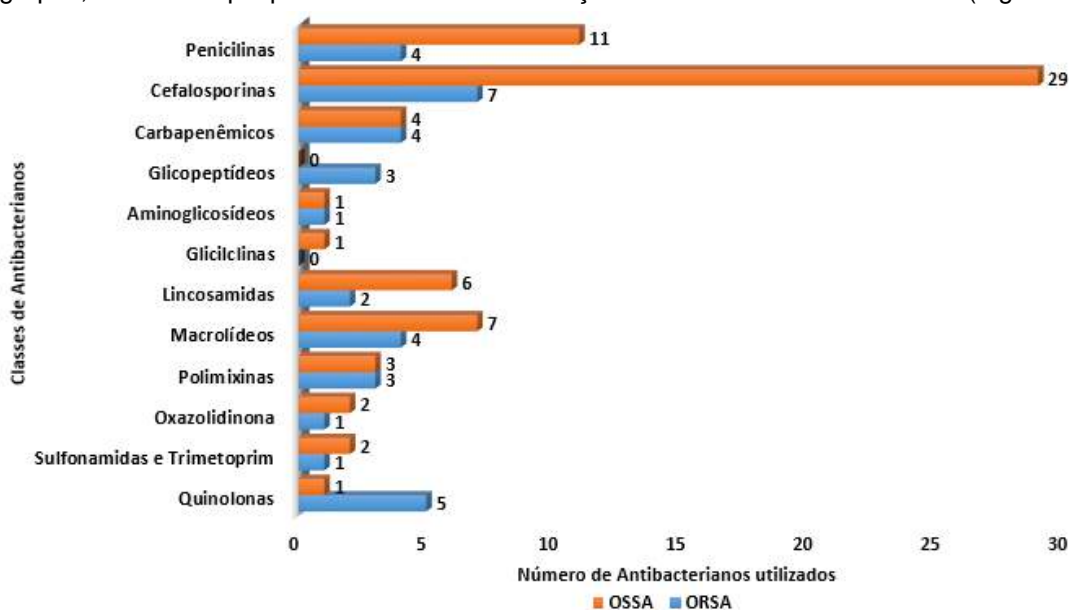
*aureus*. Além desses fármacos citados, podemos evidenciar a presença da ceftarolina com sensibilidade 44,9% para todos os isolados testados de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1. Perfil de sensibilidade dos antibacterianos de 98 isolados de *S. aureus* (ORSA e OSSA) de pacientes com bacteremia referente aos anos de 2013 a 2021.**

Antibacterianos	Nº isolados			
	testados	Sensível(%)	Intermediário(%)	Resistente(%)
Oxacilina	98	77,6	0	22,4
*Vancomicina	98	100	0	0
Ceftarolina	45	44,9	0	1
Ampicilina	36	0	0	36,7
Ciprofloxacina	96	64,3	18,4	15,3
Cloranfenicol	21	35,7	0	31,6
Clindamicina	82	23,5	0	14,3
Sulfametoxazol-trimetoprima	97	95,9	0	3,1
*Linezolida	98	100	0	0
Tigeciclina	96	96	0	2
Eritromicina	98	39,8	2	58,2
Gentamicina	19	19,4	0	0
*Daptomicina	98	100	0	0
Minociclina	95	95,9	1	0
Penicilina	88	1	0	88,8
Teicoplanina	22	22,4	0	0
Rifamicina	78	79,6	0	0
Tetraciclina	51	49	1	2
Quinupristina/Dalfopristina	36	36,7	0	0

ORSA: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina; OSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina.

Foi observado que 37,8% (37/98) dos pacientes que receberam tratamento antibacteriano empírico, ou seja, sem o resultado do laudo microbiológico, a classe das cefalosporinas foi mais utilizada em ambos os grupos, com destaque para o ICS-OSSA em relação as demais classes descritas (Figura 1).



**Figura 1. Disposição das classes de antibacterianos prescritas ao tratamento empírico relacionado ao perfil de sensibilidade dos microrganismos ORSA e OSSA em bacteremia.**

ORSA: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina; OSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina.

Este estudo identificou que vancomicina 40,9%, oxacilina 30,3%, daptomicina 22,7%, linezolida 22,7%, meropenem 18,2%, piperacilina + tazobactam 14,5% e ceftriaxona 11,8% foram os antibacterianos prescritos com maior frequência para o tratamento contra bacteremias causadas por ORSA ou OSSA. Os pacientes com isolados de ORSA utilizou mais vancomicina e daptomicina ao comparar com pacientes que apresentou isolados OSSA ( $p < 0,002$ ). Já os pacientes com OSSA utilizou consideravelmente oxacilina após a liberação do laudo ao comparar com o grupo ORSA ( $p < 0,001$ ), conforme a tabela 2 dispõe os dados.

**Tabela 2. Tratamento antibacteriano direcionado posteriormente ao resultado de cultura segundo o perfil de sensibilidade de isolados de ORSA e OSSA.**

Variáveis	ORSA n=22 (%)	OSSA n=76 (%)	Valor-p
<b>Penicilinas</b>			
Ampicilina	2 (9,1)	2 (2,6)	0,217
<b>Oxacilina</b>	<b>0</b>	<b>23 (30,3)</b>	<b>0,001</b>
Piperacilina + Tazobactam	2 (9,1)	11 (14,5)	0,726
Ampicilina + Sulbactam	0	1 (1,3)	1,000
<b>Cefalosporinas</b>			
Ceftazidima	1 (4,5)	2 (2,6)	0,538
Ceftriaxona	1 (4,5)	9 (11,8)	0,449
Cefepima	1 (4,5)	4 (5,3)	1,000
<b>Carbapenêmico</b>			
<b>Meropeném</b>	<b>4 (18,2)</b>	<b>2 (2,6)</b>	<b>0,022</b>
<b>Glicopeptídico e lipopeptídico</b>			
<b>Vancomicina</b>	<b>9 (40,9)</b>	<b>8 (10,5)</b>	<b>0,002</b>
<b>Daptomicina</b>	<b>5 (22,7)</b>	<b>1 (1,3)</b>	<b>0,002</b>
<b>Aminoglicosídeos</b>			
Amicacina	1 (4,5)	4 (5,3)	1,000
Gentamicina	1 (4,5)	1 (1,3)	0,400
<b>Gliciliciclina</b>			
Tigeciclina	0	3 (3,9)	1,000
<b>Lincosamida</b>			
Clindamicina	0	3 (3,9)	1,000
<b>Macrolídeo</b>			
Eritromicina	0	1 (1,3)	1,000
<b>Polimixinas</b>			
Polimixina B	1 (4,5)	4 (5,3)	1,000
<b>Oxazolidinona</b>			
Linezolida	5 (22,7)	6 (7,9)	0,117
<b>Sulfonamida e Trimetoprim</b>			
<b>Sulfametoxazol + trimetoprim</b>	<b>2 (9,1)</b>	<b>0</b>	<b>0,049</b>
<b>Quinolona</b>			
Ciprofloxacino	1 (4,5)	3 (3,9)	1,000

ORSA: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina; OSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a oxacilina.

#### 4. DISCUSSÃO

Até a década de 1990, era comum a maioria das infecções por ORSA estarem concentradas apenas em ambientes hospitalares sendo as comunitárias associadas a OSSA. Esse cenário mudou e na atualidade temos isolados de ORSA tanto em quadros infecciosos de origem hospitalar quanto na comunidade. Esses pacientes quando procuram atendimento hospitalar, normalmente são direcionados para a clínica médica ou atendimentos emergenciais de acordo com a gravidade do caso (2, 3).

Quando avaliados fatores como gênero, idade, diagnóstico inicial, unidade de internação e desfecho, foram encontrados dados significante apenas em relação a unidade de internação hospitalar sendo a clínica médica para ORSA e o pronto atendimento para OSSA. Embora a Unidade de Terapia Intensiva seja o setor com maior prevalência de bactérias resistentes, em nosso estudo assim como em um Hospital da capital de Minas Gerais, Brasil, a clínica médica foi a unidade hospitalar mais importante para pacientes com ICS -ORSA (14).

Ao analisar o perfil de susceptibilidade aos antibacterianos dos 98 isolados de *S. aureus*, o perfil predominante observado neste estudo, indicou 100% de sensibilidade à vancomicina, linezolida e daptomicina, para tigeciclina 96% eram sensíveis seguida de sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) e minociclina com 95,9% e oxacilina com 77,6% de sensibilidade (15).

Empiricamente 37,7% de todos os pacientes com bacteremia por *S. aureus*, receberam terapêutica antibacteriana de diversas classes, destacando a cefalosporina, que vai de encontro com o perfil de sensibilidade dos isolados testado, pois 77,6% ainda apresentaram sensibilidade a oxacilina e consequentemente aos demais  $\beta$ -lactâmicos (15, 19).

Nos últimos 40 anos, a resistência aos antibacterianos, particularmente a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, vem impactando a terapia antibacteriana. Fármacos mais novos como a ceftarolina, e outros mais antigos como SXT, demonstram boa efetividade contra isolados ORSA. A ceftarolina é uma cefalosporina de quinta geração, e apresenta afinidade de ligação tanto para PBP quanto para PBP2A alterada, justificando assim sua atividade tanto para OSSA quanto para ORSA (21). Neste estudo os resultados para os 45 isolados testados 44,9% foram sensíveis a ceftarolina. Em nosso hospital, este fármaco não está padronizado para uso rotineiro. Surpreendentemente, houve a detecção de apenas 3,1% de isolados resistência a SXT, podendo ser uma ótima opção terapêutica, principalmente no tratamento empírico, pois segundo Nurjadi et



al. (2021), SXT é pouco utilizada, sendo considerada uma valiosa opção terapêutica de baixo custo e poucos efeitos colaterais.

Dos 76 isolados de OSSA oriundos de hemoculturas, apresentou susceptibilidade variada a todas as classes de antibacterianos e os pacientes foram tratados com oxacilina 30,3%, piperacilina + tazobactam 14,5%, ceftriaxona 11,8% e um valor consideravelmente alto de vancomicina 10,5%, podendo influenciar diretamente em resultados clínicos adversos (16, 18).

Os 22 isolados de ORSA, provenientes de hemoculturas, foram sensíveis aos glicopeptídeos e oxazolidinona em 100%, e estes pacientes foram tratados com vancomicina 40,9%, daptomicina e linezolida 22,7%. Para os demais 36,4% não valorizaram o laudo da hemocultura e trataram os pacientes com ICS-ORSA com antibacterianos sem atividade (17).

O presente estudo ainda vai avaliar a importância da valorização do laudo de antibiograma e seu impacto na alta hospitalar e no óbito dos pacientes com ICS por *S. aureus*. Desta forma melhores conclusões poderão ser tiradas quanto a melhor terapêutica para ICS-ORSA e ICS-OSSA.

## 5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo possibilitaram conhecer o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos *S. aureus* isolados ICS, além dos principais antibacterianos utilizados tanto empiricamente quanto durante a infecção. Esses dados já nos permitiram observar que em muitos casos houve o uso empírico de fármacos com pouca atividade contra *S. aureus* mesmo direcionados após o laudo microbiológico. A análise do desfecho destes pacientes ainda será avaliada e nos permitirá verificar além de quais terapias foram mais utilizadas, também as que foram mais efetivas, assim os dados possibilitarão contribuir para sucesso terapêutico no tratamento das bacteremia por *S. aureus*.

## FINANCIADORES

CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os professores, alunos e colaboradores do Departamento de Ciências Básicas da Saúde e do Laboratório de Microbiologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Nascimento BJ, Carstensen S. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina: uma análise da presença na microbiota nasal de estudantes de saúde em período de estágio. RBAC. 2022 Mar; 53(4):411-417.
2. Santos SCGS, Baroni LN, Neta MRAA, Leal-Baldino TC, Andrade-Figueiredo M. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Brazil: high frequency of international epidemic pandemic clones, CA-MRSA and perspectives. Brazilian Journal of Development. 2021 Mai; 7(4):35734-35751.
3. World Health Organization. Who publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needs. 2017. [Acesso em 27 Jul 2022]. Disponível em <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
4. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations – a review of recent developments in MRSA management and treatment. Critical Care. 2017;(21) 211.
5. Yousefi M, Fallah F, Arshadi M, Pourmand MR, Hashemi A, Pourmand G. Identification of tigecycline- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among patients with urinary tract infection in Iran. New Microbes New Infect. 2017 May; 24(19):8-12.
6. John J Jr. The treatment of resistant staphylococcal infections. F1000Res. 2020 Feb; 26(9).
7. Mühlberg E, Umstätter F, Kleist C, Domhan C, Mier W, Uhl P. Renascimento da vancomicina: abordagens para quebrar a resistência aos antibióticos em bactérias multirresistentes. Can J Microbiol. 2020 Jan; 66(1):11-16.
8. Liang BS, Huang YM, Chen YS, Dong H, Mai JL, Xie YQ et al. Antimicrobial resistance and prevalence of CvfB, SEK and SEQ genes among *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients with bloodstream infections. Experimental and Therapeutic Medicine. 2017 jul; 14(5):5143-5148.
9. Lisowska-Lysiak K, Lauterbach R, Miedzobrodzki J, Kosecka-Strojek. Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: a Review. Polish Journal of Microbiology. 2021 jan; 70(1):13-23.
10. Lakhubdi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. Clinical microbiology reviews. 2018 set; 31(4):e00020-18.

11. Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, Belkum AV, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. Scientific reports. 2020 jul; 10(1):1-16.
12. Rose W, Fantl M, Geriak M, Nizet V, Sakoulas G. Current Paradigms of Combination Therapy in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Bacteremia: Does it Work, Which Combination, and For Which Patients?. Clin Infectious Diseases. 2021 mai; 73(12):2353-2360.
13. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clinical infectious diseases. 2011; 52(3):18-55.
14. Porto JP, Santos RO, Gontijo Filho PP, Ribas RM. Active surveillance to determine the impact of methicillin resistance on mortality in patients with bacteremia and influences of the use of antibiotics on the development of MRSA infection. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2013; 46: 713-718.
15. Schwalb A, Cachay R, de la Flor A, Garcia C, Seas C. Adherence to standars of care and mortality in the management of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Peru: A prospective cohort study. International Journal of Infectious Diseases. 2020: 601-606.
16. McDanel JS, Perencevich EN, Diekema DJ, Herwaldt LA, Smith TC, Chrischilles EA. Comparative effectiveness of beta-lactams versus vancomycin for treatment of methicillin-suceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections among 122 hospitals. Clin Infect Dis. 2015 aug; 1(61):361-367.
17. John Jr J. The treatment of resistant staphylococcal infections. F1000 Research. 2020: 9.
18. Rybak MJ, Le J, Lodise T, Levine D, Bradley J, Liu C, et al. Executive Summary: Therapeutic Monitoring of Vancomycin for Serious Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Revised Consensus Guideline and Review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. J Pediatric Infect Dis Soc. 2020 Jul 13;9(3):281-284.
19. Murphy M, Girdwood ST, Scheetz MH. Clinical Guideline Highlights for the Hospitalist: Therapeutic Monitoring of Vancomycin. J Hosp Med. 2020 Dec;15(12):740-742.
20. Nurjadi D, Chanthalangsy Q, Zizmann E, Stuermer V, Moll M, Klein S et al. Phenotypic Detection of Hemin-Inducible Trimethoprim-Sulfamethoxazole Heteroresistance in *Staphylococcus aureus*. 2021: 9(2):e01510-21.
21. Piérard D, Stone GG. In vitro activity of ceftaroline and comparators against bacterial isolates collected globally from patients with skin infections. Journal of global antimicrobial resistance. 2021 set 26:4-10.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; bacteremia; tratamento antimicrobiano.



## ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS COMBINADO A VERAPAMIL EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Andressa Araújo Machado do Nascimento<sup>1</sup>; Carolina Trevisolli Palomo<sup>2</sup>; Letícia Sayuri Murase<sup>2</sup>; Gabriella Leticia Bonone<sup>2</sup>; Giulienne Karla Pereira da Silva<sup>3</sup>; Jean Eduardo Meneguelo<sup>4</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>5</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>5</sup>; Kattiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>5</sup>, Rosilene Fressatti Cardoso<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 Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup> Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Laboratório de Bacteriologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup> Pesquisador do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup> Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: dessamachado@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Mycobacterium* spp. estão implicadas em diversas doenças de importância clínica e epidemiológica, como a tuberculose (TB), que antes da epidemia de COVID-19 era a principal causa de morte por único agente infeccioso no mundo (1). Além da TB, outras infecções causadas por diferentes espécies desse gênero (chamadas de micobactérias não tuberculosas - MNTs), que são as micobacterioses, apresentam incidência crescente de casos nos últimos anos bem como aumentada complexidade de tratamento. Por causarem infecções oportunistas, alguns fatores de risco são frequentemente associados às micobacterioses, como imunocomprometimento, alterações morfológicas e genéticas do hospedeiro, o que agrava os casos (2–4). Entretanto, indivíduos imunocompetentes também podem ser acometidos pelas micobactérias não tuberculosas (MNTs), que causam infecções de difícil tratamento e de longa duração (5–7).

Diferente da TB, cuja transmissão ocorre principalmente pela inalação de aerossóis contaminados com *Mycobacterium tuberculosis* expelidos diretamente pelo indivíduo com TB, as infecções por MNTs são adquiridas preferencialmente por aerossóis de origem ambiental (8). Deste modo, um fator agravante é que as MNTs são microrganismos ubiqüitários, podem ser encontrados na água, no solo, na microbiota humana, bem como em biofilmes, assim, podem colonizar diferentes superfícies, compor potenciais fômites ou fazer parte de aerossóis de origem ambiental (2,9,10). Além disso, podem também ter transmissão direta entre indivíduos, bem como ser inoculadas de forma iatrogênica quando há quebra da barreira cutânea/mucosa em procedimentos invasivos, como cirurgias e intervenções estéticas (3,9–12).

Ademais, as MNTs apresentam resistência intrínseca à grande parte dos antimicrobianos disponíveis (4,12,13). A parede celular do *Mycobacterium* é considerada um fator potencial para esse efeito, pois sua composição lipídica, rica em ácidos micólicos e com presença de bombas de efluxo dificultam a entrada de fármacos bem como facilitam a expulsão desses favorecendo a resistência (14). Assim, o tratamento é longo e com poucas opções terapêuticas, sendo recomendado o poliquimioterápico, o qual é escolhido de acordo com a espécie de MNT identificada (11,12, 14). Apesar de existirem recomendações, não há um protocolo de tratamento bem estabelecido, como acontece para TB (15,16). Logo, a eficiência do regime terapêutico é difícil de ser estabelecida. Além disso, é comum o surgimento de efeitos adversos durante a antibioticoterapia, tais como hepatotoxicidade e problemas gastrointestinais, o que dificulta a manutenção e adesão ao tratamento e favorece a manutenção da infecção (10).

Diante do aumento do diagnóstico de infecções por MNTs, da dificuldade de estabelecer um tratamento eficiente, e da necessidade de se buscar alternativas terapêuticas, testar combinações antimicrobianas, assim como inserir substâncias com potencial de sinergismo com os medicamentos em uso é uma necessidade. Apesar da ampla variedade de MNTs, não há número proporcional de opções terapêuticas farmacológicas disponíveis, desse modo, algumas classes de antibióticos são usadas com frequência no tratamento, como macrolídeos e aminoglicosídeos. Dentro destas classes destacam-se a claritromicina (CLA) e a amicacina (AMK) respectivamente, que tem uso já consolidado para uma ampla variedade de MNTs (14). Entretanto, nem sempre eles são capazes de suprimir o crescimento bacteriano como esperado, sendo necessária a inclusão de outros fármacos. Assim, a clofazimina (CFZ), um fármaco usado majoritariamente para o tratamento da hanseníase, vem sendo empregada com resultados promissores em MNTs (18,19).

Ainda ao encontro da estratégia de combinação de antibióticos, para evitar falha no tratamento podem ser usados outros fármacos com ação coadjuvante, que apesar de sozinhos não serem viáveis no tratamento, podem contribuir para evitar o surgimento de resistência mutacional e/ou melhorar a biodisponibilidade dos antimicrobianos. Neste sentido, o Verapamil (VP), um fármaco amplamente disponível na rede de atenção básica em saúde brasileira, apresenta potencial de favorecer o tratamento de MNTs ou servir de modelo para substâncias semelhantes (21). Apesar de tradicionalmente usado para tratamento de hipertensão, ele vem apresentando resultados promissores em combinação com outros fármacos, com possível ação em bombas de efluxo (20, 21). Deste modo, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana das combinações dos antimicrobianos AMK, CLA ou CFZ com VP, em isolados clínicos de MNTs com potencial patogênico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Inóculo bacteriano**

Foram utilizadas para o estudo as cepas de referência de crescimento rápido *Mycobacterium smegmatis* (mc<sup>2</sup> 155), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977) e isolados clínicos de *M. smegmatis*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum*. Todas as cepas e isolados foram provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Este estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A6BDC59.

Para o experimento, as MNTs foram semeadas em Mueller Hinton Broth (Laboratórios Conda SA, Spain) cátion ajustado (MHBCa) com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), incubados por 3 dias a 30°C. Foram preparadas suspensões bacterianas padronizadas com espectrofotômetro de acordo com a escala de McFarland 0,5 e diluídas 1:200 em MBHCa (22). Para cada placa de 96 poços foi preparada uma suspensão bacteriana, cada poço recebeu 100 µl dela após a diluição dos fármacos.

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

A determinação da CIM para cada fármaco foi realizada pelo método *resazurin broth microdilution assay* (25), em triplicata, com repiques independentes para confirmação dos resultados. Foram usados os fármacos AMK, CLA, CFZ e VP, adquiridos da Sigma Aldrich, diluídos de acordo com as recomendações do fabricante. As diluições dos fármacos em placa e padronização do inóculo bacteriano foram realizadas em MHBca de acordo com as recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) para MNTs (22). Como controle de qualidade, foi realizado concomitantemente um experimento de CIM do fármaco ciprofloxacino para a cepa padrão *Staphylococcus aureus* (23).

Para determinação da CIM, os fármacos foram diluídos em razão 2 em microplaca com MHBca. Após diluição seriada foi adicionado 100 µl do inóculo bacteriano previamente padronizado. As microplacas foram incubadas por três dias a 30°C, em seguida adicionado 30 µl de solução de resazurina (0,02% Sigma- Aldrich) em cada orifício contendo as diluições dos fármacos. A leitura para realização da determinação da CIM foi realizada após 24h da adição de resazurina (22, 24). A menor concentração de fármaco onde foi observada a manutenção da cor azul da resazurina foi considerado a CIM.

### **2.4. Avaliação de sinergismo por checkerboard**

Para todos os isolados e cepa padrão, foi avaliado em triplicata a atividade combinada dos antimicrobianos com VP, pela técnica de *checkerboard* bidimensional (25). Assim como na determinação da CIM, foi utilizado meio MHBca para diluição dos fármacos e preparo do inóculo bacteriano. Foi realizado a diluição do VP (Fármaco A) a partir da coluna 11 até a coluna 3 e o antimicrobiano (Fármaco B), diluídos a partir da linha A até a linha G. Os orifícios da coluna 2 e linha H receberam diluições seriadas com fármacos isoladamente não combinadas, dos antimicrobianos e do VP, respectivamente. Em seguida o inóculo foi padronizado na mesma proporção usada para CIM e adicionado 100 µL em cada orifício da microplaca contendo as diluições seriadas de cada fármaco isoladamente e em combinação.

A ação combinada dos fármacos foi avaliada pelo Índice da Fração Inibitória (IFI), de acordo com a fórmula  $IFI = (CIM A + B / CIM A) + (CIM B + A / CIM B)$ , onde: CIM A+B representa a menor CIM do fármaco A quando associada ao fármaco B; CIM B + A representa a menor CIM do fármaco B quando associada ao fármaco A; CIM A e CIM B representa a CIM do fármaco A e do fármaco B quando testado isolados, respectivamente. Quando  $\sum IFI \leq 0,5$ , o efeito foi considerado sinérgico, em  $\sum IFI > 0,5 - 4$  os fármacos foram classificados com interação aditiva ou indiferente e para  $\sum IFI > 4$  o efeito foi classificado como antagônico (25).

Para avaliar o efeito modulador do VP (fármaco A) sobre a atividade dos antimicrobianos (fármacos B) nos isolados, foi calculado o fator de modulação (FM), pela fórmula  $FM = CIM B / CIM B + A$ . O FM reflete a redução na CIM de um determinado antimicrobiano quando combinado com outro composto. Uma redução de quatro vezes ou mais na CIM de um antimicrobiano combinados com outro fármaco é considerada significativa ( $FM \geq 4$ ) (21).

### 3. RESULTADOS

A CIM de AMK, CLA, CFZ e VP foram determinadas em 8 isolados clínicos e duas cepas padrões e os resultados são apresentados na Tabela 1. AMK apresentou atividade antimicrobiana entre 4 e 0,06 µg/mL, CLA teve efetividade entre 2 e 0,06 µg/mL, CFZ entre 2 e 0,012 µg/mL e VP teve ação isolada em concentrações maiores, entre 1024 e 256 µg/mL (Tabela 1).

Na avaliação de sinergismo entre os fármacos e modulação de VP sobre os antimicrobianos, alguns resultados ainda não foram conclusivos até o momento. Entretanto, nos resultados concluídos, pode-se perceber ação sinérgica entre VP e AMK em *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *chelonae*, e *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Também entre VP e CLA no isolado *M. abscessus* subsp. *bolletii* e entre VP e CFZ nos isolados de *M. smegmatis*, *M. chelone*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. fortuitum* (Tabela 2).

Em relação a ação modulatória causada por VP (FM) nos antimicrobianos estudados, observamos valores de  $FM \geq 4$  em um número expressivo dos isolados clínicos estudados, como pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima de amicacina, claritromicina, clofazimina e verapamil em micobactérias não tuberculosas**

Isolados	CIM(µg/mL)			
	AMK	CLA	CFZ	VP
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	0,06	2	0,12	512
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	4	0,12	2	1024
<i>M. smegmatis</i> 1	0,12	1	0,5	256
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	0,06	0,5	0,12	256
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	0,06	1	0,25	256
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	8	0,06	0,25	256
<i>M. chelonae</i>	0,25	1	1	512
<i>M. fortuitum</i> 1	0,06	2	0,12	512
<i>M. fortuitum</i> 2	1	1	1	256
<i>M. fortuitum</i> 3	1	2	0,5	512

CIM: concentração inibitória mínima; AMK: amicacina; CLA: claritromicina; CFZ: clofazimina; VP verapamil.

**Tabela 2. Avaliação da ação combinada de antimicrobianos amicacina, claritromicina e clofazimina com verapamil por índice de fração inibitória e fator de modulação**

Isolados	AMK+VP		CLA+VP		CFZ+VP	
	IFI	FM	IFI	FM	IFI	FM
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*
<i>M. abscessus</i> (ATCC 19977)	1	2	1,5	1	NC*	NC*
<i>M. smegmatis</i>	0,75	4	NC*	NC*	<b>0,37</b>	<b>8,3</b>
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	0,5	4	NC*	NC*	NC*	NC*
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	1	2	NC*	NC*	NC*	NC*
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<b>0,375</b>	<b>4</b>	<b>0,24</b>	<b>8,5</b>	<b>0,375</b>	<b>4,2</b>
<i>M. chelonae</i>	<b>0,185</b>	<b>16,7</b>	NC*	NC*	<b>0,24</b>	<b>8,3</b>
<i>M. fortuitum</i> 1	0,75	2	NC*	NC*	<b>0,375</b>	<b>4</b>
<i>M. fortuitum</i> 2	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*
<i>M. fortuitum</i> 3	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*

IFI: Índice de fração inibitória; FM: fator de modulação; \*NC: Resultado ainda não concluído; AMK: amicacina; CLA: claritromicina; CFZ: clofazimina; VP verapamil.

#### 4. DISCUSSÃO

A ação de VP é atribuída a sua capacidade de inibir bombas de efluxo, aumentando a concentração intracelular de outros fármacos e, conseqüentemente, melhorando a atividade desses fármacos (21). Este fenômeno implicaria numa diminuição nas taxas de mutação que naturalmente ocorrem na exposição a antimicrobianos. Apesar de ser considerado um inibidor de bomba de efluxo clássico, ainda há dúvida quanto ao mecanismo de ação do VP. Há indícios de que VP desestabilize o potencial energético de membranas celulares e estudos demonstram sua capacidade de inibir bombas de efluxo bacteriana (31). Neste sentido, o estudo da ação de VP em potencializar a atividade de alguns antimicrobianos desafia os pesquisadores em várias áreas. Por isso o presente estudo vem demonstrar a atividade do VP na modulação de atividade dos fármacos mais utilizados no tratamento de MNTs como AMK, CLA e CFZ.

No presente estudo observou-se valores de CIM de AMK, CLA e CFZ coerentes com os resultados presentes na literatura (23, 30). Quanto ao VP, não há muitos trabalhos relatando sua CIM em *Mycobacterium* sp., porém, os que já foram publicados relatam valores altos, próximos ao encontrado (26). Em relação às combinações testadas, foi estabelecida relação de sinergismo entre AMK e VP para os isolados *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *chelonae*. Para os isolados *M. smegmatis*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* foi observado uma redução da CIM 4 vezes para AMK quando associada ao VP, demonstrando uma possível atividade modulatória do VP para com AMK. Chama a atenção que para o isolado de *M. smegmatis*, a ação de AMK com VP não foi sinérgica a princípio, porém o FM mostrou que VP diminuiu a CIM de AMK significativamente. Ainda, a combinação AMK com VP foi capaz de reduzir a CIM de AMK em 16,7 vezes no isolado *M. chelonae*, um resultado bastante expressivo.

A combinação de AMK e VP não foi sinérgica na cepa *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977, e nos isolados clínicos, *M. abscessus* subsp. *massiliense* e *M. fortuitum* 1. Entretanto, na literatura encontramos que o uso combinado de VP com AMK reduziu a CIM de AMK em 4 vezes em *M. abscessus* subsp. *abscessus* (ATCC19977) (27). A CIM de AMK em *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RV e em isolados clínicos de *M. tuberculosis* também foi relatada como 4 vezes menor na presença de VP, que apesar de ser uma espécie diferente, corrobora com o potencial de VP combinado com AMK (28). Todavia, até o momento não encontramos resultado significativo para esta combinação.

Para a combinação CLA com VP, o sinergismo foi observado somente em *M. bolletii*. Neste mesmo isolado clínico observamos que VP foi capaz de reduzir 8,5 vezes o valor da CIM de CLA. A mesma combinação, no trabalho de Ramis et al (2019), porém estudando *M. tuberculosis*, não apresentou FM significativo (27). Em *Mycobacterium avium*, há achados que demonstram que a resistência à CLA é reduzida

na presença de VP (29). Estes achados indicam que o VP contribui para o tratamento de doenças causadas por micobactérias com CLA.

Na combinação de CFZ com VP, os resultados da atividade de sinergismo foram bem animadores, foi observada sinergia destes dois fármacos na ação em *M. smegmatis*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* 1. O antimicrobiano que teve uma melhor atividade modulatória quando combinado com VP em um número maior de MNT foi CFZ com redução da CIM no valor de 4 a 8,3 em 4 isolados clínicos estudados até o momento (*M. smegmatis*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* 1).

Na literatura, quando testado a atividade de VP em *M. tuberculosis in vitro*, este potencializa a atividade de CFZ e diminui a taxa de mutações que levam a resistência bacteriana a este medicamento que vem sendo usado para tratar pacientes com resistência a outros fármacos anti-TB (26, 30). Entretanto, *in vivo*, em modelo murino, o VP parece não apresentar atividade de potencializar a ação de CFZ administrada sozinha. Por outro lado, em esquemas terapêuticos multidroga, no qual CFZ está incluída no esquema com outros fármacos, o VP potencializou o resultado do tratamento e diminuiu a taxa de recidiva nos animais (26).

## 5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que o VP tem potencial como coadjuvante no tratamento de MNTs, apesar de isoladamente não representar uma alternativa de tratamento como um antibiótico. Destacamos aqui a ação combinada de VP com AMK, CLA e CFZ. Estas combinações se mostraram sinérgicas, com modulação de VP significativa, na maioria dos isolados com resultado conclusivo até o momento. Vale ressaltar que os resultados são dados preliminares com um reduzido número de isolados clínicos e estes resultados precisam ser validados ampliando o número de isolados.

## FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos professores e colegas do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

**Palavras-chave:** micobactéria não tuberculosa; verapamil; tratamento.

## REFERÊNCIAS

1. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
2. Swenson C, Zerbe CS, Fennelly K. Host Variability in NTMDisease: Implications for ResearchNeeds. *Front Microbiol.* 2018;9(December).
3. Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR, Riabova O, Makarov V, Pasca MR. Mycobacterium abscessus, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
4. Liu Y, Tan Y, Islam MM, Cao Y, Lu X, Zeng S, et al. Assessment of Clofazimine and TB47 Combination Activity against Mycobacterium abscessus Using a Bioluminescent Approach. 2020;64(3):1–13.
5. Ryan K, Byrd TF. Mycobacterium abscessus: Shape shifter of the mycobacterial world. *Front Microbiol.* 2018;9(NOV):1–10.
6. Stanford J, Stanford C. Mycobacteria and their world. *Int J Mycobacteriology.* 2012;1(1):3–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2012.01.001>
7. Wassilew N, Hoffmann H, Andrejak C, Lange C. Pulmonary Disease Caused by Non-Tuberculous Mycobacteria. *Respiration.* 2016;91(5):386–402.
8. Radha G, Sivakumar S, Rajesh M, Selvakumar S. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1–17.
9. Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020;18(7):392–407. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>

10. Lopeman RC, Harrison J, Desai M, Cox JAG. Mycobacterium abscessus: Environmental bacterium turned clinical nightmare. *Microorganisms*. 2019;7(3).
11. Baker AW, Lewis SS, Alexander BD, Chen LF, Wallace RJ, Brown-Elliott BA, et al. Two-phase hospital-associated outbreak of mycobacterium abscessus: Investigation and mitigation. *Clin Infect Dis*. 2017;64(7):902–11.
12. Victoria L, Gupta A, Gómez JL, Robledo J. Mycobacterium abscessus complex: A Review of Recent Developments in an Emerging Pathogen. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11(April):1–8.
13. Ferro BE, Meletiadiis J, Wattenberg M, De Jong A, Van Soolingen D, Mouton JW, et al. Clofazimine prevents the regrowth of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium avium type strain exposed to amikacin and clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(2):1097–105.
14. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Jr RJW, Andrejak C, et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. 2020;56(1):1–70.
15. Egelund EF, Fennelly KP, Peloquin CA. Medications and monitoring in nontuberculous mycobacterial infections. *Clin Chest Med* [Internet]. 2015;36(1):55–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.001>
16. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). Vol. 72, *Thorax*. 2017. 1–64 p.
17. 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.
18. McGuffin SA, Pottinger PS, Harnisch JP. Clofazimine in Nontuberculous Mycobacterial Infections: A Growing Niche. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(3):1–7.
19. Bumhee Yang, Byung Woo Jhun, Seong Mi Moon, Hyun Lee, Hye Yun Park, Kyeongman Jeon, Dae Hun Kim, Su-Young Kim SJS, Charles L. Daley W-JK. Clofazimine-Containing Regimen for the Treatment of Mycobacterium abscessus Lung Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6):1–9.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos 2022. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos estratégicos em Saúde. 2022. 181 p.
21. CALEFFI-FERRACIOLI KR et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against Mycobacterium tuberculosis. *Future Microbiol*. 2019;185–194.
22. CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 2018.
23. CLSI. Appendix J. Agar Disk Elution Method for Mycobacterium haemophilum. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 2011. 57 p. Available from: [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
24. Garcia de Carvalho NF, Sato DN, Pavan FR, Ferrazoli L, Chimara E. Resazurin Microtiter Assay for Clarithromycin Susceptibility Testing of Clinical Isolates of Mycobacterium abscessus Group. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(5):751–5.
25. 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.
26. Xu J, Tasneen R, Peloquin CA, Almeida D V., Li SY, Barnes-Boyle K, et al. Verapamil increases the bioavailability and efficacy of bedaquiline but not clofazimine in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(1):1–8.
27. Ramis IB, Vianna JS, Silva Junior L, von Groll A, Ramos DF, Marçal Lobo M, et al. In silico and in vitro evaluation of tetrahydropyridine compounds as efflux inhibitors in Mycobacterium abscessus. *Tuberculosis* [Internet]. 2019;118(February):101853. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.07.004>
28. 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;6(APR):1–12.
29. Rodrigues L, Sampaio D, Couto I, Machado D, Kern W V., Amaral L, et al. The role of efflux pumps in macrolide resistance in Mycobacterium avium complex. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(6):529–33.
30. Gupta S, Cohen KA, Winglee K, Maiga M, Diarra B, Bishai WR. Efflux inhibition with verapamil potentiates bedaquiline in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):574–6.



31. Chen C, Gardete S, Jansen RS, Shetty A, Dick T, Rhee KY. Verapamil Targets Membrane Energetics in *Mycobacterium tuberculosis*. 2018;62(5):11–3k.





## CRIAÇÃO DE UMA FERRAMENTA DE ACOMPANHAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO

**Camila Sgarioni Bertão<sup>1</sup>; Oilson Alberto Gonzatto Junior<sup>2</sup>; Gisela Myrian de Lima Leite Dalla Rosa<sup>3</sup>; Eloise Marengoni<sup>4</sup>; Kellen Caroline Faria de Souza<sup>5</sup>; Elza Kimura<sup>6</sup>.**

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

<sup>2</sup>Pós-doutorando no Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação (ICMC), Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós Graduação (Doutorado), Programa de Biociência e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>4</sup>Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>5</sup>Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>6</sup>Docente, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá.

e-mail: camila\_bertao@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas informatizados são amplamente utilizados nos hospitais, principalmente nos serviços de Farmácia, pois permitem um gerenciamento adequado da logística de medicamentos, tanto na questão da prescrição como na dispensação do mesmo, levando à redução dos custos hospitalares, racionalização da mão de obra, além de contribuir para a melhoria da segurança dos pacientes com a redução de erros envolvidos na cadeia de medicamentos (1).

A implantação de prescrições eletrônicas e sistemas informatizados ajudaram a reduzir parte dos erros e melhoraram a comunicação entre as equipes, porém ainda estão susceptíveis a erros de prescrição, principalmente onde há a necessidade de altas quantidades de medicamentos, como é o caso das unidades de terapia intensiva (UTI) (2).

As UTI são os setores que demandam de altas quantidades de medicamentos e devido à criticidade da condição de saúde do paciente, requerem sistemas dinâmicos para o acompanhamento da evolução clínica e garantia da melhor terapia para a recuperação dos pacientes. Estas ferramentas são utilizadas pelos farmacêuticos clínicos na avaliação das prescrições dos medicamentos, mas os sistemas informatizados disponíveis na maioria dos hospitais brasileiros fornecem dados clínicos, laboratoriais e de medicamentos em documentos separados, ou mesmo, apresentam alguns cruzamentos de informações, porém, ainda requerem um trabalho manual grande, gerando alta demanda de trabalho.

Esta demanda aumentou, especialmente após a pandemia pela COVID-19, onde o número de pacientes críticos mais que dobrou, enquanto que o número de profissionais com experiência clínica se manteve o mesmo, gerando uma demanda alta de tempo de serviço, com baixo rendimento e com riscos de repercussão negativos sobre o cuidado com o paciente (3). Portanto, há a necessidade urgente de criação de sistemas que utilizam algoritmos que reúnam as informações diárias sobre a evolução do paciente e que facilitem os prognósticos para garantir a agilidade da equipe no tratamento e segurança do paciente.

Vários softwares estão disponíveis e fornecem dados sobre interações medicamentosas, incompatibilidades e outras informações referentes ao medicamento, tais como o Micromedex® e Lexicomp®, porém, nenhuma dessas tecnologias faz uma análise individual da prescrição a partir de parâmetros clínicos do paciente, armazenam as informações para análises diárias e dá seguimento da evolução clínica do paciente (4). Além disso, a língua usada, na maioria das vezes, é inacessível para os países que não falam a língua inglesa. Outro fator limitante é o custo, a maioria deles é em dólar, encarecendo a aquisição.

A integração de todas estas interfaces da atuação do farmacêutico com os outros profissionais, através de algoritmos usando a inteligência artificial, permitirá que o serviço de atendimento farmacêutico resulte em benefícios e segurança para os pacientes, refletindo diretamente na redução no tempo de avaliação farmacêutica, nos custos hospitalares, na satisfação da equipe multiprofissional e

conseqüentemente, melhorando o tratamento do paciente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um aplicativo que integre todas as informações necessárias para a avaliação clínica do farmacêutico no acompanhamento dos pacientes hospitalizados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Criação do software**

Foi criado um código utilizando a Software R (R Core Team 2022) que é capaz de capturar, armazenar e processar rapidamente as informações utilizando códigos de laços de repetição conforme o nome dos medicamentos são digitados e se constam nas bases de dados de informações de medicamentos. Outro código foi criado para fornecer as informações sobre o acompanhamento farmacoterapêutico e as variações nos exames laboratoriais de cada paciente acompanhado. O algoritmo foi criado para permitir o uso em computadores, tablets e celulares. Utiliza o pacote Shiny e a extensão de arquivo RMarkdown e é editado dentro pacote MikTek para impressão formato de PDF. O aplicativo pode ser usado pelos sistemas operacionais iOS e Android.

### **2.2. Base de dados de informações de medicamentos**

Foram criados um total de 7 matrizes no aplicativo para fornecer as seguintes informações:

Matriz 1: interações de medicamento-medicamento;

Matriz 2: interações entre medicamento-alimento;

Matriz 3: reações adversas;

Matriz 4: compatibilidade intravenosa em “Y”;

Matriz 5: exames laboratoriais (valores de referência, limites superiores e inferiores);

Matriz 6: doses usuais, vias de administração, intervalo de doses e formas farmacêuticas dos medicamentos;

Matriz 7: unidades dos medicamentos, vias de administração existentes, intervalos de tempo para administração dos medicamentos;

Todas as informações foram obtidas das seguintes fontes de referências: Micromedex® Apps, Sanford Guide - Antimicrobial Therapy App, Johns Hopkins ABX Guides App, Lexicomp® Apps e lista de medicamentos no Hospital. Todas as informações da base de dados estão em português.

### **2.3. Ficha de acompanhamento farmacoterapêutico**

Campos específicos para descrição das informações clínicas diárias, medicamentos prescritos e resultados laboratoriais de cada paciente foram criados para que o farmacêutico possa realizar a sua avaliação clínica. Após a inserção de todas as informações, é possível gerar um relatório de cada paciente para acompanhamento diário durante a reunião clínica.

Foram criados vários ambientes de internação para o acompanhamento farmacoterapêutico: UTI neonatal, pediátrica, adulto e COVID, clínica médica, pediatria, clínica cirúrgica, ginecologia e obstetrícia.

Embora o presente trabalho tenha sido aprovado pelo COPEP sob protocolo nº 031/2021-COREA e segue as diretrizes da Lei Geral de Proteção de Dados (Lei nº 13.709/2018), as informações utilizadas para verificação do desempenho do aplicativo foram informações fictícias com diversos cenários baseadas na experiência dos autores e informações próprias. Na fase posterior de validação será usado os dados dos pacientes.

## **3. RESULTADOS**

O aplicativo foi criado para acesso on-line através de computador, tablet ou smartphone. O acesso é restrito e necessita de login e senha para permitir rastreabilidade e confidencialidade das informações dos pacientes. Abaixo são demonstrados exemplos das matrizes, código com laço de repetição e uma ficha de acompanhamento farmacoterapêutico (Figura 1) utilizando o código R (Figura 2).





**Figura 3. Layout do aplicativo e informações visualizadas.**

Fazem parte do aplicativo campos para preenchimento das informações dos dados antropométricos, clínicos e medicamentos prescritos, tais como: campos para a data da internação (gerando automaticamente o número de dias internados), a idade (em dias, meses ou anos), o sexo (feminino, masculino, intersex), o peso (em quilogramas), a altura (em cm), diagnóstico, anamnese, medicação de uso contínuo e alergias pré-existentes. Em seguida, digitam-se os medicamentos que o paciente estiver fazendo uso na internação, sendo que o sistema busca automaticamente quando se inicia a digitação do nome do medicamento. Devem ser preenchidos os tipos de alimentação, possíveis reações adversas que o mesmo apresentava na internação (também com opções automáticas) e observações gerais, que pode ser utilizada quando não encontrado algum medicamento ou alimento no aplicativo. A partir destas informações, já é disponibilizada uma tabela com os medicamentos, dose, unidade, via de administração e intervalo de doses usuais. Esta tabela é passível de ser alterada para doses individualizadas.

Os valores dos exames laboratoriais são inseridos e o algoritmo indica se os valores estão normais, acima ou abaixo do limite. Outro campo “Visita Multiprofissional” para anotação dos dados discutidos no dia e o campo “Intervenção Farmacêutica” para registrar as recomendações farmacêuticas foram disponibilizados.

Concluída a inserção das informações clínicas do paciente, um relatório é gerado com a relação de medicamentos prescritos, as possíveis interações existentes, reações adversas e incompatibilidades em Y entre medicamentos intravenosos.

A ferramenta criada é de fácil utilização, não necessitando de longos treinamentos para o aprendizado no uso. Ele mostrou ser útil por reunir em um único aplicativo, várias ferramentas, que são usualmente separadas em outros softwares. O aplicativo consegue, em português, gravar os dados diariamente, para ser acessado de qualquer lugar, ou qualquer dispositivo através da internet. Foram utilizados os dados dos próprios autores para simular o desempenho da ferramenta com valores fictícios de prescrição e valores laboratoriais. Embora o projeto tenha autorização do Comitê de Ética, a validação com dados reais será realizada posteriormente.

#### 4. DISCUSSÃO

Foi desenvolvido o aplicativo que integra as informações necessárias para avaliação clínica do paciente pelo farmacêutico. Os aplicativos como Micromedex® Sanford Guide - Antimicrobial Therapy App, Johns Hopkins ABX Guides App, Lexicomp® App trazem as informações dos medicamentos, monografias, porém, de forma geral, sem individualizar os pacientes. No presente aplicativo, diferentemente dos outros aplicativos, as informações são salvas, no servidor, de forma individual, e podem ser, dia após dia, modificadas de acordo com a evolução do quadro clínico.

Diferente de outros aplicativos, apresenta uma tabela de exames laboratoriais, que sinalizam aos profissionais ou valores que se encontram fora dos limites da normalidade, chamando a atenção para possíveis intervenções. Futuramente, o aplicativo pretende fornecer, na forma de gráficos, os resultados dos exames para melhor visualização da evolução do paciente.

Comparado com outros aplicativos existentes, como o No Harm.ai (5), a maioria necessita de um notebook ou computador e não permite a alimentação *in loco* durante a reunião clínica, além do tempo de alimentação ser muito longo, pois é necessário inserir todos os dados diariamente para o seguimento do paciente, enquanto no presente aplicativo, as informações são apenas adicionadas ou excluídas, sem necessidade de repetição, pois ele memoriza a última informação digitada. Já o aplicativo PharmActa (4) atende apenas a demanda domiciliar e não hospitalar.

A morosidade de tradução dos aplicativos em inglês e a falta de inclusão de quem desconhece a língua, também são sanadas com o aplicativo, já que o mesmo é 100% em língua portuguesa. A morosidade para pesquisas em outros aplicativos também leva o profissional a procurar informações em sites não específicos de saúde, de baixa confiabilidade (6).

Os campos de preenchimento do aplicativo foram pensados para guiar o usuário para que o mesmo, com experiência ou não, consiga registrar e obter informações que o conduzam a uma tomada de decisão. O aplicativo não substitui o farmacêutico, ele dá a base, ferramentas e agiliza o serviço do mesmo. Ainda é necessário fazer a interpretação dos resultados do aplicativo, e com a expertise do profissional, fazer a intervenção farmacêutica. A atenção farmacêutica faz parte de um cotidiano dinâmico/prático que é atualizado com novas evidências e pesquisas de alta qualidade (7).

A segurança medicamentosa na transição do cuidado é muitas vezes comprometida devido a processos falhos e transferências de responsabilidade (8). Com esses registros é possível que mais de um profissional possa ter acesso ao mesmo paciente, e que inclusive, a partir do momento da alta do paciente, ou da transferência do mesmo, outro farmacêutico tenha acesso a história clínica desse paciente, e de continuidade ao plano farmacoterapêutico, sem perder informações.

Esse estudo apresenta algumas limitações: 1) necessita de acesso à internet, pois foi construído em um provedor temporário e gratuito; 2) necessita de migração para o servidor do hospital onde o farmacêutico trabalha para confidencialidade dos dados dos pacientes e 3) Ainda não gera mapas e dados epidemiológicos através do aplicativo.

## 5. CONCLUSÃO

O aplicativo criado integra todas as informações clínicas do paciente gerando uma ficha de informações individualizadas, permitindo o seguimento do paciente e otimizando o tempo do profissional de saúde.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à equipe do serviço de Farmácia do Hospital Universitário Regional de Maringá da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Yuan N, Dudley RA, Boscardin WJ, Lin GA. Electronic health records systems and hospital clinical performance: a study of nationwide hospital data. *J Am Med Inform Assoc.* 2019.
2. Rosa MB, Nascimento MMGD, Cirilio PB, Santos RA, Batista LF, Perini E, et al. Electronic prescription: frequency and severity of medication errors. *Rev Assoc Med Bras.* 2019.
3. Sevilla-Sánchez D, Tuset-Creus M. Pharmaceutical care in hospitalized patients. (Management of the COVID-19 pandemic crisis. A new challenge for pharmacy services). *Farm Hosp.* 2020.
4. Spanakis M, Sfakianakis S, Kallergis G, Spanakis EG, Sakkalis V. PharmActa: Personalized pharmaceutical care eHealth platform for patients and pharmacists. *J Biomed Inform.* 2019.
5. Instituto de Inteligência Artificial na Saúde [Internet]. NoHarm.ai 2022 [Acesso em 28 jul 2022]. Disponível em: <https://noharm.ai/>
6. Giuliano C, McConachie S, Kalabalik-Hoganson J. Multicenter randomized comparative trial of Micromedex, Micromedex with Watson, or Google to answer drug information questions. *J Med Libr Assoc.* 2021 Apr 1;109(2):212-218. doi: 10.5195/jmla.2021.1085. PMID: 34285664; PMCID: PMC8270367.
7. Al-Quteimat OM, Amer AM. Evidence-based pharmaceutical care: The next chapter in pharmacy practice. *Saudi Pharm J.* 2016 Jul;24(4):447-51. doi: 10.1016/j.jsps.2014.07.010. Epub 2014 Aug 4. PMID: 27330375; PMCID: PMC4908053.
8. Manias E, Bucknall T, Woodward-Kron R, Hughes C, Jorm C, Ozavci G, Joseph K. Interprofessional and Intraprofessional Communication about Older People's Medications across Transitions of Care. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Apr 8;18(8):3925. doi: 10.3390/ijerph18083925. PMID: 33918010; PMCID: PMC8068321.

**Palavras-chave:** clinical pharmacy; drug information services; software.



# POPULATION PHARMACOKINETICS OF AMOXICILLIN IN HEALTHY ADULTS

**Gisela Myrian de Lima Leite Dalla Rosa<sup>1</sup>; Andrea Diniz<sup>2</sup>; Elza Kimura Grimshaw<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduate student (Doctorate), Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Professor, Department of Pharmacy, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: gmlleite@gmail.com

## 1. INTRODUCTION

Respiratory infections are responsible for more than 1.5 million deaths due to microbial resistance, being considered the most expensive syndrome in the world (1). One of the risk factors for emerging microbial resistance is treatment failure, which in addition to worsening the infection and causing sepsis, requires hospitalization and the use of parenteral antibiotics (2).

The lack of pharmacokinetic data for different target populations may increase the risk of irrational use of antimicrobials and increase the resistance of pathogens (3).

Population pharmacokinetics, which describes the typical behavior of the drug in the population as well as the variability observed between individuals, is a quantitative method that includes data collected directly from patients and evaluates the possible effects of covariates (age, weight, sex, environmental, genetic, physiological or pathophysiological factors, drug interactions, among others) on pharmacokinetics, in order to define the best dose regimen for each situation.

The first choice for the treatment of community-acquired pneumonia recommended by the World Health Organization (WHO) is amoxicillin (4), one of the most prescribed antibiotics for respiratory infections (5).

Amoxicillin alone is indicated to treat susceptible bacterial infections of the ear, nose, throat, genitourinary tract, skin and skin structures, and lower respiratory tract. It is a drug with a wide therapeutic range, meaning a low risk of intoxication (6).

Amoxicillin is a semisynthetic beta-lactam antibiotic, derived from ampicillin, which inhibits bacterial cell wall synthesis causing lysis and death of the bacteria. It has broad-spectrum bactericidal activity against gram-positive and gram-negative microorganisms. It is rapidly absorbed after oral administration achieving the maximum concentration from 1 hour (suspension) to 2 hours (capsule), with absorption latency time (Tlag) of 0.31 h (7). The protein binding is around 17 to 20% (8), and the volume of distribution (Vd) ranges from 0.25 L/kg (16.7 L) (9) to 27.7 L (6) with half-life of 61.3 minutes (8). The clearance (Cl) ranges from 3.3 mL/min/kg (13.3 L/h) (9) to 21.3 L/h (6), and 60% of the drug is eliminated unchanged by the kidney (8).

Despite the frequent use of amoxicillin, population pharmacokinetic studies are lacking to confirm the pharmacokinetic data provided by the literature. There is a high variability in dose regimens and several brands and presentations are available for the in clinical practice. It is necessary to confirm whether the doses used in the treatment of respiratory infections are rational and are not favoring the occurrence of therapeutic failures. Thus, the objective of this work is to describe the population pharmacokinetics of amoxicillin in healthy adults and to explore the potential characteristics of individuals that could impact the pharmacokinetics of the drug.

## 2. MATERIAL E METHODS

### 2.1. Data collect

Information on plasma amoxicillin concentration was collected from different bioequivalence studies of different brands of oral amoxicillin authorized by the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). The studies were carried out with healthy individuals, with cross-over randomization (reference drug and test drug) from a single dose oral administration. Studies of different pharmaceutical forms (tablet, capsule, and suspension) and different administered doses (850 mg, 500 mg, and 400 mg) were included. Plasma concentration data were recorded at different times of sample collection and after a period of 1 or 2 (Test or Reference) oral administration. In addition, the anthropometric data, such as sex, age, weight, height, and body mass index (BMI) were also collected.

Studies developed before 2006 without plasma concentration data or administered dose data, or anthropometric data were excluded.

The data file was formatted as a text file (.csv), where each line corresponds to a dose or an observation recorded for each patient. The columns record the identification of each individual, the study number, the drug (reference or test), the order of administration (occasion), the formulation, the sample collection times, the administered dose, plasma concentration at each time (observation), sex, age, weight, height, and BMI.

## 2.2. Population pharmacokinetic analysis

The concentration *versus* time data was analyzed using nonlinear mixed effects modeling (Monolix Software – 2021R1, available at <http://www.lixoft.com>). The term “non-linear” refers to the function that describes physical and biological mechanisms, also called the structural model. And the term “mixed effects” refers to the probabilistic description of the values of individual parameters, which include fixed effects (pharmacokinetic parameters) and random effects (inter-individual, inter-occasion, and residual variability). The statistical model is composed of the residual error model and the individual parameter model.

The following parameters to build the final structural models were compared: number of compartments, absorption kinetics order, and/or with or without absorption delay or with transit compartment. Residual error models, including constant, proportional, and combined error, were also compared, as well as the influence of the covariates such as: gender, age, weight, height, BMI. The model selection was based on the lowest value of the Bayesian Information Criterion (BIC), the best diagnostic graph, and the lowest relative standard error (RSE) of the estimated parameters. A log-normal distribution was assumed for the individual parameters.

## 3. RESULTS

### 3.1 Study population

Ten bioequivalence studies were selected, totaling 299 subjects and 9470 amoxicillin plasma concentrations. Two studies were with a tablet, four with a capsule, and four with a suspension. The anthropometric data from each study are shown in Table 1 and the concentration *versus* time profile is shown in Figure 1.

### 3.2 Population pharmacokinetic model

The oral administration model, with lag time, zero-order absorption, 1-compartment distribution, and linear elimination was selected as the best structural model that describes amoxicillin concentrations. The error model selected was the constant.

The model was parameterized in terms of latency time before absorption (Tlag), time or duration of absorption (TK0), the volume of distribution (V), and clearance (Cl).

In the analysis of covariates, no covariate showed a significant correlation.

The estimated population parameters and the inter-individual parameters are shown in Table 2. The RSE(%) values were lower than 10% for all estimated parameters. The accuracy of predictions using individual and population parameters describing observed concentrations is shown in Figures 2A and 2B, respectively.

A Bootstrap analysis was performed to validate the model, which presented a stable and reliable result of the final model, in which all the calculated values of the developed model are within the confidence interval (Table 2).

**Table 1. Demographic characteristics of subjects included in the Bioequivalence Studies (BE) of amoxicillin**

Study	Year	N	Sex	Age, y	Weight, Kg	Height, m	BMI, Kg.m <sup>2</sup>	Dose, mg	Formulation
Brand 1	2008	35	17 F, 18 M	30 (8.42)	69.05 (8.23)	1.67 (0.09)	25.08 (2.02)	875	Tablet
Brand 2	2007	27	14 F, 13 M	32.7 (6.29)	61.66 (9.15)	1.63 (0.08)	23 (2.01)	875	Tablet
Brand 3	2008	26	13 F, 13 M	31.5 (8.36)	67.02 (9.19)	1.67 (0.09)	24 (2.52)	500	Capsule
Brand 4	2016	40	20 F, 20 M	29.55 (6.55)	70.3 (10.37)	1.68 (0.08)	24.67 (2.47)	500	Capsule
Brand 5	2009	22	11 F, 11 M	28.18 (5.92)	69.69 (10.17)	1.68 (0.1)	24.74 (2.25)	500	Capsule
Brand 6	2016	33	18 F, 15 M	30.82 (8)	74.09 (12.87)	1.70 (0.11)	25.64 (2.95)	500	Capsule
Brand 7	2008	24	11 F, 13 M	31.37 (7.92)	64.86 (9.71)	1.67 (0.07)	23.1 (2.45)	400	Suspension
Brand 8	2011	28	14 F, 14 M	34.54 (7.38)	68.41 (9.3)	1.67 (0.08)	24.5 (2.41)	500	Suspension
Brand 9	2009	42	21 F, 21 M	30.67 (9.91)	67.83 (11.36)	1.68 (0.09)	24.02 (2.83)	500	Suspension
Brand 10	2016	22	10 F, 12 M	31.95 (6.72)	69.32 (9.87)	1.67 (0.08)	24.79 (2.36)	500	Suspension

Mean (standard deviation); N, number of subjects; BMI, body mass index.

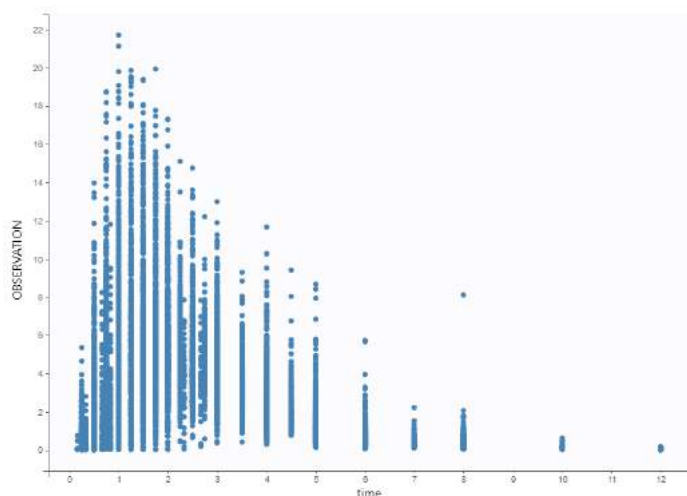
**Table 2. Amoxicillin population parameter and Bootstrap**

Parameter	Estimated population parameters		Confidence Interval - Bootstrap	
	Estimated value (%RSE)	Interindividual variability – $\omega$ (SD (%RSE))	CI - Estimated value	CI - Interindividual variability – $\omega$
Tlag	0.21 (5.3)	0.7 (5.96)	0.2 – 0.23	0.6 – 0.77
TK0	1.53 (3.35)	0.53 (4.77)	1.43 – 1.6	0.49 – 0.56
V	49.55 (3.32)	0.51 (5.11)	46.99 – 52.43	0.47 – 0.57

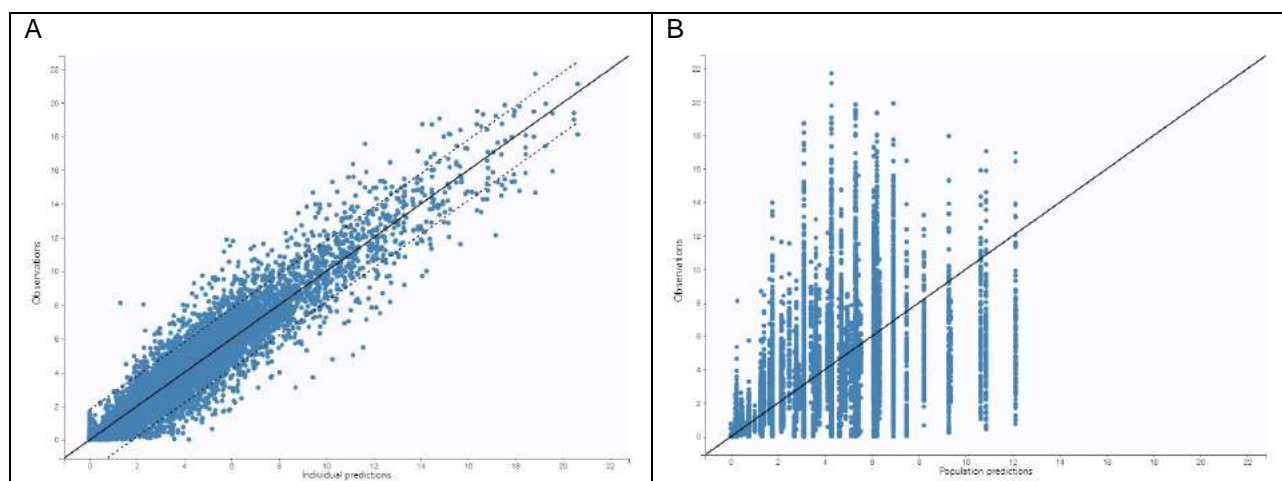


CI	25.71 (2.59)	0.43 (4.37)	24.61 – 26.80	0.39 – 0.46
a	1.1 (0.77)		1.04 – 1.16	

CI, confidence interval; %RSE, percent relative standard error; SD, standard deviation of random effects; Tlag, absorption lag time (h); TK0, duration of zero-order absorption (h); V, volume of distribution; Cl, clearance; a, additive component of the residual model



**Figure 1 Amoxicillin concentration versus time**



**Figure 2 Observed vs predicted concentration.**

A) observed vs predicted individual concentration; B) observed vs predicted population concentration

#### 4. DISCUSSION

This is the first study, with a robust number of patients and samples, that describes the population pharmacokinetics (PopPK) of amoxicillin in healthy individuals, whose best oral administration model selected was with lag time, zero-order absorption, distribution of 1 compartment, and linear elimination.

A previous PopPK study (10), referenced in the DrugBank online database (6), involved only 28 healthy men treated with oral amoxicillin, and showed transit compartment, Michaelis-Menten absorption, 2-compartment distribution, and first-order elimination (10). Comparing with the present study, we found a difference in the volume of distribution of almost 50% (30.72 vs 49.55 L), but similar clearance (21.3 vs 25.71 L/h).

It was expected that both studies would present similar models, which would allow an external validation with extrapolation to use for the entire population (11). But the differences found in the volume of distribution can impact the dose regimen (dose and dose range) and the indicated formulation (12).

A study carried out by Lombardo (2018), which has been used as reference for other pharmacokinetic studies, describes a Vd 0.25 L/kg (16.7 L) and Cl 3.3 mL/min/Kg (13.3 L/h) after intravenous amoxicillin 500 mg, differing from the present study in 66% and 52%, for Vd and Cl, respectively. However, it is a non-population study, with a different route of administration, a very small sample size (9 individuals), and certainly great variability between individuals (9).

Regarding the official information on the Amoxil® package insert, Glaxo SmithKline, both in Brazil and in the USA, there is no data on Vd and Cl, making impossible a comparison with our study.

Thus, the PopPK analysis that can quantify and explain the variability in drug exposure and response between individuals still needs to combine this analysis with Monte Carlo simulation and Bayesian estimation to maximize the use of clinical data and describe more accurately PK/PD ratios to inform optimal dose schedules (11).

In comparison with other bioequivalence studies, a dose of 1000 mg orally tablet, Sailer et al (2007) found a Vd of 61 L, and Cl of 25.6 L/h (13), while Thambavita et al (2021) with a dose of 500 mg orally capsule found a Vd of 22.71 L and Cl 18.87 L/h (14).

As a limitation, the present study has no record of creatinine values, making impossible to confirm whether creatinine clearance would influence amoxicillin clearance in healthy adults.

## 5. CONCLUSION

The population pharmacokinetic model showed high robustness, low variability between individuals and can be used as a reference to simulate future clinical studies in different pathologies that affect the patient's physiology, in different dose schedules, in addition to extending to different patient populations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Gustavo Mendes Lima Santos from the Therapeutic Equivalence Coordination (CETER) at ANVISA who kindly provided the data from the bioequivalence studies.

## REFERENCES

1. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 Jan 18;S0140-6736(21)02724-0.
2. 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. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2013;22(9):970-6.
3. Tang BH, Wu YE, Kou C, Qi YJ, Qi H, Xu HY, et al. Population Pharmacokinetics and Dosing Optimization of Amoxicillin in Neonates and Young Infants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jan 29;63(2):e02336-18.
4. World Health Organization (WHO). Pneumonia. 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>. Accessed February 17, 2022.
5. Lee YR, Hougue C, Hall RG. Treatment of community-acquired pneumonia. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(9):1109-21.
6. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2017 Nov 8.
7. Spyker DA, Rugloski RJ, Vann RL, O'Brien WM. Pharmacokinetics of amoxicillin: dose dependence after intravenous, oral, and intramuscular administration. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977 Jan;11(1):132-41.
8. IBM Micromedex Drug Ref. © Copyright IBM Corporation 2018. Application version 3.0b856.
9. Lombardo F, Berellini G, Obach RS. Trend Analysis of a Database of Intravenous Pharmacokinetic Parameters in Humans for 1352 Drug Compounds. *Drug Metab Dispos*. 2018 Nov;46(11):1466-1477.
10. de Velde F, de Winter BC, Koch BC, van Gelder T, Mouton JW; COMBACTE-NET consortium. Non-linear absorption pharmacokinetics of amoxicillin: consequences for dosing regimens and clinical breakpoints. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Oct;71(10):2909-17.
11. Cheng Y, Wang CY, Li ZR, Pan Y, Liu MB, Jiao Z. Can Population Pharmacokinetics of Antibiotics be Extrapolated? Implications of External Evaluations. *Clin Pharmacokinet*. 2021 Jan;60(1):53-68.
12. Sui X, Sun J, Wu X, Li H, Liu J, He Z. Predicting the volume of distribution of drugs in humans. *Curr Drug Metab*. 2008 Jul;9(6):574-80.
13. Sailer R, Arnold P, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzik I, et al. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of amoxicillin: bioequivalence assessment. *Arzneimittelforschung*. 2007;57(4):227-31.
14. Thambavita DD, Galappaththy P, Jayakody RL. Pharmacokinetics and Bioequivalence of Two Amoxicillin 500 mg Products: Effect of Food on Absorption and Supporting Scientific Justification for Biowaiver. *J Pharm Sci*. 2021 Nov;110(11):3735-3741.

**Keywords:** population pharmacokinetics; amoxicillin; healthy adult.



# ALTERAÇÕES DO DUODENO DE HAMSTERS SUBMETIDOS A INFECÇÃO POR DIFERENTES CEPAS DE

## *Leishmania Viannia braziliensis*

**Maria Gabriela Lima da Silva<sup>1</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>2</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>3</sup>; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes<sup>3</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo<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 (Pós-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, PR

<sup>4</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: mariagabrielalimas97@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais consideradas um problema de saúde pública da qual tem se observado elevado aumento no número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica (1). Estima-se que tenha de 600.000 a 1.000.000 novos casos ao ano (1). As leishmanioses variam de acordo com a espécie causadora e se manifestam nas formas cutânea/tegumentar (pele), mucosa (membrana mucosa) e visceral (2). A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) foi a primeira descrita e imputada como agente etiológico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA), estando amplamente distribuída por toda a América Latina, respondendo pelo maior número de casos no Brasil (3).

LVB é o principal agente da forma mucocutânea da LTA e tem como característica produzir lesões destrutivas secundárias, envolvendo mucosas e cartilagens (3). Contudo, estudos têm demonstrado que espécies causadoras de LTA podem se disseminar por via sanguínea e linfática para outros órgãos como linfonodos, baço, fígado, (4,5) e intestino (6), acarretando alterações semelhantes aos causados pela leishmaniose visceral. O intestino é um órgão de extrema relevância aos animais, pois é o responsável pela absorção de nutrientes, reabsorção de água e secreção de muco como sialomucinas, sulfomucina, mucinas neutras e outras substâncias. LTA possui alta mortalidade e morbidade associadas à LVB, isso é um dos aspectos que caracteriza a doença como um importante problema de saúde pública em todo o mundo (2).

De forma geral, algumas protozoonoses são frequentemente associadas com alterações funcionais (7) e imunes do intestino (8), e estas alterações juntamente com o parasito, podem causar alterações morfológicas importantes (9). Em estudos anteriores envolvendo a infecção por *Leishmania* e a interação com o intestino observamos alterações histopatológicas no íleo de hamsters (10). Nesse sentido, a função do intestino pode ser afetada devido as alterações morfológicas e celulares, associadas ao dano tecidual (11). Assim, mostra-se importante elucidar o impacto que a infecção por LVB acarreta ao intestino, elucidando as alterações morfológicas na mucosa. Deste modo, o objetivo deste estudo foi analisar as alterações histopatológicas presentes no duodeno de hamsters em diferentes tempos de infecção por LVB.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1. Modelo Animal

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob protocolo nº7587260416. Foram utilizados 18 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) fêmeas com 12 semanas de idade, obtidos no Biotério Central da UEM. Esses animais foram separados em três grupos (n= 3): um Grupo Controle (GC) e dois grupos infectados (GI) que foram submetidos a eutanásia em dois tempos, 90 e 120 dias de infecção.

#### 2.2. Cepa e modelo de infecção

As cepas de LVB utilizadas foram a MHOM/BR/1975/M2903, considerada padrão e a cepa MHOM/BR/2009/3476 considerada atípica, pois desenvolveu lesões atípicas e teve uma difícil resposta terapêutica (24). Para a infecção, as promastigotas de *Leishmania* foram descongeladas e cultivadas no

meio 199 (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) suplementado com 1% L-glutamine, 1% urina humana e 10% de soro fetal bovino. Os animais foram anestesiados com uma combinação de 10 mg/kg de xilazina (Calmiun Agener-Union Animal Health) e 50 mg/kg de ketamina (Francotar®- Virbac Animal health) para receberem o inóculo via intradérmica, no dorso da pata esquerda traseira uma suspensão de 100 µl de promastigotas ( $2 \times 10^7$  parasitos) de cada cepa. No grupo controle foram inoculados 100 µl de tampão fosfato-salino (PBS) seguindo os mesmos procedimentos dos grupos infectados.

### **2.3. Eutanásia dos animais e coleta das amostras**

Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico com gás de isoflurano e posterior eutanásia com dióxido de carbono. Em seguida foi coletado 1 cm do duodeno de todos os animais e fixado em paraformaldeído 4% tamponado para técnicas histológicas. Amostras de 0,5 cm foram coletadas para a realização das técnicas de dosagem da mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO).

### **2.4. Processamento histológico**

Depois de fixados, diafanizados e embebidos em parafina, os segmentos foram cortados transversalmente de forma semi-seriada em 5 µm para realização das colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) a fim de quantificar os linfócitos intraepiteliais (LIEs) e mensurações da arquitetura intestinal; ácido periódico de Schiff (PAS+) para contagem de células caliciformes (CCs) produtoras de mucinas neutras; alcian-Blue pH 2,5 (AB 2,5) para contagem de CCs produtoras de sialomucinas e sulfomucinas; alcian-Blue pH 1,0 (AB 1,0) para contagem de CCs produtoras de sulfomucinas; picrosirius red para evidenciar fibras colágenas dos tipos I e III e azul de toluidina para quantificação de mastócitos totais.

#### **2.4.1 Contagem de linfócitos intraepiteliais (LIEs) e contagem de células caliciformes (CCs)**

Cada corte foi dividido em 4 quadrantes e em microscopia foram contadas 160 células por quadrante no epitélio da túnica mucosa, totalizando 2.560 células do epitélio intestinal de cada animal e quantificadas as células caliciformes e os LIEs presentes. Posteriormente foi calculada a proporção de células caliciformes/100 e LIE/100 células epiteliais (CE). A partir de lâminas coradas por HE para LIEs e PAS, AB pH 2,5 e AB pH 1,0 para CCs.

#### **2.4.2 Mensuração de parede intestinal**

As mensurações foram realizadas utilizando o software Motic Images Plus 2.0. A partir de 16 imagens capturadas de 4 cortes histológicos do mesmo animal utilizando uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel) acoplada a um microscópio de luz trinocular (MOTIC B5), sendo 1 imagem/quadrante/corte corados por HE. Nas imagens capturadas com a objetiva de 10X foi determinada a altura e largura dos vilos, profundidade e largura das criptas, espessura da túnica submucosa, das camadas musculares e da parede intestinal total do duodeno dos animais.

#### **2.4.3 Mensuração das fibras colágenas tipo I e tipo III**

Nas lâminas coradas com a técnica de picrosirius red foram capturadas 16 imagens na objetiva de 20x em microscópio (Olympus BX50 - Minato-Ku, Japão) (1 imagem/quadrante/corte) para a mensuração da área ocupada pelas fibras de colágeno tipo I e III. Além disso, foram capturadas, na mesma lâmina, 16 imagens sem luz polarizada na objetiva de 20x (1 imagem/quadrante/corte) para a mensuração do colágeno total.

#### **2.4.4 Quantificação de mastócitos totais**

Para a quantificação dos mastócitos totais foi realizada a contagem de todas as células presentes em 100 campos microscópicos aleatórios, na objetiva de 100x, corados pela técnica de azul de toluidina, em 4 cortes por animal. Os resultados foram expressos em número de mastócitos por mm<sup>2</sup>.

### **2.5 Dosagens bioquímicas**

#### **2.5.1 Dosagem de nitrito**

A dosagem de nitrito foi realizada a partir da reação do reagente de Griess (0,1 g N-(1-naftil)-etilenodiamina; 1g sulfanilamida; 2,5 ml ácido ortofosfórico; 100ml água destilada) com 50 µl de amostra e com uma curva padrão de nitrito de sódio (5 µM, 10 µM, 30 µM e 60 µM). A leitura foi realizada em um leitor de ELISA com comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em µM, com base na curva padrão.

#### **2.5.2 Determinação da atividade da enzima de mieloperoxidase (MPO)**

Foi utilizada 10 µl de amostra e a solução de o-dianisidina (0,0042g o-dianisidina; 22,5 ml água destilada; 2,5 ml PBS; 12,5µl peróxido de hidrogênio 1%) por 5 minutos protegido da luz. O bloqueio da reação foi realizado com a solução de acetato de sódio (2,23 g acetato de sódio anidro; 20 ml água destilada). A leitura foi realizada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram expressos em densidade ótica (DO).

## 2.6 Análise histomorfométrica dos gânglios mientérico

Cortes corados com HE foram usados para realizar a análise histomorfométrica de 10 gânglios submucosos. A área ( $\mu\text{m}^2$ ) dos gânglios foi determinada sob ampliação de 40x.

## 2.7 Análise estatística

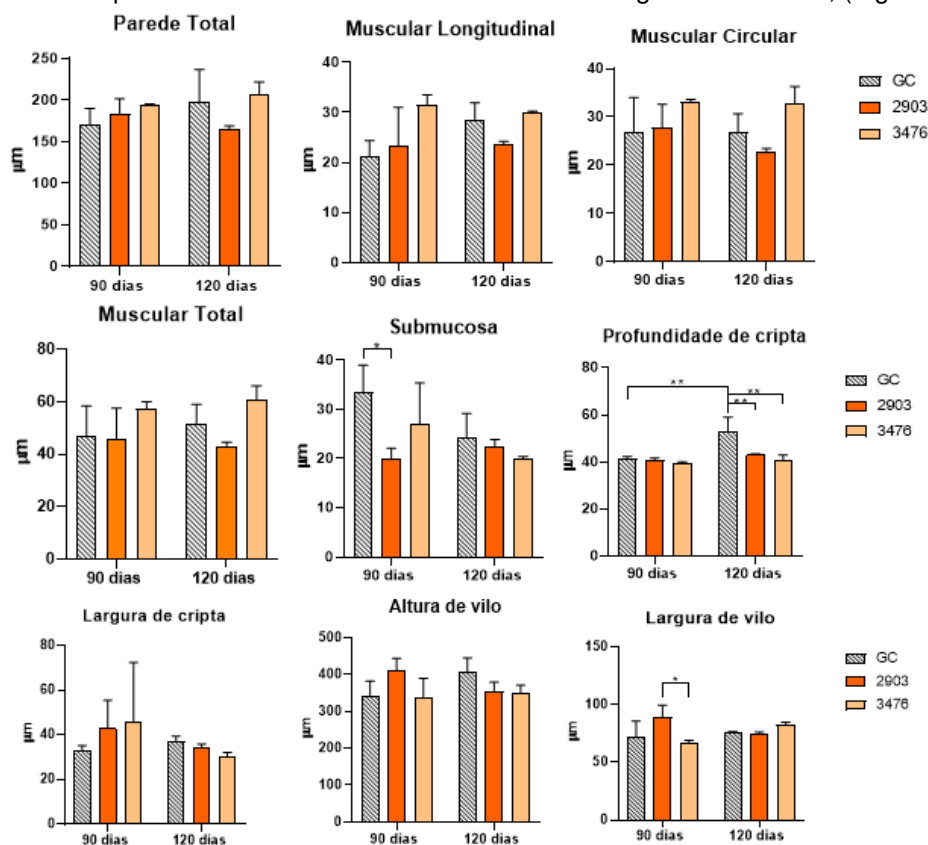
Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas (Microsoft Excel®) e analisados estatisticamente à medida que foram obtidos. Por meio do software GraphPad Prism 8 foi verificada a distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram considerados com distribuição normal para todas as análises e foram apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação entre os grupos foi aplicado o teste ANOVA two way seguido por pós-teste de Tukey. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% com 95% de confiança.

## 3. RESULTADOS

Na análise da morfometria da parede duodenal, observamos que aos 90 dias houve uma diminuição da espessura da submucosa no grupo 2903 comparado com o grupo controle demonstrando o efeito da infecção ( $p=0,0395$ ).

Os resultados da análise de profundidade de cripta demonstraram o efeito da infecção ( $p=0,0017$ ) no tempo de 120 dias, o que foi evidenciado pelas criptas menos profundas nos grupos 2903 e 3476 em relação ao respectivo grupo controle. Observamos também que o tempo de infecção foi uma variável significativa [ $F(1, 12) = 17,07$ ;  $p=0,0014$ ], pois levou ao aumento da profundidade das criptas duodenais nos animais controles de 120 dias quando comparados ao grupo controle de 90 dias.

Aos 90 dias de infecção, o grupo 2903 teve um aumento da largura dos vilos duodenais comparado ao grupo 3476 ( $p=0,0117$ ). As outras análises como parede total, muscular longitudinal, muscular circular, muscular total, largura de cripta e altura de vilos não estavam alteradas significativamente, (Figura 1).

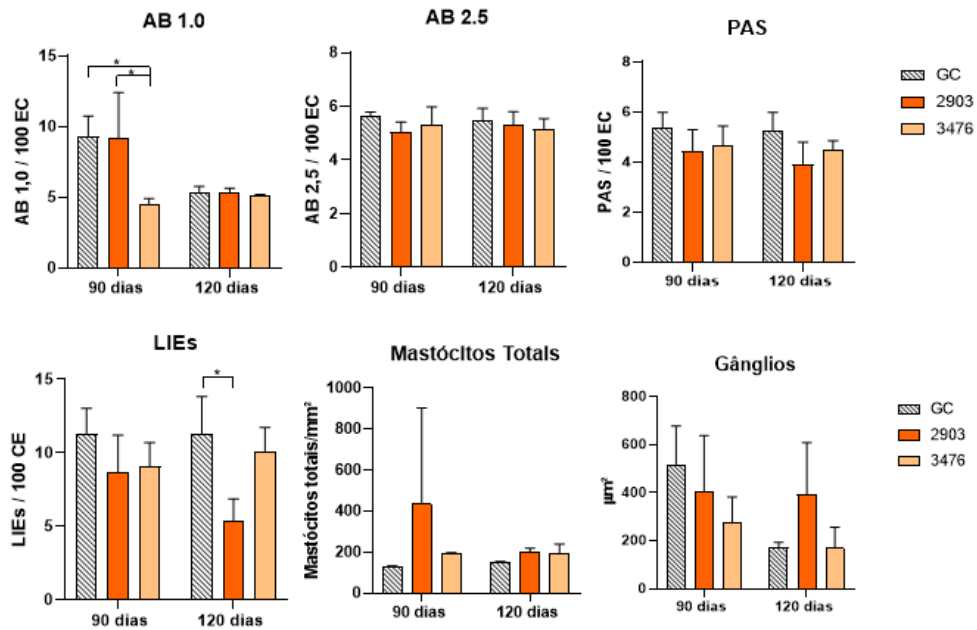


**Figura 1. Morfometria da parede, vilosidades e criptas ( $\mu\text{m}$ ) no duodeno de hamsters fêmeas infectadas com  $2 \times 10^7$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por 90 ou 120 dias. GC: Grupo Controle. 2903: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*. N= 3, \* $p < 0,05$  (teste ANOVA two way seguido por pós-teste de Tukey).**

Os resultados de AB 1,0 demonstram o efeito da infecção ( $p=0,0173$ ). Nesta coloração, observamos uma redução na proporção de células caliciformes no grupo 3476 em relação ao GC e 2903 no tempo de 90 dias. Não foram observadas alterações na coloração de AB 2,5 e PAS (Figura 2).

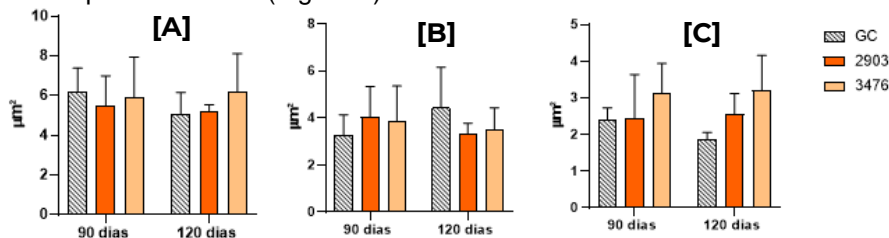
Houve um efeito significativo da infecção ( $p=0,0096$ ), com a diminuição de linfócitos intraepiteliais no grupo infectado pela cepa 2903 em relação ao GC aos 120 dias após a infecção.

As análises de mastócitos totais e dos gânglios submucosos não demonstraram alterações significativas no duodeno dos hamsters em ambos os tempos de infecção (Figura 2).



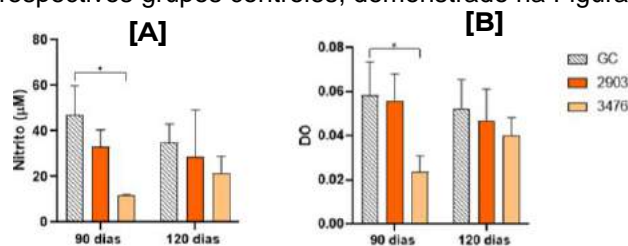
**Figura 2. Proporção de células caliciformes nas colorações de Alcian Blue pH 1,0 (AB 1,0) e pH 2,5 (AB 2,5) e ácido periódico de Schiff (PAS), linfócitos intraepiteliais, número de mastócitos totais (mm<sup>2</sup>) e análise histomorfométrica dos gânglios submucosos (mm<sup>2</sup>), no duodeno de hamsters fêmeas infectadas com  $2 \times 10^7$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por 90 ou 120 dias. GC: Grupo Controle. 2903: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*. N= 3, \*p<0,05 (teste ANOVA two way seguido por pós-teste de Tukey).**

Não houve alterações significativas em nenhum dos grupos infectados nas fibras colágenas totais e dos tipos I e III nos tempos estudados (Figura 3).



**Figura 3. Área média ocupada pelas fibras colágenas totais (A), tipo I (B) e tipo III (C) (µm<sup>2</sup>) no duodeno de hamsters fêmeas infectadas com  $2 \times 10^7$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por 90 ou 120 dias. GC: Grupo Controle. 2903: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*. N= 3, \*p<0,05 (teste ANOVA two way seguido por pós-teste de Tukey).**

Aos 90 dias, a infecção induzida pela cepa 3476 causou efeito tanto na dosagem de nitrito ( $p=0,0133$ ) quanto na atividade da MPO ( $p=0,0133$ ). Esse efeito foi demonstrado pela diminuição de ambos os parâmetros em relação aos respectivos grupos controles, demonstrado na Figura 4.



**Figura 4. Os gráficos representam as dosagens de nitrito (A) e da atividade da mieloperoxidase (MPO) (B) no duodeno de hamsters fêmeas infectadas com  $2 \times 10^7$  promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por 90 ou 120 dias. GC: Grupo Controle. 2903: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/1975/M2903 de *L. (V.) braziliensis*. 3476: Grupo infectado com a cepa MHOM/BR/2009/3476 de *L. (V.) braziliensis*. N= 3, \*p<0,05 (teste ANOVA two way seguido por pós-teste de Tukey).**

#### 4. DISCUSSÃO

A primeira linha de defesa da imunidade inata intestinal é composta por barreiras físicas, químicas e de células que produzem substâncias que oferecem proteção (12). As CCs são responsáveis pela produção e liberação de mucinas, que quando hidratadas formam o muco, um gel lubrificante e protetivo para o epitélio intestinal contra patógenos do lúmen (2). A redução deste tipo celular nos grupos infectados pode demonstrar uma fragilização dessa barreira, prejudicando a defesa física provida por ela (2).

Ainda no epitélio, células protetoras e imunorreguladoras como os LIEs se acumulam no local de inflamação podendo persistir a longo prazo sobre o tecido inflamado (12,16). Contudo, no nosso estudo foi observado uma redução na proporção de LIEs no grupo 2903 aos 90 dias de infecção, o que pode caracterizar uma diminuição do trânsito dessas células da lâmina própria para o epitélio duodenal (13). Diferentemente do que foi demonstrado no íleo desses animais, onde foi observado um aumento no recrutamento dessas células (6,10). Logo, sugerimos que as alterações nos LIEs são uma possível alteração sistêmica causada pela infecção, que afeta os segmentos do intestino delgado de formas distintas.

O intestino delgado apresenta características morfológicas e celulares semelhantes em sua extensão, entretanto, os seus segmentos têm funções diferentes, o que promove características únicas (2) e variadas respostas frente a um processo infeccioso (14). Em nosso trabalho, demonstramos que isso também ocorre durante a infecção crônica por LVB, em que diferentes alterações foram encontradas ao longo do intestino delgado. Como a profundidade de criptas e túnica submucosa, que estavam reduzidas no duodeno enquanto no íleo estavam aumentadas (9,10). Nas criptas ocorre a proliferação celular, sendo assim, a redução de sua profundidade está relacionada a uma diminuição desta função (15), levando a alterações quantitativas e morfológicas nas células epiteliais especializadas (2).

A submucosa é constituída de tecido conjuntivo denso, contendo fibras colágenas, cuja função é suporte e motilidade da mucosa (2). Durante a infecção por outros protozoários, foi demonstrado que alterações na expressão de moléculas de adesão e de serotonina levam a redução da espessura da camada submucosa (16). Essa redução foi relacionada com a remodelação de fibras colágenas (16) e um aumento da fragilidade da parede intestinal (17). Em nossos resultados, foi observada a redução da espessura da camada submucosa, entretanto, a área ocupada pelas fibras colágenas não foi alterada, sendo assim, as consequências funcionais deste quadro precisam ser elucidadas.

Buscando verificar a resposta duodenal, avaliamos também a atividade enzimática da MPO e a avaliação indireta de NO (dosagem de nitrito), que são produzidas por células imunes e inflamatórias (18). Observamos uma diminuição da produção de ambos os parâmetros aos 90 dias de infecção nos animais infectados com a cepa 3476. Estudos *in vitro* com as mesmas cepas utilizadas neste trabalho não detectaram aumento na produção de NO pelos macrófagos (19). Como o NO é um dos principais mecanismos de defesa contra a infecção por *Leishmania* (19), sua diminuição pode resultar em um desequilíbrio nesse mecanismo de defesa (20). Também ocorreu a diminuição da atividade da enzima MPO, um importante mediador local de inflamação (18), com isso, sugere-se que as alterações encontradas não estão associadas à migração de leucócitos para o duodeno.

Os resultados obtidos das análises revelaram que a infecção por LVB pode ocasionar uma diminuição na submucosa, profundidade de cripta, CCs, LIEs, nitrito e a atividade da enzima MPO. Estes resultados corroboram com a hipótese de que o intestino é um provável alvo para futuros estudos da relação hospedeiro de LVB.

#### 5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados, concluímos que a infecção por LVB causa alterações no duodeno de hamsters fêmeas *Mesocricetus auratus* predominantemente no tempo de 90 dias de infecção. É importante realizar outros estudos para esclarecer como essas alterações irão afetar as funções do órgão e nos mecanismos envolvidos nesse processo tão complexo.

#### FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

#### AGRADECIMENTOS

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

#### REFERÊNCIAS

1. Informe epidemiológico das Américas [Internet]. Informe de Leishmanioses;9. OPAS; 2020 Dec [Acesso em 26 jun 2021]. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>
2. Junqueira, Luiz Carlos Uchôa Carneiro J. Histologia Básica. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2017.
3. Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais. Atlas

- interativo leishmaniose nas Américas Asp clínicos e diagnósticos Difer. 2021;
4. Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*. 2013 May;140(6):771–9.
  5. Ramos JVA, Tavares JPC, Marques SR, Santana IM, Andrade TAS, Santana JA, et al. Molecular diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in dogs from an endemic area in Pernambuco State, Brazil. *Med Veterinária* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 28];13(2):218–26. Disponível em: <http://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/3073>
  6. Santos AGA, Ferlini J de P, Vicentino SL, Lonardon MVC, Sant’Ana D de MG, de Melo G de AN. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Jun 28];51(4):537–41. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/tGFWxxSYkVnXzSmnx6Jfndn/abstract/?format=html&lang=en>
  7. Farthing MJG, Casburn-Jones A, Banks MR. Getting control of intestinal secretion: thoughts for 2003. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 Apr 19];35(6):378–85. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12868672>
  8. Bout D, Moretto M, Dimier-Poisson I, Gatel DB. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. *Immunobiology* [Internet]. 1999 Dec [cited 2019 Apr 22];201(2):225–8. Disponível em : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S017129859980062X>
  9. Santos AGA dos, da Silva MGL, Carneiro EL, de Lima LL, Fernandes ACBS, Silveira TGV, et al. A New Target Organ of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Chronic Infection: The Intestine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jul 14;0:626.
  10. Santos AGA dos, Lima LL de, Mota CA, Gois MB, Fernandes ACBS, Silveira TGV, et al. Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. *Biomed Pharmacother*. 2018;
  11. Jacobson A, Yang D, Vella M, Chiu IM. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol* 2021 143 [Internet]. 2021 Feb 4 [Acesso em 2021 Aug 24];14(3):555–65. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41385-020-00368-1>
  12. Abbas A.K., Lichtman A.H. *Imunologia Básica – 2ª edição – Ed Elsevier*. Rio de Janeiro.
  13. Silva P de C, Shiraishi CS, Silva AV da, Gonçalves GF, Sant’Ana D de MG, Araújo EJ de A. *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Exp Parasitol*. 2010 Aug 1;125(4):380–3.
  14. Silva Watanabe P, Trevizan AR, Silva-Filho SE, Góis MB, Garcia JL, Cuman RKN, et al. Immunocompetent host develops mild intestinal inflammation in acute infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jan 1 [Acesso em: 5 ago 2022];13(1):e0190155. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190155>
  15. Góis MB, Hermes-Uliana C, Barreto Zago MC, Zanoni JN, da Silva AV, de Miranda-Neto MH, et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. *Exp Parasitol*. 2016 May 1;164:56–63.
  16. Pastre MJ, Casagrande L, Gois MB, Pereira-Severi LS, Miqueloto CA, Garcia JL, et al. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Jun [Acesso em: 25 set 2019];114:108797. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218384075>
  17. Uranga JA, García-Martínez JM, García-Jiménez C, Vera G, Martín-Fontelles MI, Abalo R. Alterations in the small intestinal wall and motor function after repeated cisplatin in rat. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Aug 5];29(7):e13047. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nmo.13047>
  18. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Feb 15;640:47–52.
  19. Fernandes ACBS, Pedroso RB, de Mello TFP, Donatti L, Venazzi EAS, Demarchi IG, et al. In vitro characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from patients with different responses to Glucantime® treatment from Northwest Paraná, Brazil. *Exp Parasitol*. 2016 Aug 1;167:83–93.
  20. Repositório Institucional da UFMG: Influência do óxido nítrico na infecção experimental por *Ascaris suum* durante a fase inicial da ascaridíase [Dissertação]. [Acesso em 7 ago 2022]. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUBD-9P3FCL>

**Palavras-chave:** leishmaniose; histologia; intestino delgado.





## **Sleep analysis of children aged 6 to 10 years and its comparison with children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Pandemic**

**Carla Betania Huf Ferraz Campos<sup>1</sup>; Naomi Vidal Ferreira<sup>2</sup> Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup>Docente, Curso de Psicologia, Centro Universitário Adventista de São Paulo, São Paulo, SP

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: carla\_betania@hotmail.com

### **1. INTRODUCTION**

Sleep disorders (SD) are very common in pediatric age and about 25% of children experience a sleep problem sometime before adulthood (1), these data increase to 50-70% of children if they have Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) (2)

Sleep quality, or sleep adequacy and satisfaction, is a central component of sleep health (3). Therefore, sleep problems are common among young children and it is one of the most commonly expressed concerns by caregivers and it is known that poor sleep quality can affect physical health, cognitive ability, the socioemotional processes and the behavioral functioning of children, with implications for children's development and well-being (4).

It is known that sleep deprivation has been associated with failures in executive functions, attention, memory and language, or that it culminates in difficulties in learning, impulse modulation and behavior (5). Sleep problems are common throughout childhood and adolescence, having a significant impact on the lives of children and families (6).

When observing children with ADHD, the relationship with sleep is more complex and presents many challenges in clinical practice. Recent studies have helped to elucidate the nature of the neuromodulatory systems underlying the associations between sleepiness, arousal, and attention. Studies of sleep disorders in children with academic and behavioral problems have also highlighted the role that primary sleep disorders play in the clinical presentation of symptoms of inattention and behavioral dysregulation (7).

In summary, sleep problems in schoolchildren with ADHD are extremely common and strongly associated with poorer quality of life, child's daily functioning and school attendance, and worse caregiver mental health and work attendance. Implementing a sleep intervention in children with ADHD could improve outcomes beyond treating ADHD alone (2).

Therefore, the objective of this research was to observe the quantity and quality of sleep of children aged 6 to 10 years in southern Brazil at the end of the social isolation caused by COVID-19 and to compare data from children with ADHD with children who do not have ADHD using the validated Children Sleep Habits Questionnaire (CSHQ).

### **2. METHODS**

Descriptive cross-sectional study, with a quantitative and qualitative approach. This study is part of the project "Health profile of children aged 3 to 10 years old who study in a private network in the southern states of Brazil", previously approved by the Ethics Committee (CAAE: 39664820.7.0000.0104). Data were collected through an objective online questionnaire (Google Forms), answered by the parents after approval of the Free and Informed Consent about children's general data, physical activity profile, sleep profile, medications and food profile during the months of June to August 2021.

Participants were recruited from a worldwide network of private schools, choosing schools in southern Brazil, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, therefore, the pedagogical coordinators of the educational

centers were trained by the researchers in approaching the parents or guardians of the child and in the application of the questionnaire. A video made by the researchers was also sent, explaining the research, its objectives, the questionnaires and the ethical factors involved, inviting them to participate in the research, signing the TCLE and filling out the questionnaires. This was available on the digital platform for remote teaching and academic management where parents or guardians already receive notes and notices regularly, which are accessed through a personal password.

For this article, data from the sleep profile of 1995 children aged 6 to 10 years were analyzed and also the comparison of sleep in control children and those whose parents claimed to have ADHD of the 3000 questionnaires sent. For this purpose, the Children's Sleep Habits Questionnaire (CSHQ) (8) was applied. This questionnaire assesses parents' perceptions of their children's sleep during a typical week reflecting the main sleep domains that encompass the major medical and behavioral sleep disorders in this age group (9).

The scale presents 33 items evaluated in a classification of up to 3 points, being "rarely" (0 to once a week, corresponding to 1 point), "sometimes" (two to four times a week, corresponding to 2 points) and "usually" (five to seven times a week, corresponding to 3 points), presenting the highest score for more disturbed sleep, due to this, some items (items 1, 2, 3, 10, 11 and 26) are in reverse order (10).

The items are divided into eight subscales. The subscales are Bedtime resistance (BR) (items 1, 3, 4, 5, 6, and 8), Sleep onset delay (item 2), Sleep duration (items 9, 10 and 11), Sleep Anxiety (items 5, 7, 8 and 21), Night Wakings (items 16, 24, and 25), Parasomnias (items 12, 13, 14, 15, 17, 22 and 23), Sleep Disordered Breathing (items 18, 19 and 20) and Daytime Sleepiness (items 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, and 33) (8–10).

To verify the distribution of numerical variables, the Shapiro Wilk test was used for categorical variables, we used relative and absolute frequency. For numeric variables, were presented mean and standard deviation or median and interquartile range for the total sample, for the group of participants without ADHD and for the group of participants with ADHD. To compare the medians of the CSHQ questionnaire between the groups, the Kruskal Wallis test was used for independent samples. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### 3. RESULTS

1995 questionnaires were collected from children aged 3 to 10 years during the research, as it was decided to analyze only children from 6 to 10 years old, to know the sleep of children who attend Elementary School – Initial Years (EF-AI) there were 1466 (73.48%), however, some parents left some items of the questionnaires unanswered, 21 questionnaires were excluded, which resulted in 1445 (72.43%) questionnaires valid for the analysis of sleep data.

The questionnaires were answered mostly by the mother (1266 / 88%), by the father (149/10.30%) and others such as grandmother, grandfather, aunt, stepmother and legal guardian (30 / 0.02%). The states have a proportional distribution in the three southern states of Brazil, having 501 questionnaires answered by children residing in Paraná (34.67%), 500 (34.60%) in Rio Grande do Sul (RS) e 444 (30.73%) in Santa Catarina (SC).

The mean age of the children was 8 years old (SD - +/- 1.4 years old), and the male sex corresponded to 753 (52.10%) children. according to the first column of Table 1, which presents the other general data of the children.

**Table 1:** General data of the 1445 children whose parents answered the questionnaire

Predictor	ALL N = 1445 (100%)	NO ADHD N=1397 (97.7%)	WITH ADHD N=48 (3.3%)	p.overall
<b>Sex</b>				0.187
Female	692 (47.90%)	674 (48.2%)	18 (37.5%)	
Male	753 (52.10%)	723 (51.8%)	30 (62.5%)	
<b>Years</b>	8	8.00 (1.41)	8.10 (1.52)	0.649
<b>Study time</b>				0.001
All time	28 (1.93%)	27 (1.93%)	1 (2.08%)	
Morning	518 (35.84%)	488 (34.9%)	30 (62.5%)	
Afternoon	899 (62.28%)	882 (63.1%)	17 (35.4%)	
<b>ADHD</b>				<0.001
No	1397 (96.7%)	1397 (100%)	0 (0.00%)	

Yes	48 (3.30%)	0 (0.00%)	48 (100%)
-----	------------	-----------	-----------

Source: Author data (2021)

It can be seen in Table 1 that the majority of children's study shift is in the afternoon (899 / 62.28%) and only 48 children's parents report having ADHD (3.30%).

When looking at the second and third columns of Table 1, one can compare the main data of children whose parents report having ADHD with the control population, it appears that there is not much change in the average age of children, the male gender remains predominant (30;62.5%), but without statistical significance and mothers were the ones who answered the questionnaire the most (45; 93.7%).

What is different is the study shift, since most children attend the afternoon shift, children with ADHD attend the morning shift (30; 62.5%).

Regarding the children's sleep analysis, it can be observed that the average time that children sleep during the week is 10 p.m. (SD +/-1:15) and they wake up on average at 8 a.m. (SD +/- 1:30), totaling an average of 10 hours of sleep per day during weekdays. Children with ADHD, on the other hand, sleep at 9:45 p.m. (SD +/-0:45) and wake up at approximately 7:30 am (SD +/- 1:30), totaling 9h45min of daily sleep.

As the analyzed variables do not have a normal distribution, it was decided to verify the median and the interquartile range for the analysis of the subcategories of the CSHQ questionnaire. Understanding that according to the CSHQ scale, the higher the score, the greater the sleep disturbance, Table 2 is presented.

**Table 2:** Children's sleep profile across subcategories for all children and comparison of children who do not have ADHD with children who do have ADHD.

	ALL	NO ADHD	WITH ADHD	
	N=1445	N=1397	N=48	p.overall
Bedtime resistance	10.0 [10.0;12.0]	10.0 [10.0;12.0]	12.0 [10.0;13.0]	0.032
Sleep Anxiety	6.00 [4.00;8.00]	6.00 [4.00;8.00]	7.00 [5.00;10.0]	0.007
Sleep onset delay	3.00 [1.00;3.00]	3.00 [1.00;3.00]	3.00 [1.75;3.00]	0.556
Sleep duration	7.00 [6.00;7.00]	7.00 [6.00;7.00]	7.00 [6.00;7.00]	0.062
Parasomnias	8.00 [7.00;9.00]	8.00 [7.00;9.00]	9.00 [7.00;10.0]	0.014
Night wakings	3.00 [3.00;4.00]	3.00 [3.00;4.00]	4.00 [3.00;5.00]	0.003
Sleep Disordered breathing	3.00 [3.00;4.00]	3.00 [3.00;4.00]	3.00 [3.00;5.00]	0.005
Daytime sleepiness	12.0 [11.0;14.0]	12.0 [11.0;14.0]	13.0 [12.0;15.0]	<0.001

Source: Author data (2021)

Table 2 presents the sleep of children divided by subcategories and the first column corresponds to the data of all children analyzed. It is observed that the biggest sleep disturbance is in Daytime Sleepiness (12.0; 11.0 – 14.00) followed by bedtime resistance (10.0; 10.0-12.0) and parasomnias (8.0; 7.0–9.0).

The second and third columns of Table 3 present a comparison of the sleep of children who do not have ADHD with those whose parents report having ADHD. It can be observed that children with ADHD present in 6 of the 8 subcategories of the CSHQ questionnaire a more disturbed sleep than children without ADHD with statistical significance. Is observed more disturbed sleep in Daytime sleepiness (13.0 – 12.0 – 5.0; p<0.01), bedtime resistanca (12.0; 12.0 – 13.0; p<0.05), parasomnias (9.0; 7.0 – 10.0; p<0.05); sleep anxiety (7.0; 5.0 – 10.0; p<0.05), night wakings (4.0; 3.0 – 5.0; p<0.05) and sleep disordered breathing (3.0; 3.0 – 5.0; p<0.05).

#### 4. DISCUSSION

This study was carried out to know the sleep profile of children aged 6 to 10 years who live in southern Brazil, for this purpose, the CSHQ was used, which is one of the most used multidimensional tools to track pediatric sleep problems, being designed to reflect common clinical symptoms presented in school-age children (4-10 years old)(11).

In addition to knowing how the children's sleep was, this article also chose to compare the sleep of control children with children whose parents report having ADHD. The data from this research indicate about 48/1445 children with ADHD, corresponding to 3.3% of the analyzed population, being predominantly male. Recent studies indicate that boys diagnosed with ADHD exhibit more impulsive and hyperactive behaviors due to changes in the maturation of the limbic system and the basal ganglia (12).

When analyzing children's sleep hours, followed the recommendation of National Sleep Foundation that children aged 6 to 10 years should sleep 9 to 11 hours a day (13). The data collected in this survey match this recommendation, because the average number of hours slept by the analyzed children corresponds to 10

hours per night, having a good amount of sleep. A current study suggests that the more consistently at least 10 hours of sleep occur during the night, better is the fit of children (14).

It is known that sleep deprivation has been associated with failures in executive functions, attention, memory and language, resulting in learning difficulties, of impulse modulation and the behavior (5). Sleep problems are common throughout childhood and adolescence, making a significant impact on the lives of children and families (6). It is also known that ADHD is commonly associated with sleep disturbances. (14).

Researchers in 2018 investigated the relationship between sleep and attentional performance in children aged 6 to 18 years and realized that attentional performance can be impaired by the duration and sleep irregularity and which can also affect neurocognitive and neurobehavioral performance (15).

Therefore, it is up to the discussion of the time of the beginning of the classes in the morning, because, although it is believed that children would compensate for the lack of sleep by sleeping in the afternoon, researchers observed that regularity of sufficient nighttime sleep appeared to be more important for school adjustment than the total amount of sleep throughout the day or the proportion of 24-hour periods in which children slept 10 or more hours (14), initial research suggests that the delay in starting classes has been effective in increasing sleep (16,17). Unfortunately, until the moment, little or no research related to public policy (for example, class start times, homework policies, nap times) that can affect the sleep health of children aged 5 to 9 years is available (18).

In this article, it can also be observed in Table 2 that in general children have some sleep disorders, such as daytime sleepiness (12.0;11.0–14.00) followed by bedtime resistance (10.0;10.0-12.0), parasomnias (8.0;7.0–9.0), sleep duration (7.00;6.00-7.00) sleep anxiety (6.00;4.00-8.00). More than a third of USA children aged 6 to 9 have inadequate sleep, according to their parents and inadequate sleep increases in adolescence for almost half of USA teens (19), having difficulty falling asleep, restless sleep and frequent nocturnal awakenings (20), sleep disorders similar to those found in this research.

Several studies using parent questionnaires have consistently reported sleep problems in ADHD, with the most frequently reported problems being difficulty initiating sleep, increased nighttime awakenings, snoring, parasomnias and nightmares, short total sleep time and subsequent daytime sleepiness (21).

The children with ADHD are significantly more impaired than controls on most subjective and some objective measures of sleep (22).

These results suggest that family-based interventions to establish consistent patterns of sufficient nighttime sleep should start early (14). Furthermore, the implementation of a sleep intervention in children with ADHD could improve outcomes beyond treating ADHD. It is possible that such an intervention may reduce the need for medication in some childrens (2).

Thus, emphasizing the importance of scaling up sleep interventions for all school-age children, therefore, awareness of the parents and the school community about the importance of sleep for childhood development is suggested.

## 5. FINAL CONSIDERATIONS

With this research it can be observed that children aged 6 to 10 years have adequate amount of sleep, but have disturbed sleep, as stated by the literature, which tends to improve with age, having difficulty falling asleep, anxiety with sleep and parasomnias that result in daytime sleepiness. Children with TDAH have even more disturbed sleep than children in the control group. It is known that sleep disorders can cause serious health damage and learning for children and that can be perpetuated into adulthood.

## REFERENCES

1. Voci A, Bruni O, Ferilli MAN, Papetti L, Tarantino S, Ursitti F, et al. Sleep disorders in pediatric migraine: A questionnaire-based study. *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Aug 2;10(16).
2. Sung V, Hiscock H, Sciberras E, Efron D. Sleep Problems in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2008 Apr 1;162(4):336.
3. Blackwell CK, Hartstein LE, Elliott AJ, Forrest CB, Ganiban J, Hunt KJ, et al. Better sleep, better life? How sleep quality influences children's life satisfaction. *Quality of Life Research*. 2020 Sep 1;29(9):2465–74.
4. Schlieber M, Han J. The Role of Sleep in Young Children's Development: A Review. *The Journal of Genetic Psychology*. 2021 Jul 4;182(4):205–17.
5. Ganelin-Cohen E, Ashkenasi A. Disordered sleep in pediatric patients with attention deficit hyperactivity disorder: An overview. *Israel Medical Association Journal*. 2013;15(11):705–9.
6. Giroto, Edmarion; Costa, Camila Kaibara; Borges L da S. Caracterização das prescrições de metilfenidato em rede de farmácias do município de londrina, paraná, 2010. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2011;VIII(3):26–40.
7. Owens JA. Sleep disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Current Psychiatry Reports*. 2008 Oct 17;10(5):439–44.

8. Silva FG, Silva CR, Braga LB, Neto AS. Portuguese Children's Sleep Habits Questionnaire - Validation and cross-cultural comparison. *Jornal de Pediatria*. 2014 Jan;90(1):78–84.
9. Owens JA, Spirito A, McGuinn M. The Children's Sleep Habits Questionnaire (CSHQ): psychometric properties of a survey instrument for school-aged children. *Sleep*. 2000 Dec 15;23(8):1043–51.
10. de Medicina F, Lisboa DE, Pinto HC, Loureiro P, Silva G. UNIVERSIDADE DE LISBOA Adaptação e Validação do Children Sleep Habits Questionnaire e do Sleep Self Report para Crianças Portuguesas Mestrado em Ciências do Sono.
11. Bonuck KA, Goodlin-Jones BL, Schechter C, Owens J. Modified Children's sleep habits questionnaire for behavioral sleep problems: A validation study. *Sleep Health*. 2017 Jun 1;3(3):136–41.
12. Wang L, Lee S, Yuan S, Yang C, Yang K. Prevalence rates of youths diagnosed with and medicated for ADHD in a nationwide survey in Taiwan from 2000 to 2011. *Compendium Newtown Pa* [Internet]. 2010;17(3):147–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15237199>
13. National Sleep Foundation. National Sleep Foundation [Internet]. National Sleep Foundation. 2022. Available from: <https://www.thensf.org/how-many-hours-of-sleep-do-you-really-need/>
14. Teti DM, Whitesell CJ, Mogle JA, Crosby B, Buxton OM, Bierman KL, et al. Sleep Duration and Kindergarten Adjustment. *Pediatrics* [Internet]. 2022 Jul 11; Available from: <https://publications.aap.org/pediatrics/article/doi/10.1542/peds.2021-054362/188501/Sleep-Duration-and-Kindergarten-Adjustment>
15. Spruyt K, Herbillon V, Putois B, Franco P, Lachaux JP. Mind-wandering, or the allocation of attentional resources, is sleep-driven across childhood. *Scientific Reports*. 2019 Dec 1;9(1).
16. Minges KE, Redeker NS. Delayed school start times and adolescent sleep: A systematic review of the experimental evidence. Vol. 28, *Sleep Medicine Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2016. p. 86–95.
17. Dunster GP, de La Iglesia L, Ben-Hamo M, Nave C, Fleischer JG, Panda S, et al. Sleepmore in Seattle: Later school start times are associated with more sleep and better performance in high school students. Vol. 4, *Sci. Adv*. 2018.
18. Tsao HS, Gjelsvik A, Sojar S, Amanullah S. Sounding the Alarm on Sleep: A Negative Association Between Inadequate Sleep and Flourishing. In: *Journal of Pediatrics*. Mosby Inc.; 2021. p. 199-207.e3.
19. Hawkins SS, Takeuchi DT. Social determinants of inadequate sleep in US children and adolescents. *Public Health*. 2016 Sep 1;138:119–26.
20. Salavessa, Manuel; Vilariça P. Problemas de sono em idade pediátrica. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*. 2009;25:584–91.
21. Singh K, Zimmerman AW. Sleep in Autism Spectrum Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. Vol. 22, *Seminars in Pediatric Neurology*. W.B. Saunders; 2015. p. 113–25.
22. Cortese S, Faraone S v., Konofal E, Lecendreux M. Sleep in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Meta-Analysis of Subjective and Objective Studies. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2009 Sep;48(9):894–908.

**Keywords:** sleep; children; ADHD.



## SAÚDE EMOCIONAL DE ADOLESCENTES DE UM COLÉGIO INTERNO NO PARANÁ

**Wanderson Rocha Oliveira<sup>1</sup>; Cristiane Fabíola Verdan da Silva<sup>2</sup>, Radyjia de Lima Pinto<sup>3</sup>, Ana Carolina Jacinto Alarcão<sup>4</sup>; Késia Palma-Rigo<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 Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba, PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba, PR

<sup>4</sup>Coordenadora e Docente do curso de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba, PR

<sup>5</sup>Docente na Faculdade Adventista Paranaense e colaboradora no programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: woliveira.enf@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As doenças não comunicáveis são responsáveis por 71% das mortes no mundo a cada ano (1). As doenças psicoemocionais, como depressão, ansiedade, síndrome do pânico, suicídio fazem parte desta categoria, sendo reconhecida como problema de saúde pública, necessitando do desenvolvimento de políticas públicas para prevenção e tratamento.

Entre os grupos alvo de intervenção encontra-se o adolescente, o qual tem sido considerado chave para um futuro sustentável (2,3), pois nesta fase da vida a prevalência de ansiedade varia de 4% e 20% (4) e de depressão entre 3,3% a 12,4% (5). Nos países de renda média, houve crescimento na tendência, como o Brasil (6-10). Neste contexto, a depressão tem maior prevalência, se caracterizando por humor irritado, capacidade de concentração baixa, presença de hiperatividade, ansiedade (10,11). Na adolescência, as mudanças da puberdade, a necessidade de aceitação social e as pressões sociais e familiares aumentam a prevalência desta doença (10,11), o que se agrava quando na presença do risco de suicídio (11).

Já a ansiedade se define pelo sentimento desagradável de antecipação de perigo, imediato ou no futuro (12, 13). Porém, quando se manifestam de forma disfuncional, podem estar associados ao surgimento de outras psicopatologias na vida adulta (13). Quando não identificados e tratados precocemente na adolescência, a presença da depressão e ansiedade na vida adulta apresentam-se com impactos negativos e significativos nos aspectos físicos, psicológicos, no nível de independência do indivíduo, nas relações sociais e trabalhistas, na interpretação do ambiente e até mesmo nas relações com o espiritual (14-18).

A perspectiva de que o ambiente afeta o desenvolvimento do indivíduo, ressalta a importância de que o adolescente cresça em um ambiente social que favoreça o desenvolvimento físico, psíquico e social (9). O fato de sair de casa para fins de estudos, pode impactar a vida do adolescente, gerando estresse, desconforto emocional, ansiedade, angústia e tristeza; porém, pode desenvolver independência, maturidade e autoconhecimento, desenvolvimento das relações interpessoais e aumento da motivação (20, 21).

Poucos estudos exploram a saúde mental de um grupo específico de adolescentes que vivem longe de suas famílias nesta fase sensível do desenvolvimento. Hipotetizamos que adolescentes que estudam em uma escola com regime de internato apresentam alta ocorrência de doenças psicoemocionais como ansiedade e depressão, marcada pelo uso precoce de psicofármacos. Neste sentido, este estudo objetiva avaliar a prevalência de doenças psicoemocionais em adolescentes estudantes de uma escola, em regime de internato, no interior do Paraná.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é parte de um projeto de maior amplitude intitulado "Biomarcadores para síndrome cardiometabólica na adolescência e sua relação com as condições da vida perinatal" e aprovado pelo COPEP sob o número de parecer: 15201519.8.0000.0104. Trata-se de um estudo observacional-transversal em alunos, entre 14 e 18 anos, do Instituto Adventista Paranaense, uma escola com regime de internato. A inclusão dos indivíduos foi formalizada através de consentimento escrito e assinado pelos responsáveis e pelo próprio indivíduo, contendo um termo de esclarecimento com informações sobre os objetivos do estudo e as metodologias empregadas.

Os critérios para inclusão foram: 1) estudar no Instituto Adventista Paranaense; 2) apresentar idade entre 14 e 18 anos; 3) Termo de consentimento assinado pelos responsáveis; 4) Termo de assentimento assinado. Os critérios de exclusão foram: apresentar diagnóstico de doença infecciosa ou outra não relacionada à síndrome cardiometabólica e doenças psicoemocionais. Os alunos foram convidados a participar através da divulgação do projeto em sala de aula e os pais receberam um convite e informações através do e-mail e pelo aplicativo de mensagens instantâneas whatsapp. Os interessados foram convidados a participar de um evento para a coleta dos dados.

As coletas foram realizadas em dois blocos: nos meses de outubro a novembro de 2019 e nos meses de outubro a novembro de 2021, período em que os alunos estavam retornando gradualmente para as atividades presenciais. 64 indivíduos fizeram parte da amostra final.

### 2.1. Avaliação das condições de saúde e uso de medicamentos

A avaliação das condições de saúde e uso de medicamentos foi realizada utilizando uma parte do questionário PNAUM - Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos no Brasil.

### 2.2. Avaliação das condições psicoemocionais

As condições de ansiedade e depressão foram avaliadas através dos instrumentos validados: "Inventário de depressão infantil – CDI" e "Inventário de Ansiedade infantil (Adolescentes) – SCARED".

### 2.3. Análise dos dados

A entrada de dados foi realizada na planilha no programa Excel®, objetivando encontrar a frequência da ocorrência da sintomatologia nos indivíduos.

## 3. RESULTADOS

As análises dos resultados coletados originaram 6 tabelas, apresentando o percentual de indivíduos com e sem sintomatologia, indivíduos que não apresentaram respostas e o número absoluto de indivíduos participantes.

**Tabela 1 – Frequência da ocorrência de sintomas depressivos**

Sexo	Percentual de indivíduos com sintomas	Percentual de indivíduos sem sintomas	Percentual de indivíduos sem resposta	Total
Masculino	18 (28,12%)	18 (28,12%)	0 (0%)	36 (56,25%)
Feminino	20 (31,25 %)	6 (9,37%)	2 (3,12%)	28 (43,75%)
Total	38 (59,37%)	24 (37,49%)	2 (3,12%)	64 (100,00%)

**Fonte:** os autores (2022)

A Tabela 2 apresenta a frequência da ocorrência de uso de fármacos psicotrópicos. Os achados apontam que os indivíduos do estudo não faziam uso de fármacos psicotrópicos.

**Tabela 2 – Frequência da ocorrência de uso de fármacos psicotrópicos**

Sexo	Percentual de indivíduos em uso de fármacos psicotrópicos	Percentual de indivíduos sem uso de fármacos psicotrópicos	Percentual de indivíduos sem resposta	Total
Masculino	6 (9,37%)	22 (34,37%)	8 (12,5%)	36 (56,25%)

Feminino	<b>5 (7,81%)</b>	<b>19 (29,68%)</b>	<b>4 (6,25%)</b>	<b>28 (43,75%)</b>
Total	<b>11 (17,18%)</b>	<b>41 (64,05%)</b>	<b>12 (18,75%)</b>	<b>64 (100,00%)</b>

**Fonte:** os autores (2022)

A Tabela 3 apresenta a frequência da ocorrência de Transtornos de Ansiedade Generalizada (TAG). Os resultados apresentaram elevada frequência em ambos os sexos, com maior incidência na população feminina. Estes sintomas manifestam-se de forma a preocupar-se com a percepção dos que o cercam sobre si, ser nervoso, com o fato de ser tão bom quanto as outras pessoas, preocupar-se com o futuro, realizar as atividades com o máximo de perfeição, e preocupar-se com o passado, de acordo com o Inventário de Ansiedade Infantil – SCARED.

**Tabela 3 –** Frequência da ocorrência de transtorno de ansiedade generalizada (TAG)

Sexo	Percentual de indivíduos com sintomatologia de TAG	Percentual de indivíduos sem sintomatologia de TAG	Percentual de indivíduos sem resposta	Total
Masculino	<b>25 (39,06%)</b>	<b>11 (17,18%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>36 (56,25%)</b>
Feminino	<b>26 (40,62%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>28 (43,75%)</b>
Total	<b>51 (79,68%)</b>	<b>11 (17,18%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>64 (100,00%)</b>

**Fonte:** os autores (2022)

A Tabela 4 apresenta a ocorrência de Transtorno de Ansiedade de Separação (TAS), e os resultados apresentam que a maioria de indivíduos do estudo não apresenta estes sintomas, porém, a análise comparativa entre o número dos que apresentam sintomatologia apresenta prevalência do sexo feminino. Estes sintomas estão associados com medo de ficar longe de casa, maior dependência dos pais, preocupação com o futuro dos pais, de acordo com o Inventário de Ansiedade Infantil – SCARED.

**Tabela 4 –** Frequência da ocorrência de transtorno de ansiedade de separação (TAS)

Sexo	Percentual de indivíduos com sintomatologia de TAS	Percentual de indivíduos sem sintomatologia de TAS	Percentual de indivíduos sem resposta	Total
Masculino	<b>9 (14,06%)</b>	<b>27 (42,18%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>36 (56,25%)</b>
Feminino	<b>13 (20,31%)</b>	<b>13 (20,34%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>28 (43,75%)</b>
Total	<b>22 (34,37%)</b>	<b>40 (62,52%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>64 (100,00%)</b>

**Fonte:** os autores (2022)

A Tabela 5 apresenta a ocorrência de transtorno de ansiedade social, e os dados revelam maior prevalência destes sintomas na população feminina. Os sintomas estão relacionados com não se sentir a vontade ao redor de pessoas desconhecidas, ser observado fazendo alguma atividade por outros indivíduos da mesma idade, sentir-se tímido, de acordo com o Inventário de Ansiedade Infantil – SCARED.



**Tabela 5 – Frequência da ocorrência de transtorno de ansiedade social**

Sexo	Percentual de indivíduos com sintomatologia de transtorno de ansiedade social	Percentual de indivíduos sem sintomatologia de transtorno de ansiedade social	Percentual de indivíduos sem resposta	Total
Masculino	<b>10 (15,62%)</b>	<b>26 (40,62%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>36 (56,25%)</b>
Feminino	<b>15 (23,43%)</b>	<b>11 (17,18%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>28 (43,75%)</b>
Total	<b>26 (39,05%)</b>	<b>37 (57,8%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>64 (100,00%)</b>

**Fonte:** os autores (2022)

A Tabela 6 apresenta a frequência da ocorrência de ansiedade, considerando o score total igual ou acima de 25 de acordo com o Inventário de Ansiedade Infantil – SCARED. Os resultados apontam maior frequência na população feminina, com presença em quase toda a população deste gênero, participantes deste estudo.

**Tabela 6 – Frequência da ocorrência de ansiedade, de acordo com o score total da SCARED**

Sexo	Percentual de indivíduos com fobia escolar	Percentual de indivíduos sem fobia escolar	Percentual de indivíduos sem resposta	Total
Masculino	<b>18 (28,12%)</b>	<b>18 (28,12%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>36 (56,25%)</b>
Feminino	<b>23 (35,93%)</b>	<b>3 (4,68%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>28 (43,75%)</b>
Total	<b>41 (64,05%)</b>	<b>21 (32,8%)</b>	<b>2 (3,12%)</b>	<b>64 (100,00%)</b>

**Fonte:** os autores (2022)

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo o objetivo principal foi avaliar a prevalência de doenças psicoemocionais em estudantes adolescentes, os resultados encontrados corroboram com a literatura, pois apontaram maior prevalência de sintomatologia depressiva em meninas que em meninos (22-24). A prevalência de depressão é baixa até a idade dos nove anos de idade, aumentando gradativamente até os dezenove anos, acentuando-se a partir dos treze a quatorze anos, pois nesta faixa etária as meninas começam a apresentar taxas mais altas de depressão que os meninos, sendo que após os quinze anos de idade, esta taxa tende a dobrar (24).

Os transtornos depressivos na idade da adolescência representam na atualidade um problema de saúde pública, visto seus altos e crescentes índices na população geral, e que em muitos casos, finda na ocorrência de suicídio. É de ser considerado que este transtorno, em adultos, é pouco diagnosticado, e quando o são, recebem tratamento inadequado. Fato este, que se torna carente de maior atenção quando em adolescentes, pois as manifestações clínicas se diferem das dos adultos e possuem características próprias (25).

Com relação a ocorrência de ansiedade, os resultados apontaram predomínio na população feminina, porém, há proporções consideráveis em ambos os sexos. A ocorrência de sintomatologia corrobora com o apresentado na literatura, no que se refere a presença de receio que hajam alterações nas relações consigo mesmo, com aqueles que o cercam, com seus pais, bem como as competências escolares. Ainda a presença de mialgia, cefaleias, fadiga, sensação de vertigem e síncope, a interferência na aprendizagem, o ataque de pânico e fobias (5).

O receio manifesto de separar-se dos pais e de sua casa, ou estar preocupado constantemente com a saúde dos pais, dificuldade em dormir sozinho, bem como a recusa em ir à escola, indica a ansiedade de

separação e de ansiedade generalizada, dados encontrados neste estudo. Já o fato de sentir-se desconfortável em contextos sociais ou em ambientes não familiares, indicam fobia social, fato também apresentado na população estudada (5).

Com relação ao uso de medicamentos psicotrópicos, a literatura apresenta predominância no sexo feminino (26, 27), porém, os achados deste estudo não apontaram relação significativa, visto a maior parte dos participantes não utilizarem esta classe de medicamento. Neste sentido, os resultados podem corroborar com a literatura (26, 27), ao revelar que o fato de estar longe de casa para estudar pode contribuir para o desenvolvimento de sintomas de ansiedade e depressão, quando o objetivo da família é “livrar-se” do adolescente, ou como forma punitiva, somando-se ao fato de o adolescente em muitos casos, não estar pronto para sair de casa.

Portanto, os estudos apontam que um bom nível de satisfação do adolescente com os pais pode ser um fator protetor no desenvolvimento de sintomas depressivos, em especial com a figura da mãe. É apresentado que mesmo a relação familiar de baixa qualidade pode contribuir para a manutenção da saúde mental, no desenvolvimento de aspectos positivos na prevenção de sintomatologia depressiva (28-30).

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo apontou alta frequência de transtornos depressivos e de ansiedade nos adolescentes, podendo indicar que a saúde emocional destes está prejudicada no ambiente de internato. Embora a literatura aponte que o fato de sair de casa para estudar durante a fase da adolescência, período crítico na vida, pode gerar sintomatologia que afetam a saúde emocional, o desenvolvimento de programas que aproximem a família dos momentos de aprendizado, mesmo em regime de colégio interno, pode favorecer a melhoria da saúde mental destes adolescentes, prevenindo transtornos depressivos e de ansiedade.

## FINANCIADORES

Instituto Adventista Paranaense.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Adventista Paranaense, por viabilizar a realização deste estudo.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. *Noncommunicable diseases*. Fact sheet 2018 June 2017 [cited 2018 June 2018].
2. Kleinert, S. and R. Horton, *Adolescent health and wellbeing: a key to a sustainable future*. Lancet, 2016. 387(10036): p. 2355-6.
3. WHO. *Adolescents: health risks and solutions*. Fact sheet 2017 May 2017 [cited 2017 08 August 2017].
4. Petersen, C. S. (2011). *Evidências de efetividade e procedimentos básicos para terapia cognitivo-comportamental para crianças com transtornos de ansiedade*. Revista Brasileira de Psicoterapia, 13, 39-50.
5. Bahls S, Bahls F. *Depressão na adolescência: características clínicas*. Inter em Psicol. 2002; (6)1: 49-57.
6. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). *GBD Compare Data Visualization*. Seattle, WA: IHME, University of Washington; 2016 [cited 2017 Oct 11].
7. GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators. *Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. Lancet. 2017;390(10100):1260-344.
8. Viana MC, Teixeira MG, Beraldi F, Bassani Ide S, Andrade LH. *São Paulo Megacity Mental Health Survey - a population-based epidemiological study of psychiatric morbidity in the São Paulo metropolitan area: aims, design and field implementation*. Rev Bras Psiquiatr. 2009;31(4):375-86.
9. Brito, V. C. D. A., Bello-Corassa, R., Stopa, S. R., Sardinha, L. M. V., Dahl, C. M., & Viana, M. C. (2022). *Prevalência de depressão autorreferida no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde 2019 e 2013*. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 31.
10. Mangolini, V. I., Andrade, L. H., Wang, Y. P. (2019). *Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil: uma revisão de literatura*. Revista de Medicina, 98(6), 415-422.
11. Bhatia, Shashi K., and Subhash C. Bhatia. "Childhood and adolescent depression." American family physician 75.1 (2007): 73-80.
12. Weersing, V. R., Jeffreys, M., Do, M. C. T., Schwartz, K. T., & Bolano, C. (2017). Evidence base update of psychosocial treatments for child and adolescent depression. *Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology*, 46(1), 11-43.
13. Mendelson, Tamar, and S. Darius Tandon. "Prevention of depression in childhood and adolescence." *Child and Adolescent Psychiatric Clinics* 25.2 (2016): 201-218.

14. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5. ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 991 p.
15. Grolli, Verônica, Marcia Fortes Wagner, and Simone Nenê Portela Dalbosco. "Sintomas depressivos e de ansiedade em adolescentes do ensino médio." *Revista de Psicologia da IMED* 9.1 (2017): 87-103.
16. Gameiro, S., Carona, C., Pereira, M., Canavarro, M. C., Simões, M., Rijo, D., et al (2008). Sintomatologia depressiva e qualidade de vida na população geral. *Psicologia, Saúde e Doenças*, 9(1), 103-112.
17. Souza, Luciano Dias de Mattos. "Transtorno de ansiedade generalizada em jovens de 18 a 24 anos: prevalência, fatores associados, comorbidades e impacto na qualidade de vida." (2010).
18. Ribeiro, H. K. P., Santos, J. D. M., Silva, M. D. G., Medeiro, F. D. D. A., & Fernandes, M. A. (2019). Transtornos de ansiedade como causa de afastamentos laborais. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 44.
19. Senna, S. R. C. M., & Dessen, M. A. (2012). *Contribuições das teorias do desenvolvimento humano para a concepção contemporânea da adolescência*. *Psicologia: teoria e Pesquisa*, 28, 101-108.
20. De Lima, R. F., Sacramento, A. M., & Dias, A. C. G. SAIR DE CASA PARA ESTUDAR: DESAFIOS DE ESTUDANTE DO ENSINO MÉDIO PROFISSIONALIZANTE. INVESTIGAÇÃO E PRÁTICAS EM ORIENTAÇÃO DE CARREIRA: CENÁRIO 2018, 59.
21. Vizzotto, M. M., de Jesus, S. N., & Martins, A. C. (2017). *Saudades de casa: indicativos de depressão, ansiedade, qualidade de vida e adaptação de estudantes universitários*. *Revista Psicologia e Saúde*, 9(1), 59-73.
22. Germain, F., & Marcotte, D. (2016). Sintomas de depressão e ansiedade na transição do ensino secundário ao ensino médio: evolução e fatores influentes. *Adolescência e Saúde*, 13(1), 19-28.
23. Herkov, M. J. & Myers, W. C. (1996). MMPI profiles of depressed adolescents with and without conduct disorder. *Journal of Clinical Psychology*, 52(6), 705-710.
24. Versiani, M.; Reis, R. & Figueira, I. (2000). Diagnóstico do transtorno depressivo na infância e adolescência. *J Bras Psiquiatria*, 49(10-12), 367-382.
25. Nolen-Hoeksema, S. & Girgus, J. S. (1994). The emergence of gender differences in depression during adolescence. *Psychological Bulletin*, 115(3), 424-443.
26. Tavares, B. F., Béria, J. U., & Lima, M. S. D. (2001). Prevalência do uso de drogas e desempenho escolar entre adolescentes. *Revista de Saúde Pública*, 35, 150-158.
27. Guimarães, J. L., Godinho, P. H., Cruz, R., Kappann, J. I., & Tosta Junior, L. A. (2004). Consumo de drogas psicoativas por adolescentes escolares de Assis, SP. *Revista de Saúde Pública*, 38, 130-132.
28. Costa, B. S., Matos, A. P., & Costa, J. J. (2018). O efeito moderador da satisfação com a vida na associação entre a qualidade da relação pais/filhos (as) e depressão na adolescência.
29. Pasini, A. L. W., da Silveira, F. L., da Silveira, G. B., Busatto, J. H., Pinheiro, J. M., Leal, T. G., et al (2020). Suicídio e depressão na adolescência: fatores de risco e estratégias de prevenção. *Research, Society and Development*, 9(4), e36942767-e36942767.
30. Baptista, M. N., Baptista, A. S. D., & Dias, R. R. (2001). Estrutura e suporte familiar como fatores de risco na depressão de adolescentes. *Psicologia: ciência e profissão*, 21, 52-61.

**Palavras-chave:** adolescência; sintomas depressivos; transtorno de ansiedade; psicofármacos.



## EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E REABSORÇÃO ALVEOLAR APÓS A INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL E TRATAMENTO COM GEL DE *Limonium brasiliense* EM RATOS WISTAR

Ana Paula Fiorotto<sup>1</sup>; Driele Fernanda Schneider<sup>2</sup>; Gislaine Stella Alves Amaral<sup>3</sup>; Cléverson de Oliveira e Silva<sup>4</sup>; João Carlos Palazzo de Mello<sup>5</sup>; Luzmarina Hernandez<sup>6</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 Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Mestre em Odontologia Integrada, Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 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 Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Docente –Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: [paulafiorotto@gmail.com](mailto:paulafiorotto@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença infecciosa que afeta as estruturas de suporte dos dentes, implica na qualidade funcional e estética do portador, e é capaz de desencadear doenças sistêmicas e crônicas (1, 2). A doença afeta até 60% da população adulta mundial, é considerada uma das causas primárias da perda dentária, tratando-se de um problema de saúde pública (3,4,5). Sua prevalência é mais comum com a progressão da idade, acometendo mais os idosos (2).

A destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar é um evento chave na doença periodontal e resulta da persistente resposta imune inflamatória contra patógenos na região periodontal (6,7). Os eventos inflamatórios iniciais da doença levam à produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas que agem no recrutamento seletivo de leucócitos para o espaço periodontal. No tecido, estes leucócitos são ativados e produzem quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ) e IL-6 (Interleucina-6), contribuindo para a amplificação e migração de mais leucócitos (8).

A destruição do tecido conjuntivo leva a perda do osso alveolar, um evento chave na doença periodontal. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção do equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, por osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (9).

O maior mecanismo regulatório da atividade osteoclástica é dirigido pelo receptor RANK, seu ligante RANKL, e seu counterpart (contraparte) solúvel osteoprotegerina (OPG). A ligação de RANKL ao seu receptor RANK, presente na superfície de pré-osteoclastos, dirige sua maturação e ativação, enquanto OPG age como um receptor "isca" para o RANKL e inibe a ligação RANK- RANKL (9). Assim, o equilíbrio entre RANK e OPG é essencial para a determinação da atividade osteolítica total, e estudos tem mostrado um aumento na expressão de RANKL na doença periodontal (10,11). Subgrupos de leucócitos também produzem RANKL ou induzem sua produção por células residentes, e o aumento nos níveis de RANKL resultam em desequilíbrio nos níveis de OPG, resultando em aumento na reabsorção óssea, característico da doença periodontal ativa.

Por fim, a reação inflamatória crônica local também resulta em desequilíbrio na proporção MMP/TIMP, o que contribui para a destruição da matriz extracelular de tecidos periodontais mineralizados e não mineralizados (9,10,11).

As estratégias atuais de tratamento da periodontite incluem, debridamento mecânico, antissépticos orais, antibacterianos e anti-inflamatórios, estratégias suscetíveis a desenvolver fatores multirresistentes e efeitos indesejáveis, tornando o tratamento insatisfatório (12,13,14). Por essa razão, existe a necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas.

A indução experimental de doença periodontal é importante e tem sido utilizada para aprofundar os

conhecimentos na patogênese da doença e em opções terapêuticas como o uso de plantas medicinais contra periopatógenos (12). O uso de modelos de indução por ligadura, por exemplo, evidencia as regiões afetadas pela progressão da doença e o acúmulo bacteriano em locais específicos, cooperando para investigação da patogênese da periodontite (15).

O *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) é uma planta típica em regiões litorâneas do Sul do Brasil, conhecido popularmente como Baicuru ou Guaicuru, pertencentes a família Plumbaginaceae, na qual se destaca o *Limonium* (16). Suas raízes contém naftoquinonas, com atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (17). A ação antimicrobiana é atribuída aos polifenóis (ácido gálico, epigallocatequina-3-O-galato, Samarangenina A e Samarangenina B), em extratos acetona: água da *L. brasiliense* (18). Estudos *in vitro* demonstraram sua atividade contra a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, indutora da doença periodontal. Recentemente, um estudo pré-clínico, acompanhado de análise descritiva histológica, evidenciou a redução da inflamação e da perda óssea alveolar, associada com a doença periodontal, em modelo de doença induzida por ligadura de algodão no segundo molar em ratos Wistar tratados com gel de *Limonium brasiliense* 1%.

É de interesse o aprofundamento das análises, para avaliar a ação deste fitofármaco na terapêutica da doença periodontal. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar por método imunohistoquímico a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  e analisar por método histomorfométrico a perda óssea alveolar, em ratos com doença periodontal induzida por ligadura de algodão, após tratamento com gel de *Limonium brasiliense*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Droga Vegetal

Os rizomas de *Limonium brasiliense* foram adquiridos na Ilha dos Marinheiros (31°59'33" S, 52°10'43" W) na cidade Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, em maio de 2010. Exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob número HUEM 21151 e identificada pela Profa. Dra. Lilian Auler Mentz, UFGR. O material vegetal foi coletado com permissão do IBAMA-SISBIO e registrado sob número 11995-3 em 2 de novembro de 2010, código de autenticação 46367613, sob responsabilidade de J. C. P. Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado pelo número 010252/2015-0. A droga vegetal foi seca em estufa de circulação de ar em temperatura de 37  $\pm$  2 °C, em seguida moída em moinho de martelos (Tigre ASN-6). O preparo das frações acetato de etila (FAE) foram realizados de acordo com Blainsk (13).

### 2.2 Preparação do gel de *Limonium brasiliense*

Na preparação do gel base foi utilizado Carbopol 974P 0,5%, Trietanolamina (1%) e água destilada (q.s.p.). A clorexidina 0,12% ou a fração acetato de etila de *L. brasiliense* a 0,5% ou 1% ou 2% foram incorporados no gel base, de acordo com a formulação desejada. O gel base foi utilizado como controle negativo.

### 2.3 Experimentação animal

Todos os protocolos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo CEUA/UEM Nº 8930141118. Foram utilizados ratos Wistar machos jovens adultos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), com cerca de 65 dias de idade, provenientes do biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais permaneceram em gaiolas em condições controladas de temperatura, com ciclos claro/escuro de 12h, ração balanceada Nuvital (Nuvilab, Curitiba, Brasil) e água *ad libitum*.

A doença foi induzida por meio da colocação de ligadura de algodão nº 10 (Coats Corrente, São Paulo, Brasil) no sulco gengival nos segundos molares (19) superiores, de cada rato. A ligadura permaneceu em íntimo contato com os tecidos gengivais, ficando com o nó voltado para a face palatina e sendo mantido durante todo o período experimental. Esse método permite o acúmulo de biofilme e desenvolvimento da periodontite (20).

O tratamento foi iniciado imediatamente após a colocação da ligadura. O gel foi aplicado com *microbrush* durante um minuto, duas vezes ao dia, até o dia da eutanásia, no décimo primeiro dia (21). As ligaduras foram verificadas diariamente e refeitas quando necessário. Durante o tratamento os animais foram mantidos sedados por inalação de isoflurano, em câmara anestésica. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos:

- (1) Controle negativo (n=4): sem indução da doença;
- (2) Controle positivo (n=4): com doença periodontal, sem tratamento;
- (3) *Limonium* 0,5% (n=4): com doença periodontal, tratados com gel *L. brasiliense* 0,5%;
- (4) *Limonium* 1% (n=4): com doença periodontal, tratados com gel de *L. brasiliense* 1%;
- (5) *Limonium* 2% (n=4) com doença periodontal, tratado com gel de *L. brasiliense* 2%.

Os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico, associação de cloridrato de xilazina 2% (20 mg/Kg de peso do animal) (Rompun®, Bayer, São Paulo, Brasil) e cetamina 10% (100 mg/ Kg de peso

do animal) (Agener, São Paulo, Brasil). As amostras contendo os molares foram coletadas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas, descalcificadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) entre 4 e 11 dias e a seguir processadas para inclusão em parafina. As lâminas foram coradas com HE para estudo morfológico e imunocoradas para avaliar a expressão de citocinas pro-inflamatórias.

#### 2.4 Análise da reabsorção do osso alveolar

A reabsorção do osso alveolar na região da furca foi avaliada por meio de estudo histomorfométrico. Imagens do osso alveolar, na região da furca foram capturadas por câmera Nikon Digital Sight – DS-fi1C (Tóquio, Japão) acoplada em microscópio Nikon Eclipse® 80i (Tóquio, Japão), com objetiva de 4X e analisadas por dois observadores treinados. O tecido ósseo presente na região da furca teve sua área mensurada utilizando o *Software Image-Pro Plus®* (versão 4.5- Media Cybernetics). Para cada grupo, foram realizadas as medidas em 10 cortes/animal, em 4 animais, totalizando 40 por grupo, nos diferentes grupos. Os resultados foram expressos como média da área  $\pm$  desvio padrão ( $\mu\text{m}^2$ ).

#### 2.5 Estudo Imuno-histoquímico para detectar as citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6

Foram realizados cortes seriados de 6 $\mu\text{m}$  de espessura, aderidos em lâminas sinalizadas. As lâminas foram processadas pelo método de imunocoloração usando a técnica de peroxidase para detectar TNF- $\alpha$  e IL-6.

Para o imunocoloração as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em 97% de metanol seguido de lavagem em solução de TRIS/Triton. O material foi incubado com os anticorpos primários: anti-IL6 (abcam® - ab6672); TNF- $\alpha$  (biorbyt® – orb7100) nas concentração de 1:100. As lâminas foram reveladas usando o kit comercial *Histostain Plus®* (Zymed Laboratories Inc.®). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Meyer.

A intensidade de imunocoloração na região de tecido conjuntivo do periodonto de proteção, localizado paralelamente ao epitélio juncional. A imunocoloração foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++), baseado na intensidade de coloração das células e de matriz extracelular.

Foram analisados cortes histológicos de 4 animais/grupo em microscópio Nikon Eclipse 80i (Tokyo, Japan) acoplado com câmera de alta resolução Nikon Digital Sight – DS-fi1C (Tokyo, Japão).

#### 2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos para a análise da área ocupada por osso alveolar foram submetidos a análise estatística em *software* GraphPad Prisma 7. Foi aplicado o teste *test “t”*, unicaudal, para comparação das áreas médias dos grupos. Foram consideradas significantes as comparações cujo  $p < 0,05$ .

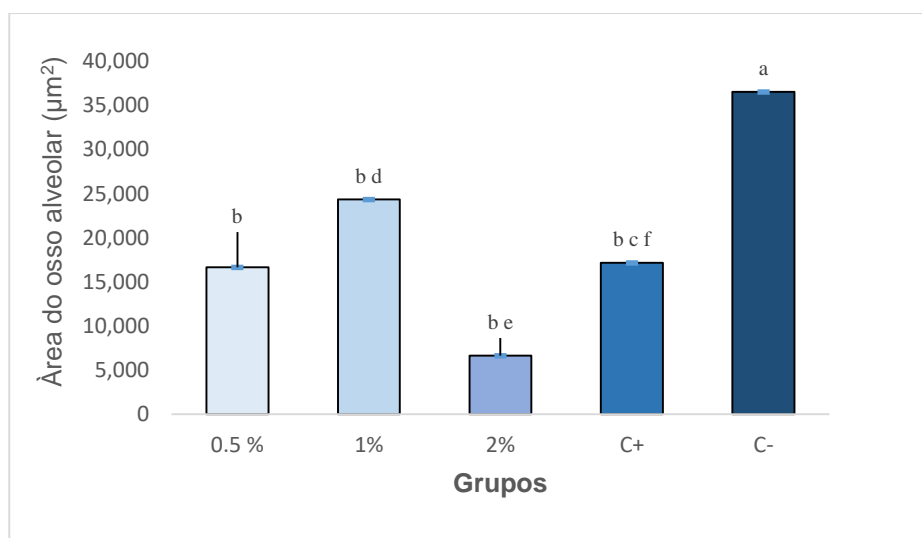
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise morfológica do osso alveolar

A Tabela 1 e a Figura 1 mostram a área média ( $\pm$ DP) ocupado pelo osso alveolar na região da furca nos animais controle e tratados com gel de *L. brasiliense*. A Figura mostra que comparando-se os animais sem doença, com os demais grupos a doença periodontal provocou uma significativa ( $p < 0,05$ ) perda de osso alveolar na região da furca. Os animais tratados como gel a 1% representam ( $p < 0,05$ ) o grupo na qual houve a maior preservação do osso alveolar. A maior perda óssea ocorreu nos animais tratados com o gel a 2%.

**Tabela 1. Área média ( $\mu\text{m}^2$ ) ocupada pelo osso alveolar na região da furca do segundo molar superior de ratos nos diferentes grupos estudados, tratados com gel de *Limonium brasiliense* (0,5%, 1% e 2%). Grupo C+: animais com doença, sem tratamento e Grupo C-: animais saudáveis.**

Grupo	Área em $\mu\text{m}^2$
Controle negativo (C-)	36.547
Controle positivo (C+)	17.161
<i>Limonium b.</i> 0,5%	16.660
<i>Limonium b.</i> 1%	24.360
<i>Limonium b.</i> 2%	6.642



**Figura 1.** Área (média ± DP) do osso alveolar na região da furca em ratos Wistar com doença periodontal induzida com ligadura, no 2º molar superior. Os animais foram tratados com gel de *Limonium brasiliense* (0,5%, 1% e 2%). Grupo C+: animais com doença, sem tratamento e Grupo C-: animais saudáveis, sem doença. [p<0,05 quando comparados (a com b), (c com d), (d com e) e (e com f)].

### 3.2 Estudo imuno-histoquímico

Os Quadros 1 e 2 mostram os resultados referentes à intensidade de imunocoloração para as citocinas TNF-α e IL-6. A maior intensidade de coloração para TNF-α foi observada nos animais do grupo tratado com *L. brasiliense* 1%. Os animais dos grupos tratados com *L. brasiliense* 1% e 2% e o Controle + apresentaram a maior intensidade de coloração para IL-6.

GRUPOS	INTENSIDADE
<i>L. brasiliense</i> 0,5%	++
<i>L. brasiliense</i> 1%	+++
<i>L. brasiliense</i> 2%	++
Controle positivo (C+)	++
Controle negativo (C-)	++

**Quadro 1.** Intensidade de imunocoloração para TNF-α em animais com doença periodontal induzida com ligadura, no 2º molar superior e tratados com gel de *Limonium brasiliense* (0,5%, 1% e 2%). Grupo C+: animais com doença, sem tratamento e Grupo C-: animais saudáveis, sem doença. A imunocoloração foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++), baseado na intensidade de coloração das células e de matriz extracelular.

GRUPOS	INTENSIDADE
<i>L. brasiliense</i> 0,5%	++
<i>L. brasiliense</i> 1%	+++
<i>L. brasiliense</i> 2%	+++
Controle positivo (C+)	+++
Controle negativo (C-)	++

**Quadro 2.** Intensidade de imunocoloração para IL-6 em animais com doença periodontal induzida com ligadura, no 2º molar superior e tratados com gel de *Limonium brasiliense* (0,5%, 1% e 2%). Grupo C+: animais com doença, sem tratamento e Grupo C-: animais saudáveis, sem doença. A imunocoloração foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) ou forte (+++), baseado na intensidade de coloração das células e de matriz extracelular.

## 4. DISCUSSÃO

O rato representa um modelo aceitável para doença periodontal humana. Os ratos possuem um incisivo e três molares em cada quadrante (22,23). A estrutura e a organização dos tecidos periodontais dos molares são muito semelhantes em ratos e humanos (24,25).

O modelo de ligadura ao redor da região cervical dos dentes modula a doença periodontal destrutiva de forma induzida (26) os achados clínicos histológicos encontrados na doença periodontal experimental em ratos assemelham-se a achados em humanos descritos na literatura. Histologicamente, o epitélio juncional gradualmente sofre mudanças patológicas, incluindo *rete pegs*, ulceração e migração apical do epitélio juncional (27). Um infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) aparecem no tecido conjuntivo (28) e PMNs migram através do epitélio para dentro do sulco gengival (29,30). Dano nas fibras colágenas e fibroblastos também ocorre. Alta atividade osteoclástica é observada após a inoculação de organismos de gram-negativos (31).

Neste estudo, o modelo de indução na doença periodontal por ligadura de algodão provocou as alterações inflamatórias e promoveu a perda óssea alveolar em curto período.

Propomos avaliar o efeito do tratamento diário com um gel a base de extrato de *L. brasiliense* em diferentes concentrações. Os resultados das análises morfométricas da área ocupada pelo osso alveolar na região da furca revelou que o gel a 1% contribuiu significativamente para a manutenção do osso alveolar na região da furca. Em estudo anterior já havíamos demonstrado, por uma metodologia de escores, que o gel de *L. brasiliense* a 1% preveniu a destruição do osso alveolar até a altura do terço médio da raiz (32).

No estudo imunohistoquímico, a maior intensidade de imunocoloração para TNF- $\alpha$  ocorreu entre os animais tratados com o gel a 1% (classificados como intensas); porém a resposta inflamatória variou de leve a moderada, segundo análise em cortes histológicos corados com HE, por método semiquantitativo usando escores de 0 a 3 (32). O TNF- $\alpha$  age no processo de migração celular em múltiplos níveis, induzindo a *up-regulation* de moléculas de adesão e quimiocinas envolvidas na migração celular para sítios infectados e inflamados (33). O TNF- $\alpha$  tem um papel central na reação inflamatória e na reabsorção do osso alveolar (6) na doença periodontal. Os estudos imunohistoquímicos ainda estão em curso e, portanto, ainda são parciais.

## 5. CONCLUSÃO

Até o presente momento, conclui-se que os animais cuja doença periodontal foram tratados com o gel de *Limonium brasiliense* 1% houve menor perda de osso alveolar na região da furca.

## FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

1. Cardoso EM, Reis C, Manzanares-Céspedes MC. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgrad Med*. 2018 Jan;130(1):98-104
2. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal*. 2020 May 28;2020:2146160.
3. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, Madianos P, Louropoulou A, Machtei E, Donos N, Greenwell H, Van Winkelhoff AJ, Eren Kuru B, Arweiler N, Teughels W, Aimetti M, Molina A, Montero E, Graziani F. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 16, S71-6
4. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53,28-44.
5. Papapanou PN, Susin C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1),45-51.
6. Graves D (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol 79(8 Suppl):1585S-1591S*.
7. Liu YC, Lerner UH, Teng YT (2010). Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000 52:163-206*.
8. Garlet GP. Papéis destrutivos e protetores das citocinas na periodontite: uma reavaliação dos pontos de vista da defesa do hospedeiro e da destruição do tecido. *J Dent Res*. 2010 dez;89(12):1349-63. doi: 10.1177/0022034510376402. Epub 2010 25 de agosto. PMID: 20739705.
9. Leibbrandt A, Penninger JM (2008). RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci 1143:123-150*.
10. Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol 31:671-679*.
11. Cochran DL (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol 79(8 Suppl):1569S-1576S*.



12. Sha AM, Garib BT. Antibacterial Effect of Curcumin against Clinically Isolated Porphyromonas gingivalis and Connective Tissue Reactions to Curcumin Gel in the Subcutaneous Tissue of Rats. Biomed Res Int. 2019 Sep 30;2019:6810936.
13. Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti- plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2015 Apr;42 Suppl 16, S106-38.
14. Schmuch J, Beckert S, Brandt S, Löhr G, Hermann F, Schmidt TJ, Beikler T, Hensel A. Extract from Rumex acetosa L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial in vitro adhesion and of gingipains of Porphyromonas gingivalis by epicatechin-3-O- (4 $\beta$ →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). PLoS One. 2015 Mar;10(3), e0120130.
15. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. J Immunol Methods. 2013 Aug 30;394(1-2):49-54.
16. Fenner R, Betti AH, Mentz, AM, Rates MK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifungica. Rev Bras Cienc Farm. 2006 July/Sept; 42(3),269-394.
17. Blainski A, Lopes GC, Mello JC. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L. Molecules. 2013 Jun;18(6),6852-65.
18. Caleare AO, Hensel A, Mello JC, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from Limonium brasiliense inhibit the adhesion of Porphyromonas gingivalis to epithelial host cells by interaction with gingipains. Fitoterapia. 2017 Apr;118, 87-93.
19. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. J Periodontal Res. 2004Jun;39(3),188-93.
20. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami BomfimSR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho J.E. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. J Endod. 2014 Aug;40(8),1139-44.
21. Botelho MA, Rao VS, Carvalho CB, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC, Vale ML, Montenegro D, Cunha F, Ribeiro RA, Brito GA. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J Ethnopharmacol. 2007 Sep;113(3),471-8.
22. Navia JM. Animal Models in Dental Research. Birmingham, AL: University of Alabama Press; 1977.
23. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in Man and Other Animals. A Comparative Review. Basel: Karger; 1982.
24. Listgarten MA. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. / Periodontol 1975 ; 46:677-680.
25. Nossek H, Wendt A. Vergleichende Untersuchungen des marginalen Periodonts von Wistar-Ratte und Syrischem Goldhamster. Versuchstierk 1985; 27:149-754.
26. Belting CM, Schour I, Weinmann JP, Shepro MJ: Age changes in the periodontal tissues of the rat molar. / Dent Res 1953; 32:332-353.
27. Suzumura Y, Kameyama Y, Mizutani M, Kato M, Kondo K, Ma-buchi R. Long junctional epithelium produced by application of bacterial protease in rats. J Periodont Res 1989; 24:217-221.
28. Lekic , Klausen , Friis-Hasché E, Beloica D, Knezevic M, Hougen HP. Influence of age and immunization on development of gingivitis in rats. Acta Odontol Scand 1989; 47:233-238.
29. Guggenheim B, Schroeder HE. Reactions in the periodontium to continuous antigenic stimulation in sensitized gnotobiotic rats. Infect Immun 1974; 10:565-577.
30. Irving JT, Socransky SS, Heeley JD. Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. /Periodont Res 191A; 9:73-80.
31. Irving JT, Socransky SS, Tanner ACR. Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with Gram-negative organisms. J Periodont Res 1978; 13:326-332.
32. Amaral GSA, Ação do gel de Limonium brasiliense no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2020.
33. Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P (2006). Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. J Bone Miner Res 21:193-206.

**Palavras-chave:** doença periodontal; citocinas; fitoterapia.



## PRODUÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA SORODIAGNÓSTICO DA DENGUE

**Rafaela Daleffe Pepino<sup>1</sup>; Ana Julia Soldera Barradas; Amauri Donadon Leal Junior; Érika Seki Kioshima<sup>2</sup>**

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

<sup>2</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: rafaeladaleffe@outlook.com

### 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo a espécie *Aedes aegypti* a mais prevalente no Brasil (1). Possui um alto impacto na saúde pública do Brasil e de outros países tropicais e subtropicais pela sua capacidade de causar significativa morbidade e mortalidade (2). O vírus da dengue (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, é um vírus envelopado cujo genoma é constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva (+ssRNA) de 11 kilobases (kb), envolvido por um nucleocapsídeo e uma única região de leitura denominada ORF, com aproximadamente 10.700 nucleotídeos, os quais codificam uma poliproteína para constituir novas partículas virais (2). A poliproteína viral quando clivada, apresenta tamanho médio de 50 nanômetros de diâmetro, gera três poliproteínas estruturais: capsídeo (C), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E) (1). Além das proteínas estruturais, também geram sete proteínas não estruturais: NS1, NS2BA, NS2BM, NS3, NS4B e NS5. Sendo todas importantes para o processo de replicação viral (1). O vírus DENV apresenta características antigênicas distintas que o diferem em quatro sorotipos antigenicamente diferentes (DENV1-4) (4).

As infecções pelo DENV podem se apresentar sob as formas assintomáticas e sintomáticas, a qual pode se manifestar de duas formas clínicas: febre clássica da dengue (FD) e febre hemorrágica da dengue (FHD), com ou sem síndrome do choque da dengue (SCD), podendo evoluir para óbito. Todavia, até o momento não existe uma vacina eficaz disponível, nem tratamentos específicos para controle da doença (3-5). Em todo o mundo ocorrem entre 50 e 100 milhões de infecções a cada ano, com aproximadamente 500.000 casos graves (6). No Brasil, o Ministério da Saúde informou que, até a semana epidemiológica SE 24 (18/06/2022), ocorreram 1.172.882 casos prováveis de dengue com uma taxa de incidência de 549,8 casos por 100 mil habitantes. Para o ano de 2022, a Região Sul apresentou a maior taxa de incidência de dengue, com 20,44 casos por 100 mil habitantes, sendo possível observar que, de 2019 a 2022 foi observada a predominância do sorotipo 1 e 2 (DENV1-2), portando, até julho de 2022, 69,6% das amostras positivas eram DENV-1 (7).

Visto que os sintomas da Dengue são similares com outras doenças febris, a disponibilidade de testes de diagnósticos específicos é extremamente importante para a confirmação da doença e deveria ser uma das prioridades na saúde pública. Durante os cinco dias da infecção em que o vírus circula no sangue (viremia), seu RNA é pesquisado em amostras de sangue. O padrão-ouro neste período é o PCR quantitativo por transcriptase reversa (q-RT-PCR) (8). Na ausência da viremia, os diagnósticos laboratoriais podem ser usados para detectar proteínas virais (NS1) e imunoglobulinas específicas (IgG e IgM) em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (9,10). Entretanto, a técnica de PCR necessita de profissionais capacitados, dificultando a aplicabilidade deste teste em regiões de baixa renda (11), e o ELISA não possui especificidade por não haver anticorpos específicos e causar uma reação cruzada com outros arbovírus como Zika e Chikungunya (12). Atualmente, não existe no mercado um kit sorológico adequado para realidade brasileira com especificidade. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de kits de diagnósticos sorológicos com especificidade, rapidez de análise, baixo custo e fácil execução.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a validade dos diferentes métodos laboratoriais no diagnóstico da dengue, analisar sequências de aminoácidos da poliproteína dos quatro sorotipos do dengue (DENV1-4)

para identificação de epítomos mais específicos, baseados nas proteínas de envelope (E) e de membrana (M), com potencial de diferenciação entre os sorotipos específicos e demais arbovírus (13). Desta forma, o presente trabalho utilizou ferramentas biotecnológicas, para o desenho de quimeras dos diferentes sorotipos do dengue, com foco no desenvolvimento de um kit diagnóstico sorológico com alta especificidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cepas e reagentes.

As linhagens *Escherichia coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) *plysE* foram comercialmente adquiridas da Novagen e os genes das quimeras foram sintetizados e clonados no vetor de expressão da série pET21a pela GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil), os códons foram otimizados para *Escherichia coli*.

### 2.2. Expressão heteróloga das quimeras.

As células competentes foram preparadas de acordo com Sambrook & Russel, 2001 (14) e os plasmídeos foram utilizados para transformar as células competentes *E. coli* BL21 (DE3), por choque térmico com CaCl<sub>2</sub>, que foram selecionadas em placas de ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Uma colônia das placas contendo células transformadas de cada gene quimérico foi incubada a 37 °C, sob agitação (220 rpm), *overnight*, em 10 mL de LB (1% de caseína peptona, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de cloreto de sódio, pH=7,2) contendo 100 µg/mL ampicilina. Cerca de 5% deste pré-inóculo foi transferido para 250 mL LB e TB (Terrific Broth, peptona de caseína 1,2%, extrato de levedura 2,4%, glicerol 0,4%, água destilada q.s.p), em frasco de 1000 mL. A cultura foi cultivada nas mesmas condições acima, até uma OD<sub>600</sub> entre 0,4 à 0,6, quando foi adicionado 1mM de IPTG (isopropil β-D-1-iogalactopiranosídeo). As células foram coletadas por centrifugação a 11000 xg durante 20min a 4 °C e o pellet das células foi armazenada a -80 °C.

### 2.3. Purificação das quimeras recombinantes.

O *pellet* congelado em -80 °C foi ressuspenso em 8 mL de tampão de lise (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) e o sistema foi sonicado (10 pulsos de 10 segundos com intervalos de 59 segundos) usando Vibra Cell sonicator (Sonics & Materials, Inc.) e centrifugado a 11000xg por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi adicionado a 2 mL de resina Ni-Sepharose 6 Fast Flow (Sigma-Aldrich) e incubado à temperatura ambiente durante 90 min em rotação. Após a incubação, a resina foi lavada três vezes com 4 mL de tampão de lavagem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol) e a proteína foi eluída em 6 frações usando 1 mL de tampão de lavagem (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol).

### 2.4. Eletroforese em gel.

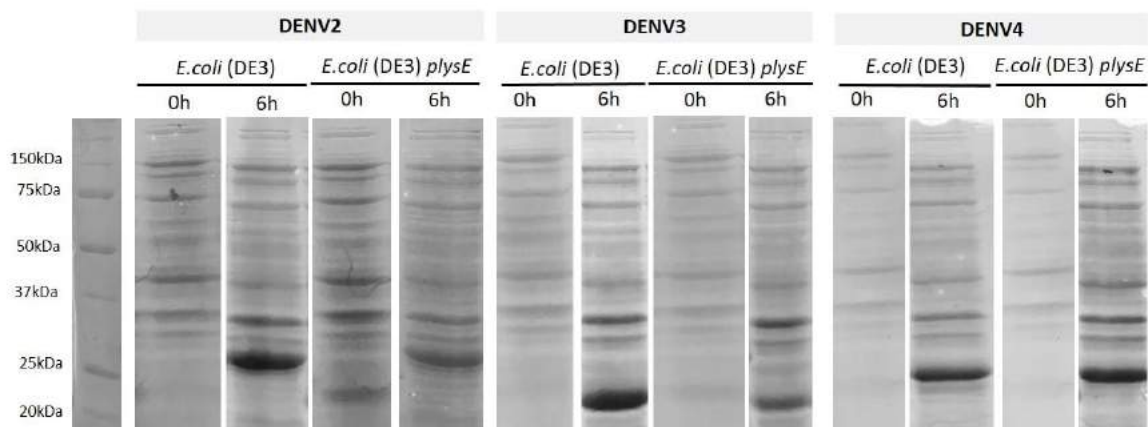
As amostras foram submetidas a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (12%) com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). As amostras foram diluídas em 50 µL de tampão de 2X amostras (Tris-HCl 1M pH=6,8; SDS 10% (v/v); β-mercaptoetanol 4% (v/v); Glicerol 20% (p/v); Azul de bromofenol 0,1% (p/v) e aquecido a 100° C por 5 minutos e aplicado no gel. A corrida eletroforética foi feita a 110 volts e no final da corrida o gel foi corado com Coomassie blue.

### 2.5 In-house Enzimoimunoensaio (ELISA).

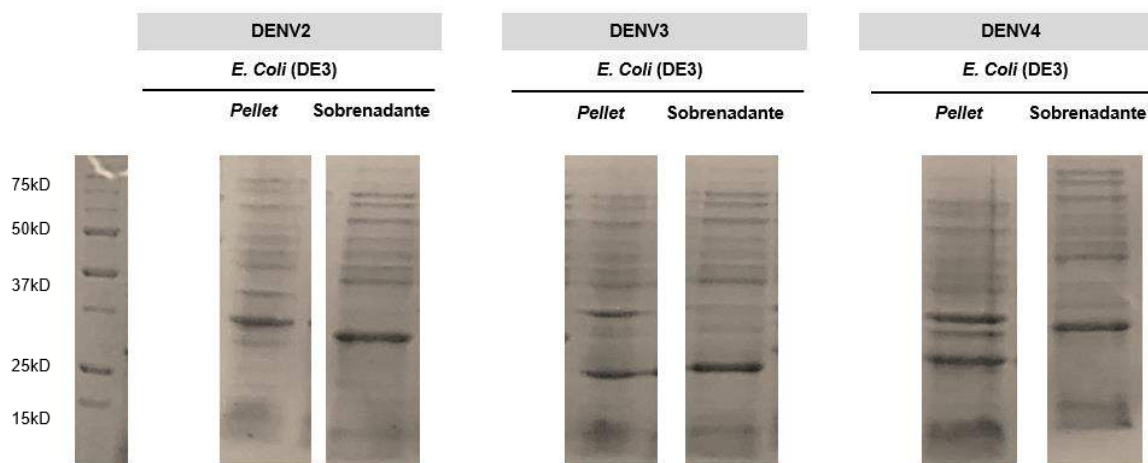
As placas de poliestireno foram sensibilizadas com 50 µg de quimera recombinantes purificada, dissolvidas em PBS e incubadas por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados com 200 µL PBST-G (PBS complementado com 0,2% Tween 20 e gelatina), bloqueados por 1 hora a 37 °C com PBS contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado e lavados novamente com 200 µL PBST-G. Após a lavagem, 50 µL de amostras de soro de pacientes convalescentes de Dengue, Chikungunya (CHIKV), zika (ZIKV) e pacientes negativos para dengue (NEG) diluídas em PBS contendo 5% (p/v) de leite desnatado em pó foram colocadas nos poços, resultando em uma diluição final de 1/50. A placa foi então incubada por 2 horas a 37 °C e lavada com 200 µL de PBST-G antes da adição de 50 µL de conjugado de imunoglobulina de cabra anti IgG-humana peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído a 1:4000 em PBS contendo 5% (p/v) de leite desnatado em pó e incubação por 1 hora a 37 °C. Após a incubação com conjugado, os poços foram lavados novamente com 200 µL de PBST-G e adicionados 50 µL de tampão OPD e as densidades ópticas foram lidas a 492 nm.

## 3. RESULTADOS

A expressão heteróloga em diferentes meios de cultura e em diferentes temperaturas foi suficiente para encontrar a melhor condição para a produção recombinante. As condições mais eficientes para a produção das proteínas quiméricas foram o cultivo da cepa BL21 (λDE3) de *E. coli* em meio LB a 37 °C durante 6h (DENV4) e 18h (DENV2 e DENV3). Os antígenos foram então purificados usando uma coluna Ni-NTA e identificados usando SDS-PAGE. Para analisar a expressão das quimeras no tempo 0 e 6 horas realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Como mostrado na Figura 1, foram observadas bandas proteicas com massa molecular de ~ 25 kDa, ~ 20kDa e ~ 22kDa para o antígeno de DENV2, DENV3 e DENV4, respectivamente. Este resultado foi observado na indução em meio LB e também no meio TB.

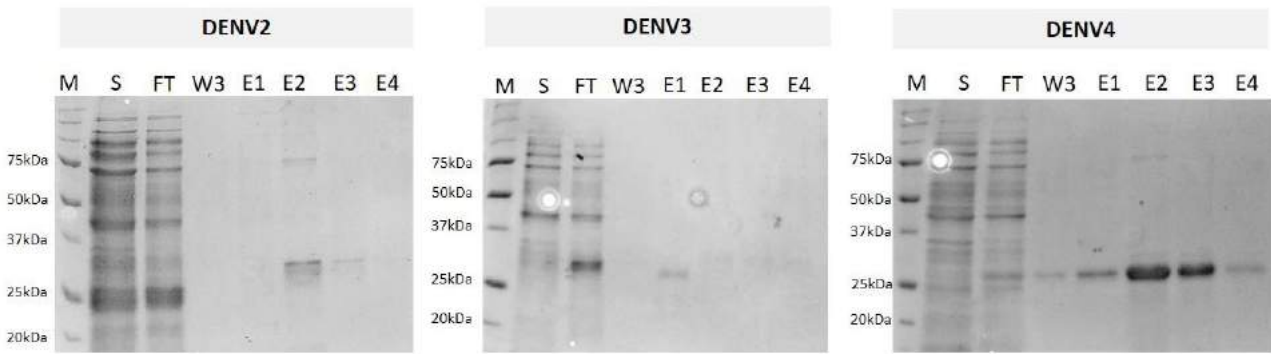


**Figura 1. Análise por SDS-PAGE da indução em pequena escala no tempo 6 horas da expressão da proteína DENV2, DENV3 e DENV4.** Clone 1, realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) *plysE* a 37 °C a 220 rpm, induzida com 1 mM de IPTG, corado com Coomassie Brilliant Blue. M- Marcador de massa molecular (Biorad).



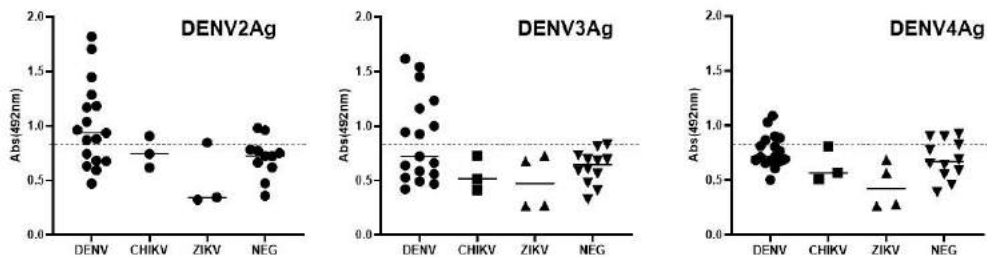
**Figura 2. Análise por SDS-PAGE do pellet e sobrenadante da indução em pequena escala no tempo 6 horas da expressão da proteína DENV2, DENV3 e DENV4.** Clone 1, realizada em células de *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) *plysE* a 37° C a 220 rpm, induzida com 1 mM de IPTG, corado com Coomassie Brilliant Blue. M- Marcador de massa molecular (Biorad).

Conforme é mostrado no gel SDS-PAGE da Figura 2, é possível observar uma banda proteica próxima a 25 kDa, identificando as proteínas DENV2, DENV3 e DENV4 em *E. Coli* BL21 DE3. A expressão pode ser atribuída ao aumento gradual no tamanho das bandas proteicas de acordo com os tempos de indução, apresentando produção na forma solúvel (sobrenadante) e em corpos de inclusão (*pellet*). Apesar de encontrarmos quantidade significantes das quimeras na fração solúvel, apenas a quimera DENV4Ag foi purificada na forma solúvel. As quimeras DENV2Ag e DENV3Ag foram purificadas em meio desnaturante contendo uréia (8M). No entanto, como é possível observar nas análises em SDS-PAGE da purificação destas quimeras, a proteína do DENV4 foi obtida com sucesso, já para DENV2 e DENV3 as bandas ficaram coeluídas, necessitando a utilização de novas tecnologias para o seu sucesso (Figura 3).



**Figura 3. Análise em SDS-PAGE da purificação das quimeras de DENV2Ag, DENV3Ag e DENV4Ag.** As lavagens foram realizadas a 30 mM de imidazol e eluições a 500 mM de imidazol. Para o DENV4Ag a purificação foi realizada na condição nativa e para DENV2 e DENV3 na condição desnaturante. M: marcador de peso molecular (Biorad); S: Sobrenadante; FT: Flow Through; W3: lavagem 3; E1 a E4 – eluições.

Ainda que preliminar os dados obtidos no ensaio de ELISA sugerem que pode haver uma especificidade dos antígenos quimeros entre os arbovírus, uma vez que os maiores valores de absorvância foram detectados na combinação soro de pacientes positivos para DENV e os dois antígenos de DENV2Ag e DENV3Ag (Figura 4). Considerando que o sorotipo DENV2 é o mais soroprevalente na região do Paraná é possível que o nosso kit seja capaz de detectar preferencialmente este sorotipo. Ainda se faz necessário mais padronizações para que de fato a especificidade e a sensibilidade do teste, como diagnóstico das infecções por DENV esteja a contento do esperado. No entanto, os resultados preliminares são animadores e podem sinalizar para o desenvolvimento de um novo kit de diagnóstico da dengue.



**Figura 4. IgG ELISA com as diferentes quimeras (DENV2Ag, DENV3Ag e DENV4Ag) avaliado com soro de paciente com resultado prévio positivo para dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), zika (ZIKV) e pacientes negativos para dengue (NEG).**

#### 4. DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial do DENV tem sido um grande desafio principalmente devido à sua co-circulação com outros vírus intimamente relacionados e ao fato de compartilhar o mesmo vetor e apresentar sintomas clínicos semelhantes a outros arbovírus (3). As principais ferramentas laboratoriais padrão utilizadas atualmente para o diagnóstico desta arbovirose baseiam-se na detecção de RNA viral ou anticorpos em testes serológicos (5). O diagnóstico laboratorial da dengue desempenha um papel fundamental no manejo clínica da doença. O isolamento viral também é uma alternativa para o diagnóstico, mas é um processo trabalhoso e requer uma infra-estrutura que pode não estar disponível na maioria dos laboratórios (7).

A detecção de RNA viral em doenças agudas é limitada devido ao fato de que quase 80% dos casos são assintomáticos e testes sorológicos reagem cruzadamente com outros flavivírus, além do fato de que a infecção atual ou passada com outros flavivírus ou mesmo a vacinação pode causar resultados falsos positivos (15). A maior parte da reatividade cruzada das respostas de anticorpos depende da semelhança genética e homologia estrutural do DENV com outros flavivírus que compartilha em toda a seqüência genômica 55,6% da identidade de aminoácidos com ZIKV (16). Além disso, sabe-se que a proteína do envelope é o principal alvo da neutralização de anticorpos em infecções por flavivírus devido ao seu papel na entrada de vírus nas células (17).

Dentre os testes sorológicos, o ELISA se tornou uma ferramenta importante para o diagnóstico de

rotina da dengue, sendo um teste sorológico amplamente utilizado para detecção de anticorpos IgM e IgG (18). Desta forma, inserido em um contexto no qual a Dengue possui quadros clínicos semelhantes aos de outras doenças virais e que formas graves podem apresentar rápida progressão, é importante o desenvolvimento de um diagnóstico sorológico diferencial para o rápido e correto diagnóstico do paciente, reduzindo especialmente as reações cruzadas entre as arboviroses. Para isso, ferramentas biotecnológicas podem auxiliar neste desenvolvimento de kit mais específicos e direcionados. Estes antígenos recombinantes tem contribuído com o desenvolvimento de testes imunocromatográficos, os quais são amplamente utilizados pela sua rapidez e simplicidade.

A produção de uma vacina segura e eficaz contra o vírus da dengue enfrenta grandes obstáculos atualmente, principalmente na dificuldade em compreender o complexo conjunto de interações de antígenos do vírus da dengue em hospedeiros humanos. A sua eficácia é comprometida porque a vacina não pode ser capaz de oferecer proteção para os quatro sorotipos. Por isso, faz-se necessário o aprofundamento nos estudos sobre as ferramentas utilizadas para o seu diagnóstico através da detecção de anticorpos séricos específicos, do isolamento do vírus a partir do material biológico, detecção do vírus por RNA viral ou antígenos virais. Pode-se observar que a partir deste estudo, houve êxito na expressão das proteínas com 1 mM de IPTG do DENV4Ag, comparado com DENV2Ag, DENV3Ag e DENV4Ag. Não houve grande influência do tempo de indução (4h e overnight) nos níveis de expressão encontrados.

Assim, regiões específicas dos diferentes sorotipos do vírus da Dengue, das proteínas do envelope (E) e da membrana (M) foram selecionadas para o desenvolvimento de antígenos quimérico e possivelmente específicos para os sorotipos 2,3 e 4 do vírus da dengue. Quantidades satisfatória da proteína quimérica foi obtida da fração solúvel do lisado bacteriano, fato este que facilitou a purificação deste antígeno. Por outro lado, os antígenos DENV2 e DENV3, foram expressos na forma de corpo de inclusão e ainda necessitam de mais padronizações para obtê-las na forma solúvel. Apesar das limitações, os testes sorológicos preliminares foram realizados com os antígenos DENV2, DENV3 e DENV4, com resultados promissores. Considerando que o desenho de epitopos levou em consideração epitopos lineares a utilização dos antígenos DENV2Ag e DENV3Ag na forma desnaturada não impediu o reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro dos pacientes. Destaca-se que as maiores marcações foram detectadas com o DENV2Ag, considerando que este é o sorotipo circulante no Brasil, é possível supor que a abordagem biotecnológica empregada buscando a capacidade de diferenciar sorotipos pode ter sido realizada com sucesso. No entanto, deve-se considerar que este é um método *in-house* e ainda demandará várias padronizações até a sua chegada ao mercado de kits de diagnóstico.

## 5. CONCLUSÃO

Por meio de ferramentas biotecnológicas foi possível identificar, rastrear e analisar os epitopos dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV2-4). A partir deste trabalho, foi possível identificar as melhores condições de temperatura e meio de cultura para a expressão e purificação das quimeras para DENV4Ag. Para os demais sorotipos, necessitam de estudos para uma melhor expressão. Desta forma, foi possível a obtenção das proteínas recombinantes quiméricas e iniciar as validações para determinar a especificidade destes antígenos biotecnologicamente engenheiros. Assim, os resultados preliminares apresentados sugerem que o racional do desenvolvimento de um kit de diagnóstico da dengue, baseado na especificidade de cada sorotipo, pode ser possível. Desta forma, espera-se contribuir com um novo diagnóstico sorológico para esta arbovirose.

## FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Érika pelo auxílio durante este projeto e aos colaboradores do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Wang, W. H., Urbina, A. N., Chang, M. R., et al., (2020). Dengue hemorrhagic fever—a systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(6), 963-978.

2. Andries, A. C., Duong, V., Ong, S., et al., (2016). Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens. *BMC infectious diseases*, 16(1), 1-9.
3. Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution*, 3(1), 19-28.
4. Lindenbach, B. D. (2007). The viruses and their replication. *Fields virology*, 1101-52.
5. Reyes-Sandoval, A., & Ludert, J. E. (2019). The dual role of the antibody response against the flavivirus non-structural protein 1 (NS1) in protection and immuno-pathogenesis. *Frontiers in immunology*, 10, 1651.
6. World Health Organization. Dengue : guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. [Internet]. 2009. [acesso em 24 Mai 2022] ; disponível em : <https://bit.ly/3EcMTEg>.
7. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Informe Epidemiológico. 2022. [ Acesso em 25 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no24/view>.
8. Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. (2016). Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. *Journal of clinical microbiology*, 54(4), 860-867.
9. México SdS. Lineamientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio. 2015.
10. México SdS. Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de Dengue por laboratorio. 2015.
11. Shukla, S., Hong, S. Y., Chung, S. H., & Kim, M. (2016). Rapid detection strategies for the global threat of Zika virus: current state, new hypotheses, and limitations. *Frontiers in microbiology*, 7, 1685.
12. Estofolete, C. F., Terzian, A. C. B., Parreira, R. et al., (2016). Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: a case series. *Journal of Clinical Virology*, 81, 25-30.
13. Junior, Amauri. Diagnóstico sorológico diferencial de Dengue, Zika e Chikungunya: análises in sílico e revisão sistemática. Orientador: Érika Seki Kioshima Cotica. 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá) – Mestrado, Maringá, 2022.
14. Russell, D.W; Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
15. Landry M. et al. Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *Journal of Comparative Neurology*, v. 468, n. 3, p. 380-394, 2004.
16. Shubham et al. Co-circulation of all the four dengue virus serotypes and detection of a novel clade of DENV-4 (genotype I) virus in Pune, India during 2016 season. v. 13, n. 2, 2018.
17. Koblischke, Maximilian et al. Structural influence on the dominance of virus-specific CD4 T cell epitopes in Zika virus infection. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1196, 2018.
18. Kao, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: Current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

**Palavras-chave:**; proteína recombinante; biotecnologia; dengue.



## ATIVIDADE DA ERITROSINA B EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE CÂNCER CERVICAL ATRAVÉS DA TERAPIA FOTODINÂMICA

**Marcos Elias da Silva Almeida<sup>1</sup>; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles<sup>2</sup>; Lucimara Rodrigues Carobeli<sup>2</sup>; Cristiane Suemi Shinobu-Mesquita<sup>3</sup>; Jéssica Bassi da Silva<sup>4</sup>; Marcos Luciano Bruschi<sup>4</sup>; Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>3,5</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>3,5</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 Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>3</sup>Docente no departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>4</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>5</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Laboratório de Citologia Clínica e ISTs, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

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

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer cervical (CC) é o quarto tipo mais incidente assim como o quarto maior causador de morte por câncer em mulheres, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, liderando o número de óbitos pela doença em 41 países (1). Segundo estimativa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio de 2020-2022, foram estimados 16.590 novos casos deste câncer no Brasil, sendo o terceiro mais diagnosticado na população feminina do país (2).

O principal fator para o desenvolvimento do CC é a infecção persistente pelo papilomavirus humano (HPV) de alto risco oncogênico, sendo os tipos 16 e 18 responsáveis por aproximadamente 70% dos casos (3, 4). A maioria das infecções pelo HPV é transitória e eliminada pelo sistema imune do hospedeiro. Porém, pode persistir e levar a mutações somáticas que poderão resultar no aparecimento de alterações celulares precursoras, denominadas lesões intraepiteliais escamosas cervicais (SIL) que, por sua vez, podem evoluir para o carcinoma invasor, caso não regridam espontaneamente ou não sejam detectadas e tratadas precocemente (5).

Após o estabelecimento do CC, os tratamentos preconizados consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ou a combinação entre eles, dependendo do estágio clínico da doença. Porém, as terapias atuais ainda apresentam muitos efeitos colaterais, bem como grande taxa de resistência e possibilidade de recidiva elevada, sendo de extrema importância a busca de novas opções terapêuticas (6, 7).

Neste sentido, novas estratégias para o tratamento vêm ganhando espaço ao longo dos anos, tal como a terapia fotodinâmica (TFD). Esta modalidade terapêutica se caracteriza pela excitação de um agente fotossensibilizante (FS) através da exposição a uma fonte de luz específica. Este processo desencadeia duas vias de ação, onde a tipo 1 consiste na interação direta do FS excitado com moléculas e membranas, e o tipo 2 que consiste da formação de espécies reativas de oxigênio, em especial o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o qual iniciará lesões e desencadeará vias de morte dependendo de sua localização intracelular (8).

Dentre os FS, a eritrosina B (ErB) é um corante sintético derivado da fluoresceína, pertencente à classe dos xantenos, e aprovado para uso como corante alimentício gerando tonalidades vermelhas. Sua utilização como FS tem sido explorada em procedimentos odontológicos para tratamento de biofilmes, e



também, poucos estudos tem investigado sua ação em linhagens tumorais, com resultados favoráveis (9, 10). Dentre suas propriedades, destaca-se a alta formação de oxigênio singlete, baixa toxicidade, baixa regulação genica e alta faixa de absorção de luz (500-540 nm) (11).

A ErB possui propriedade hidrofílica dominante, diante disso, a incorporação desse FS em um sistema polimérico micelar se torna uma alternativa para o aumento do contato e permeabilização das células, melhorando a ação na TFD. Neste sentido, o Poloxamer 407 associado à hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) constitui um sistema polimérico mucoadesivo nanoestruturado que em baixas temperaturas possui uma fase líquida e quando aquecido à temperatura corporal, possui transição para uma fase gel, aumentando o contato do FS à membrana celular, facilitando sua entrega (12).

Buscando elucidar novas formas de tratamento para o CC, o objetivo deste estudo foi analisar a atividade da ErB, como agente FS na TFD, incorporada ou não a formulações contendo Poloxamer 407/HPMC, frente à linhagem celular derivada de CC, HeLa.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Fotossensibilizador e Iluminação**

Os sistemas poliméricos mucoadesivos termorresponsivos nanoestruturados compostos por 17,5% de polaxamer 407 e 4% de HPMC, contendo 0,1% (formulação 0,1%) ou 1% (formulação 1%) de ErB, bem como a ErB pura, usados nos experimentos, foram fornecidos pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos - LABSLiF, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá. O sistema polimérico sem incorporação da ErB foi testado como controle do nanocarreador (Poloxamer 407+HPMC). Foi utilizada uma fonte emissora de luz adequada de comprimento de onda na faixa de 500-550 nm. Para evitar interferências, os experimentos de irradiação foram realizados na ausência de outras fontes de luz.

### **2.2. Condições de cultura**

Foi utilizada a linhagem celular derivada de CC HeLa (HPV 18 positiva). As células foram cultivadas em frascos com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,5 U/ml de penicilina/estreptomicina, em condições de atmosfera controlada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **2.3. Internalização Celular**

Em uma placa de 24 poços, foram adicionados  $1,5 \times 10^5$  células por poço, e então tratadas com ErB pura, formulação contendo 0,1% ou 1% de ErB na concentração de 10 µg/ml. As células foram incubadas em estufa pelo período de 30 minutos e então realizada a leitura em microscópio invertido EVOS com filtro RFP (vermelho) (EVOS® FL, Life Technologies, EUA). Os tempos de leitura foram 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas e 24 horas. As imagens foram processadas utilizando o software de imagem ImageJ (Software de uso livre, NIH, EUA). A fluorescência obtida nas imagens é originada da própria ErB quando exposta ao filtro de leitura do microscópio.

### **2.4. Citotoxicidade e Fototoxicidade**

A linhagem celular foi semeada em placa de 24 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células por poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas pelo período de 4 horas, com ErB pura, formulação contendo 0,1% ou 1% de ErB, nas concentrações de 0,31 a 5 µg de ErB por ml. As formulações foram diluídas antes de cada experimento, em DMEM não suplementado. Células tratadas com a formulação sem incorporação da ErB (veículo) foram utilizadas como controle do nanocarreador e células tratadas apenas com DMEM não suplementado foram usados como controle celular (controle).

Para o teste de citotoxicidade, após o tratamento, as células foram retiradas da placa e a viabilidade determinada através do teste de exclusão vital por azul de tripan. Este teste baseia-se na capacidade das células vivas expulsarem o corante de seu interior, enquanto as células mortas o retém, sendo possível a diferenciação através de microscópio óptico convencional. Assim, as células coletadas foram centrifugadas e ressuspensas em solução de azul de tripan (diluição de 0,04%) em proporção v/v com meio DMEM não suplementado, e então contadas em hemocitômetro.

No teste de fototoxicidade, após o tratamento, as placas foram expostas a fonte de luz verde (500-550 nm) pelo período de 15 minutos, e após, realizado o teste de exclusão vital com azul de tripan. A viabilidade foi obtida através da proporção entre o número de células vivas de cada poço e o número de células vivas do controle celular.

Ensaio de fototoxicidade da ErB pura e formulação contendo 1% de ErB (concentração de 0,01 a 10 µg de ErB por ml) foram utilizados para determinar as concentrações que demonstram a inibição celular de 30, 50 e 90%, quando comparado ao controle negativo, IC<sub>30</sub>, IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>, respectivamente.

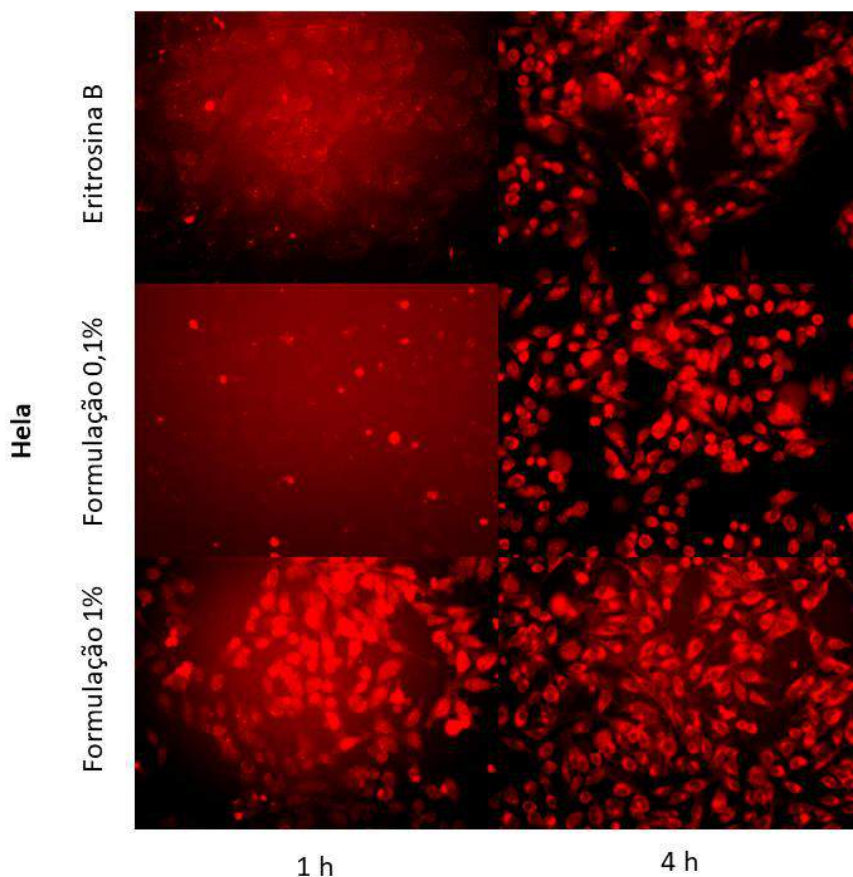
### **2.5. Análises Estatísticas**

Os experimentos de citotoxicidade e fototoxicidade foram realizados em triplicatas e seus resultados expressos em média ± desvio padrão. Os dados dos experimentos de viabilidade celular foram avaliados

pelo teste t-Student através do software GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3. RESULTADOS

A visualização da internalização celular da ErB foi realizada através da iluminação desta pelo filtro de emissão de luz RFP do microscópio invertido EVOS. A partir deste teste, foi observado um período inicial de internalização a partir de 1 hora de incubação, atingindo um pico em 4 horas, conforme apresentado na Figura 1. Tempos superiores a 4 horas não apresentaram alteração visível na fluorescência.



**Figura 1. Internalização celular da Eritrosina B incorporada ou não a formulações contendo Poloxamer 407/HPMC, em células derivadas de CC, HeLa, nos tempos 1h e 4h.**

A formulação contendo 1% de ErB apresentou maior intensidade de fluorescência do que a formulação contendo 0,1%, bem como a ErB pura, desde o menor tempo, assim como uma maior definição do aspecto celular em todos os tempos. No tempo de 4 horas foi possível observar maior internalização da ErB nas células e por isso foi padronizado como o tempo ideal de incubação para a realização dos testes de citotoxicidade e fototoxicidade.

O teste de citotoxicidade (não exposta a luz), não mostrou morte celular estatisticamente significativa para a ErB pura, ou para as formulações em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 2A).

Quando expostas a fonte de luz, no teste de fototoxicidade, houve diminuição da viabilidade celular proporcional ao aumento da dose testada, para a ErB pura e para a formulação contendo 1% de ErB. No entanto, a formulação 1%, apresentou maior redução da viabilidade celular quando comparada a ErB pura, em especial nas menores concentrações analisadas, onde houve diferença significativa nas concentrações de 0,31  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,0001$ ) e 0,63  $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,005$ ) (Figura 2B).

A formulação contendo 0,1% de ErB, por sua vez, apresentou maior redução da viabilidade celular quando comparada a ErB pura apenas na menor dose testada, e manteve a taxa de morte estável conforme aumento das doses. Por fim, o tratamento com o veículo não mostrou alteração na viabilidade celular quando comparado ao controle.

Os valores de ICs da ErB pura e formulação contendo 1% de ErB para a linhagem celular HeLa estão descritos na tabela 1.

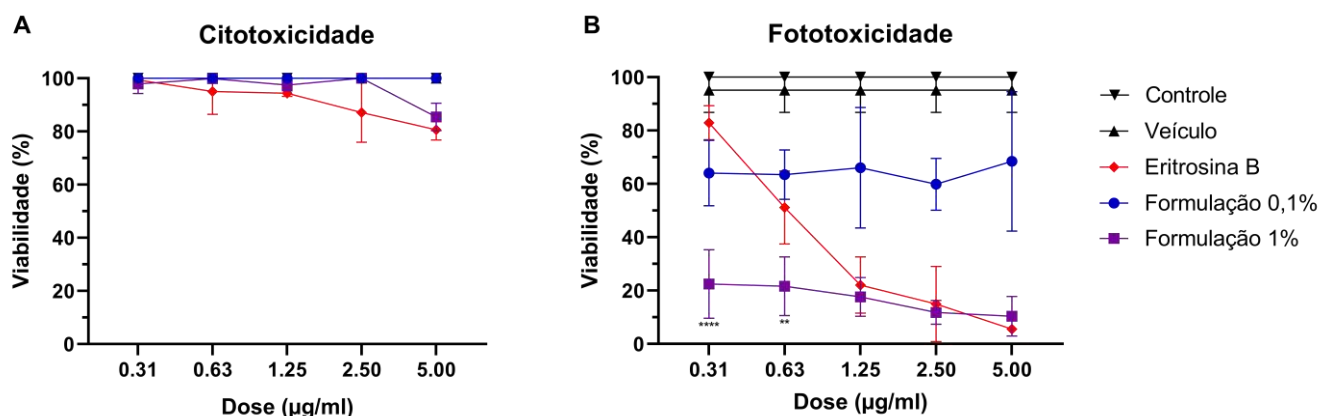


Figura 2. Citotoxicidade (A) e fototoxicidade (B) da Eritrosina B incorporada ou não a formulações contendo Poloxamer 407/HPMC, em células derivadas de CC, HeLa. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*  $p = 0,005$ .

Tabela 1. Valores de  $IC_{30}$ ,  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  para a Eritrosina B pura e formulação contendo 1% de Eritrosina B a partir dos testes de fototoxicidade.

HeLa			
	$IC_{30}$	$IC_{50}$	$IC_{90}$
<b>Eritrosina b</b>	0.271 µg/ml	0.452 µg/ml	0.813 µg/ml
<b>Formulação 1%</b>	0.178 µg/ml	0.297 µg/ml	0.534 µg/ml

$IC_{30}$ ,  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$ : Concentrações que inibem respectivamente 30%, 50% e 90% da viabilidade celular quando comparado com o controle negativo.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível observar internalização da ErB pura ou incorporada em duas formulações diferentes (concentração de 0,1% ou 1%) em um sistema polimérico mucoadesivo e termorresponsivo composto por polaxamer 407 e HPMC, bem como atividade fototóxica para este FS frente à linhagem tumoral de CC, HeLa, com melhores resultados para a formulação contendo 1% de ErB.

A internalização do FS é um fator importante para que haja a efetiva eliminação das células, dependendo da localização em que este se encontra, ativando as vias de morte como apoptose, necrose e autofagia (13). Sendo assim, as células foram submetidas ao tratamento e analisadas em microscópio invertido EVOS com filtro RFP ao longo do tempo, demonstrando um pico de internalização após 4 horas de tratamento e mantendo-se estável até 24 horas. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Bistaffa et al, que demonstrou internalização da ErB e atividade fototóxica em linhagem de câncer de mama, MCF-7, após 3 horas de tratamento, e esta se manteve semelhante nos demais tempos testados (24 e 48hs) (14).

No presente estudo, a ErB mostrou ser um promissor agente FS na TFD, pois apresentou atividade fototóxica atuando de forma dose-dependente na linhagem celular HeLa. Estes resultados estão de acordo com Garg et al. que mostraram que a ErB foi um eficaz agente FS na diminuição da viabilidade celular em linhagem pré-maligna (DOK) e maligna (H357) de células epiteliais orais, através da TFD (9).

No entanto, a ErB, é um corante de propriedade hidrofílica dominante, com baixa afinidade à membrana celular, de modo que a sua incorporação ao sistema polimérico mucoadesivo nanoestruturado contendo Poloxamer 407 associado ao HPMC, especialmente na formulação contendo 1% do FS, apresentou comportamento promissor, pois reduziu significativamente a viabilidade das células HeLa quando comparado ao tratamento com ErB pura.

Baseado nos resultados da fototoxicidade, foi possível concluir que a formulação contendo 1% de ErB foi mais efetiva quando comparada aquela contendo 0,1%, sendo então a de escolha para futuras investigações. Portanto, foram realizados testes também com menores concentrações desta formulação (0.01 a 10 µg de ErB por ml), a fim de avaliar com maior precisão os valores de ICs. Como resultado, foi observado que o tratamento com a formulação 1% mostrou valores de ICs bem menores do que aqueles

observados com a ErB pura.

Assim, juntos estes dados mostram que o sistema foi um efetivo nanocarreador, possivelmente por aumentar o contato e reter o composto na área de ação devido a sua propriedade de transição líquido-gel (12), e não apresentando alterações na viabilidade celular na ausência do FS.

## 5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a ErB pode ser um importante agente FS na TFD frente a células de CC, HeLa, especialmente quando incorporada ao sistema polimérico mucoadesivo nanoestruturado contendo Poloxamer 407/ HPMC, na formulação de 1%, que melhorou significativamente seu potencial fototóxico. Estudos complementares são necessários a fim de avaliar a atividade da ErB em outras linhagens tumorais de CC, bem como estudar os mecanismos de ação envolvidos, a fim de verificar o potencial desta estratégia como terapia para o CC.

## FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Citologia Clínica e ISTs (LabCito) e do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos – LABSLiF, da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-49.
2. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Gomes de Alencar. Estimativa 2020. 2019. [Acesso em 08 Ago 2022]. Disponível em <https://www.inca.gov.br/estimativa>
3. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology.* 2020; 40(5):602-8.
4. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology.* 2010; 11(11):1048-56.
5. Carvalho NS, Silva R, Val ICD, Bazzo ML, Silveira MFD. Brazilian Protocol for Sexually Transmitted Infections 2020: human papillomavirus (HPV) infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021; 54(suppl 1): e2020790.
6. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Semin Oncol Nurs.* 2019; 35(2):166-74.
7. Lorusso D, Petrelli F, Coinu A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2014; 133(1):117-23.
8. dos Santos AF, de Almeida DRQ, Terra LF, Baptista MS, Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment.* 2019; 5:25.
9. Garg AD, Bose M, Ahmed MI, Bonass WA, Wood SR. In vitro studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells. *PLoS One.* 2012; 7(4):e34475.
10. Fracalossi C, Nagata JY, Pellosi DS, Terada RS, Hioka N, Baesso ML, et al. Singlet oxygen production by combining erythrosine and halogen light for photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016; 15:127-32.
11. Bergmann EV, Capeloto OA, Catanio ATS, Flizikowski GAS, Kimura NM, Freitas CF, et al. Photoactivation of Erythrosine in simulated body fluids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2021; 259:119867.
12. da Silva JB, Cook MT, Bruschi ML. Thermoresponsive systems composed of poloxamer 407 and HPMC or NaCMC: mechanical, rheological and sol-gel transition analysis. *Carbohydrate Polymers.* 2020; 240:116268.
13. van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel).* 2017;9(2).
14. Bistaffa MJ, Kobal MB, Souza PSS, Toledo KA, Camacho SA, Aoki PHB. Photo-Induced Necrosis on Oropharyngeal Carcinoma (HEp-2) Cells Mediated by the Xanthene Erythrosine. *J Nanosci Nanotechnol.* 2020; 20(10):6180-90.

**Palavras-chave:** neoplasia do colo do útero; terapia fotodinâmica; eritrosina.



## MECHANISMS OF ACTION OF ARTEPILLIN C AGAINST BREAST CANCER CELLS

Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles<sup>1,2</sup>; Natália Lourenço Mari<sup>2</sup>; Maria Vitória Felipe de Souza<sup>2</sup>; Edilson Damke<sup>2</sup>; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke<sup>2</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>4</sup>; Denise Brentan da Silva<sup>3</sup>; Djaceli Sampaio de Oliveira Dembogurski<sup>3</sup>; Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>2,4</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>2,4</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratory of Clinical Cytology and STIs, State University of Maringá, PR

<sup>3</sup>Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LAPNEM), Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

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

e-mail: lyvia.fmeirelles@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Worldwide, breast cancer (BC) is the most frequent cancer in women, after non-melanoma skin cancer. Furthermore, BC has overtaken lung cancer as the most commonly diagnosed cancer, with an estimated 2.3 million new cases (11.7% of all cancer cases) in 2020, and a 33.8% increase in new cases is expected by 2040. This cancer is also the leading cause of cancer death in women, with an estimated 684,996 deaths in the last reported year (1) and the majority were due the metastasis with 0.5 million people worldwide dying from metastatic BC (mBC) every year, approximately (2).

Despite advances in screening, diagnosis, and treatment, nearly 12% of patients with a diagnosis of BC eventually develop metastatic disease (3). For the establishment, expansion, and metastasis of cancer, tumors must stimulate the production of their blood vessels, known as tumor angiogenesis (4). The knowledge about the mechanisms that lead to the process of tumorigenesis and metastasis is extremely important for the search for better strategies in the treatment of this cancer.

Currently, the treatment options vary according to the type of BC and the stage of the disease and can be locoregional through surgery and/or radiotherapy, or systemic, with hormone therapy, targeted therapy, immunotherapy, and chemotherapy (5,6). Besides the side effects of treatments, especially chemotherapy, also, once post-treatment if a failure occurs the prognosis becomes worse. Thus, there is an urgent need for new drugs for treating cancer (7).

Among the arsenal of existing substances, mainly derived from natural compounds, propolis is a promising chemotherapeutic agent (8,9). Present in Brazilian propolis as one of the main constituents, artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid), is a phenolic compound that has demonstrated several activities, among them anticancer (10–12).

Our preliminary results showed for the first time that artepillin C exhibited a cytotoxic effect on BC cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231), and reduced migration and invasion of these cells (13,14).

Therefore, we aimed to investigate the mechanisms of action of artepillin C in death, invasion and angiogenesis against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, which represent two different types of BC with phenotypic/genotypic differences (15).

### 2. MATERIAL AND METHODS

#### 2.1. Obtention of artepillin C

Artepillin C was extracted and purified in the laboratory of Professor Dr. Denise Brentan da Silva at the Federal University of Mato Grosso Sul and kindly donated by her.

#### 2.2. Cell lines and growth conditions

The human cancer cell lines used were: MCF-7 (BC cell line positive for estrogen and progesterone receptors) and MDA-MB-231 (BC cell line negative for estrogen, progesterone and HER2 receptors). The

cell lines were maintained in a culture flask with DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 µg/mL amphotericin B solution 0.5 U/ml at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Treatment

Artepillin C was dispersed in DMSO at a concentration of 80 mM and stored at -20°C. The cells were exposed to artepillin C diluted in DMEM at concentrations of IC<sub>50</sub> (MCF-7: 60 µM and MDA-MB-231: 90 µM) for 48h. As a negative control (NC), cells were treated with DMEM alone.

### 2.4. Analysis of cell death by necrosis with lactate dehydrogenase (LDH) assay

To observe the cell death by necrosis with lactate dehydrogenase (LDH) assay, the cells were seeded in 96-well tissue culture plates at a density of 2.5x10<sup>5</sup> cells/mL and maintained in culture in 10% FBS-DMEM in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After 24h, the cells were exposed to the IC<sub>50</sub> value of artepillin C and incubated for 48h. After the treatment, the supernatant was collected and analyzed using a Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, a colorimetric method, according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 490 nm and 680 nm using a microplate reader (Loccus, Cotia, SP, Brazil).

### 2.5. Determination of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ )

Changes in mitochondrial transmembrane potential were analyzed using the rhodamine 123 assay (Rh123). Briefly, cells (2.5x10<sup>5</sup> cells/mL) were seeded in 6-well plates and incubated for 24h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Then, they were treated with artepillin C (IC<sub>50</sub> of each cell line) for 48h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Supernatants were removed from the culture dishes, and adherent cells were detached with trypsin-EDTA. The cells were collected by centrifugation, resuspended in a staining solution with Rh123, and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 15min in the dark. After, the cells were centrifuged, washed with PBS, and centrifuged again. The supernatant was resuspended with PBS and incubated for 30min. Each sample was analyzed using flow cytometry (FACSCalibur™ - BD).

### 2.6. DNA fragmentation assay

The cells were seeded in 6-well tissue culture plates at a density of 1.5x10<sup>6</sup> cells/mL and maintained in culture in 10% FBS-DMEM in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After 24h, they were exposed to the IC<sub>50</sub> value of artepillin C and incubated for 48h. After all treatments, the cells were collected and DNA was extracted using a DNA QIAamp DNA mini kit. The extracted DNA was subjected to electrophoretic analysis in a 1.2% agarose gel to identify the DNA fragmentation.

### 2.7. Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay for MMP-2 and MMP-9

The levels of MMP-2 and MMP-9 after the treatment were quantified using an ELISA kit (Invitrogen, MA, USA). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded in 24-well tissue culture plates at a density of 2.5x10<sup>5</sup> cells/mL. The cells were allowed to attach overnight at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After 24h, the cells were exposed to IC<sub>50</sub> value of artepillin C for 48h. After the treatment, supernatants were collected, centrifuged and analyzed according to the manufacturer's instructions. The cells treated only with DMEM were used as NC. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Loccus, Cotia, SP, Brazil).

### 2.8. ELISA assay for human vascular endothelial growth factor (VEGF)

The levels of VEGF after the treatment were quantified using an ELISA kit (Invitrogen, MA, USA). MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded in 24-well tissue culture plates at a density of 2.5x10<sup>5</sup> cells/mL. The cells were allowed to attach overnight at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, they were exposed to IC<sub>50</sub> value of artepillin C for 48h. After the treatment, supernatants were collected, centrifuged and analyzed according to the manufacturer's instructions. The cells treated only with DMEM were used as NC. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader (Loccus, Cotia, SP, Brazil).

### 2.9. Statistical analysis

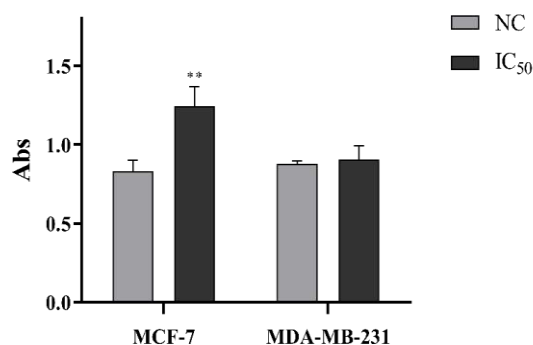
Significant differences among means were calculated using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer multiple comparisons test. At least three independent experiments were performed to express the means ± standard deviation (SD). GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used to analyze the data. P values < 0.05 were considered statistically significant.

## 3. RESULTS

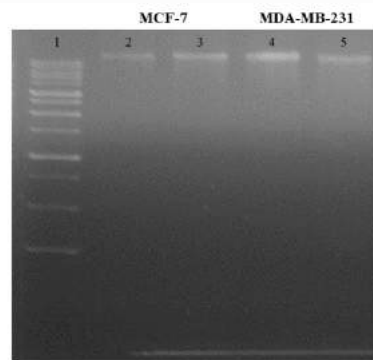
In the present study, we assessed plasma membrane permeability by measuring the release of the intracellular enzyme LDH. LDH is a cytoplasmic enzyme released into the extracellular space and in the cell culture supernatant when the plasma membrane is damaged, which occurs in necrosis. Thus, as shown in figure 1, high levels of LDH were quantified in the supernatant of MCF-7 cells (P = 0.0015,) after treatment with IC<sub>50</sub> compared to NC. On the other hand, in MDA-MB-231 cells, there was no significant increase (P = 0.9822).

Subsequently, we evaluated the effect of artemillin C exposure on  $\Delta\psi_m$  in BC cell lines using the Rh123 assay, in which depolarized or inactive mitochondria exhibit decreased  $\Delta\psi_m$  and fail to sequester rhodamine. Thus, our results showed that  $IC_{50}$  treatment significantly reduced  $\Delta\psi_m$  in MDA-MB-231 cells compared to NC ( $P < 0.0001$ ). On the other hand, there was no significant change in mitochondrial membrane potential in MCF-7 cells after artemillin C treatment when compared with the NC,  $P = 0.7144$  (Figure 2).

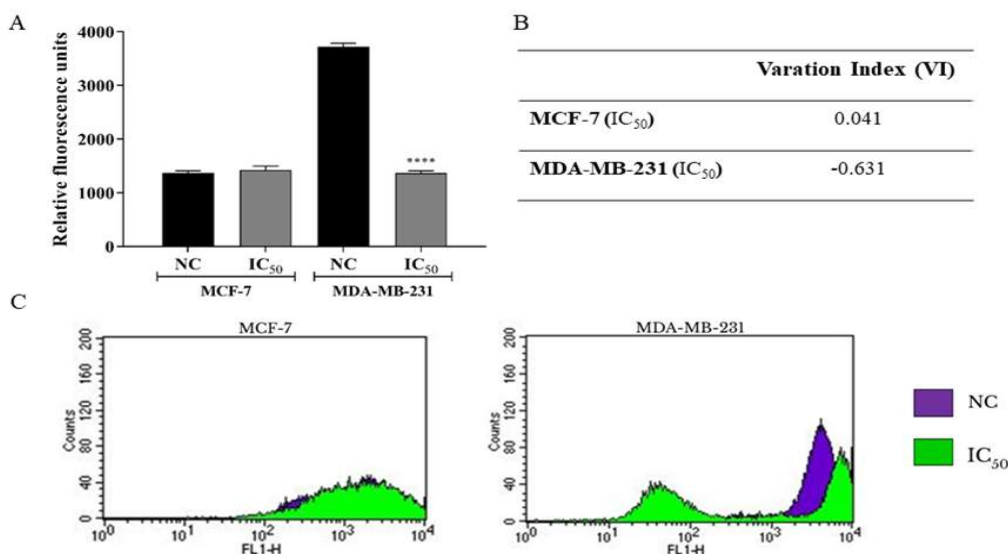
Following, we evaluated the effect of artemillin C on DNA fragmentation, which is a classic sign of apoptosis. As shown in figure 3, no DNA fragmentation was observed after  $IC_{50}$  treatment in both cell lines.



**Figure 1. Analysis of permeabilization of the plasma membrane by measuring the release of the intracellular enzyme LDH.**



**Figure 3. DNA fragmentation assay.** Agarose gel electrophoresis. Lane 1: 1Kb DNA ladder, lane 2 and 4: NC MCF-7 and NC MDA-MB-231, respectively, lane 3 and 5: cells treated with  $IC_{50}$  value, MCF-7 and MDA-MB-231, respectively.

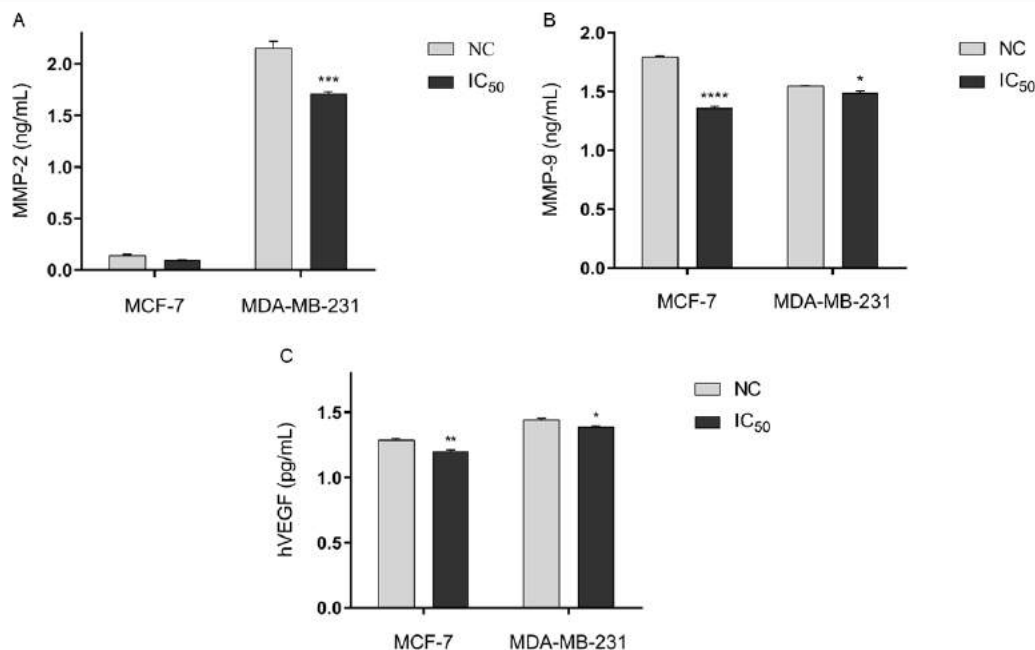


**Figure 2. Analysis of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231) after exposure to artemillin C ( $IC_{50}$  values) measured using the Rh123 assay in the flow cytometry.** (A) Plot of the relative fluorescence units of cells using rhodamine 123 after treatment with artemillin C. (B) VI values were obtained by the  $(MT-MC)/MC$  equation, where MT corresponds to the median fluorescence of the treated cells ( $IC_{50}$ ), and MC is the median fluorescence of the control cells (NC). (C) Representative histograms showing treated cell lines stained with Rh123 by flow cytometry are shown.

To investigate the mechanisms involved in the anti-migratory and anti-invasion effects of artemillin C found in the previous results obtained in our laboratory, the next step was to evaluate the levels of MMP-2 and MMP-9 produced by BC cell lines after exposure to artemillin C. For this, we used ELISA to quantify this production in the supernatant of cancer cells. After treatment with artemillin C, a significant decrease in MMP-9 levels was observed in both cell lines (MCF-7:  $P < 0.0001$  and MDA-MB-231:  $P = 0.0260$ ), in addition to a significant decrease in MMP-2 in the MDA-MB-231 cell line ( $P = 0.0010$ ), and a tendency to decrease in MCF-7, but was not significant (Figure 4A-B).

Finally, we also evaluated the effect of artemillin C on the production of VEGF, the most important inducer of angiogenesis. As shown in figure 4C, after artemillin C treatment, VEGF production was reduced in MCF-7 ( $P = 0.005$ ) and MDA-MB-231 ( $P = 0.0338$ ).





**Figure 4. The levels of MMP-2, MMP-9, and VEGF in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with artemillin C (IC<sub>50</sub>).** (A) MMP-2 production. (B) MMP-9 production. (C) VEGF production.

#### 4. DISCUSSION

There is an intense search for new therapeutic options for BC, especially because of its impact on public health and its high rates of recurrence and metastasis (16). Given our previous results that demonstrated the antitumor activity of artemillin C in BC cell lines (13,14), there was interest in understanding its possible mechanisms of action.

Although the cell lines used in this study (MCF-7 and MDA-MB-231) are both invasive ductal/mammary carcinoma cells, they have many phenotypic/genotypic differences: MCF-7 are hormone-dependent, while MDA-MB-231 are triple-negative (15). Thus, differences in their pathways of action and death after treatment with artemillin C could be evidenced.

The present results showed that MCF-7 cells increased LDH enzyme, demonstrating that death by necrosis was most observed. These data evidence that there was damage to the plasma membrane of these cells, being a key signature for necrotic cells is the permeabilization of the plasma membrane (17). Overall, the cell dies by necrosis when the toxic agent is present in the biological environment in concentrations capable of causing major cellular disruption and damage (18). Thus, we can relate it to the greater cytotoxicity of artemillin C in MCF-7 cells found in our previous study, with IC<sub>50</sub> lower than MDA-MB-231 cells (14). In MDA-MB-231 cells, we observed that after treatment with IC<sub>50</sub> of artemillin C, there was no significant increase in the LDH enzyme. Hence, the mode of cell death depends on both the cell type and the nature and dose of the death trigger (19).

Changes in  $\Delta\psi_m$  are a further indication of apoptosis, as  $\Delta\psi_m$  contributes to the process that facilitates the exit of many apoptogenic factors into the cytosol (20). Thus, our results also showed that after artemillin C exposure in MDA-MB-231 cells, there was decreased  $\Delta\psi_m$ , which may be the pathway of activity for this cell line. Our results are in agreement with previous studies reporting that artemillin C can induce apoptosis by  $\Delta\psi_m$  in prostate cancer cells (21). Still, although DNA fragmentation was not observed in both cell lines after exposure to artemillin C and our results may be due, at least in part, to the weak artemillin C-DNA interaction, which leads to a very low probability of artemillin C genotoxicity.

The processes of tumor growth, invasion, and metastasis involve many complex biological events: cell proliferation, proteolytic digestion, and migration through components of the cell matrix (22). These processes are a consequence of the proteolytic enzymes like serine proteases and matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the basement membrane enabling the tumor cells to invade the adjacent tissues. MMP-2 and MMP-9 are highly expressed in BC and are closely related to lymph node metastasis and tumor staging (23). Our results showed that after treatment with artemillin C was observed a significant decrease in MMP-9 levels in both BC cell lines, and MMP-2 only in the MDA-MB-231 cell line. In addition, the MDA-MB-231 cell line showed high basal levels of both MMPs evaluated. This cell line represents the triple negative cancer type, a more aggressive cancer type with a worse prognosis and a higher chance of metastasis (15). MMP-2 and MMP-9 can be used as reference indicators for guiding

treatment and estimating prognosis (23). Therefore, artepillin C presented a potent effect on inhibition of invasion and metastasis via MMP-2 and MMP-9 production inhibition.

Recent studies demonstrate the involvement of MMPs in rupture, tumor neovascularization, and subsequent metastasis (24). Vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic factor, plays a critical role in tumor growth and metastasis and is highly up-regulated in BC (25). MCF-7 and MDA-MB-231 cells showed high levels of VEGF and after artepillin C treatment showed a significant reduction of these. A study demonstrated that artepillin C has a tumor-suppressing effect not only by directly inhibiting tumor cell growth but also by inhibiting angiogenesis using Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and in vivo models (26). In our results, artepillin C represents an inhibition effect of angiogenesis via VEGF production inhibition.

Although we are not aware of any studies evaluating the possible mechanisms of artepillin C in BC cells, data regarding artepillin C-induced cell death suggest that it may occur through multiple pathways and inhibited invasion/metastasis and angiogenesis in different types of cancer/cells (10,12,26).

## 5. CONCLUSION

Altogether, our results demonstrated that artepillin C induces different mechanisms of action and death depending on the BC cell lines. Furthermore, artepillin C was able to inhibit the migration and invasion of tumor cells, possibly by decreasing their ability to form metastases mainly via MMP-2 and MMP-9 in inhibition and angiogenesis via VEGF production inhibition. Taken together, the results presented here indicate a promising agent for the treatment of BC.

## FINANCIAL SUPPORT

CAPES and CNPq.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Clinical Cytology Laboratory from the State University of Maringá for all the support and Professor Dr. Denise Brentan da Silva for the donation of artepillin C.

## REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
2. Cardoso F, Spence D, Mertz S, Corneliussen-James D, Sabelko K, Gralow J, et al. Global analysis of advanced/metastatic breast cancer: Decade report (2005-2015). *Breast.* 2018 Jun;39:131–8.
3. Peart O. Metastatic Breast Cancer. *Radiol Technol.* 2017 May;88(5):519–39.
4. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(3):213.
5. Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol.* 2019 Jan 22;7(3):3.
6. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2019 Dec 1;5(1).
7. Weigelt B, Peterse JL, Van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5(8):591–602.
8. Bhargava P, Mahanta D, Kaul A, Ishida Y, Terao K, Wadhwa R, et al. Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. *Nutrients.* 2021 Aug 1;13(8).
9. Masadah R, Ikram D, Rauf S. Effects of propolis and its bioactive components on breast cancer cell pathways and the molecular mechanisms involved. *Breast Dis.* 2021;40(S1):S15–25.
10. Souza RP, Bonfim-Mendonça PS, Damke GMZF, de-Assis Carvalho ARB, Ratti BA, Dembogurski DSO, et al. Artepillin C Induces Selective Oxidative Stress and Inhibits Migration and Invasion in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018 Jun 5;18(12):1750–60.
11. Paulino N, Abreu SRL, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H, et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jun 10;587(1–3):296–301.
12. Messerli SM, Ahn MR, Kunimasa K, Yanagihara M, Tatefuji T, Hashimoto K, et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytother Res.* 2009 Mar;23(3):423–7.
13. Meirelles LEF, de-Assis Carvalho ARB, Damke GMZF, Souza RP, Da-Silva DB, Dembogurski DSO, et al. Potencial antitumoral do artepillin C em células de câncer de mama. In: *Anais do V International Meeting of Biosciences and Physiopathology e IX Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia.* Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2018. p. 106–10.
14. Meirelles LEF, Damke GMZF, Souza RP, Damke E, Bonfim-Mendonça PS, Dembogurski DSO, et al.

- Artepillin C induces cytotoxic effects on breast cancer cells through necrosis and late apoptosis. In: Anais do VII International Meeting of Biosciences and Physiopathology e XI Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2020. p. 152.
15. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515.
  16. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2019 51. 2019 Sep 23;5(1):1–31.
  17. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jun 1;2018(6):465–8.
  18. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999 Dec 16;18(54):7719–30.
  19. Orrenius S. Role of Cell Death in Toxicology: Does It Matter How Cells Die?. 2019 Jan 9;59:1–14.
  20. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1–13.
  21. Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E, Krol W. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol*. 2012 Sep;41(3):818–28.
  22. Nakopoulou L, Giannopoulou I, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Tsirmpa I, Alexandrou P, et al. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol*. 2002 Jul 1;197(3):307–13.
  23. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett*. 2017 Nov 1;14(5):5865–70.
  24. Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, Torres-Romero JC, Arana-Argáez V, Lara-Riegos J, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Front Oncol*. 2019 Dec 6;9:1370.
  25. Liu Y, Tamimi RM, Collins LC, Schnitt SJ, Gilmore HL, Connolly JL, et al. The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Aug;129(1):175.
  26. Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett*. 2007 Jul 18;252(2):235–43.

**Keywords:** breast cancer cell lines; artepillin C; antineoplastic agents.



## **EFEITO DA SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR PROGRAMAÇÃO NA LACTAÇÃO SOBRE O INTESTINO DE CAMUNDONGOS BALB/c**

**Erick Lincoln Carneiro<sup>1</sup>; Carolina Naoko Abe Kano<sup>2</sup>; Larissa Leiko Yamada<sup>2</sup>; Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow<sup>3</sup>; Paulo Cezar de Freitas Mathias<sup>3</sup>; Amanda Gubert Alves Dos Santos<sup>4</sup>; Debora de Mello Gonçales Sant'ana<sup>5</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo<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>Acadêmico de Graduação em Farmácia, Laboratório de Neurogastroenterologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Docente, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Docente, Centro Universitário Integrado, Campo Mourão, PR.

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: c-erick17@live.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Sendo considerada um transtorno complexo, a Síndrome Metabólica (SM) é representada pela presença de um conjunto de condições inter-relacionadas, de origem metabólica, que se manifestam em um indivíduo podendo contribuir para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) e/ou diabetes do tipo 2. Dentre os componentes da SM pode-se incluir hipertensão arterial, alto nível de açúcar no sangue, excesso de gordura abdominal e níveis anormais de colesterol. Suas causas ainda não são completamente estabelecidas, porém sabe-se que a obesidade e a resistência à insulina desempenham um papel muito importante para o desenvolvimento da síndrome. Pré-disposição genética, má alimentação e a ausência da prática de atividades físicas também podem ser fatores que contribuem para o surgimento da SM (1, 2).

Atualmente, a definição de SM dada pelo Programa Nacional de Educação sobre Colesterol - Painel de Tratamento de Adultos III (NCEP-ATP III) é a mais utilizada e considera doença cardiovascular o ponto de partida inicial para esse transtorno. Esta mesma definição não considera alterações em perfil glicêmico ou de insulina como obrigatórios para que a síndrome seja considerada, porém, resistência à insulina é uma condição comum em portadores da SM (1, 3, 4).

Estima-se que atualmente cerca de um quarto da população mundial seja afetada pela SM, podendo assim ser considerada um grande problema de saúde pública (5). Estudos realizados na América Latina mostram uma prevalência de aproximadamente 24%, sendo a população feminina a mais afetada. No Brasil, estima-se que um terço da população seja portadora da SM, não havendo estudos que demonstrem sua prevalência em populações específicas (6).

Diversos estudos demonstram associação da SM com uma grande diversidade de condições clínicas e alterações em diversos órgãos, como síndrome do ovário policístico, doença hepática gordurosa não alcoólica e estados pró-inflamatórios, por exemplo (7). Enquanto alguns estudos afirmam que o risco de surgimento do câncer de colo retal pode ser aumentado em pacientes portadores de diabetes tipo 2, a obesidade, outro componente da SM, também está associada a alterações intestinais (8, 9). De acordo com um estudo realizado em 2017, a obesidade pode ser considerada um fator de risco e em alguns casos, até mesmo causa direta para diversas doenças no intestino e no fígado. Além disso, o trato gastrointestinal (TGI) é responsável pela produção de diversos hormônios cuja a função está na regulação do apetite e da saciedade, tais como a grelina, a colecistocinina e o peptídeo YY, além da incretina GLP1, que impacta na

glicemia pós-prandial, além de ser responsável pela absorção de nutrientes. Tudo isso interfere na ingestão de alimentos e metabolismo do indivíduo, sendo de extrema relevância para a obesidade e doenças metabólicas. Também pode-se citar a relação com a microbiota presente no TGI e os produtos da digestão da mesma, podendo estes modificar alguns fatores metabólicos que se relacionam com a obesidade e SM (9).

Sendo o principal local onde ocorre a absorção de nutrientes, o intestino delgado também é considerado um importante órgão imune e endócrino (10, 11). No interior das paredes intestinais são encontradas projeções do epitélio denominadas vilosidades e as microvilosidades que aumentam a superfície de absorção (12). Dentre os vários tipos celulares encontrados no epitélio intestinal estão as células caliciformes, responsáveis pela produção de muco que, por sua vez gera uma barreira de proteção física e age como lubrificante no lúmen (13). Ainda no epitélio, também são encontradas diversas células do sistema imune, como linfócitos e mastócitos, além de outras. Na porção mais externa da parede intestinal estão a tela submucosa e a túnica muscular, encarregadas da contração do intestino e movimentação do conteúdo luminal (10).

De acordo com uma diversa gama de estudos, todo o TGI, incluindo o intestino delgado, pode ser afetado por componentes da SM, levando a diversas alterações morfológicas e inflamação, assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da SM induzida por programação na lactação, sobre o jejuno de camundongos BALB/c, por meio da avaliação da morfometria da parede intestinal e vilos, bem como da quantificação de células caliciformes, mastócitos e linfócitos intraepiteliais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

Para este estudo foram utilizados 12 camundongos BALB/c machos, advindos do projeto “EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA E HIDROXICLOROQUINA EM PARÂMETROS METABÓLICOS DE CAMUNDONGOS VELHOS, MAGROS E OBESOS PROGRAMADOS NA LACTAÇÃO” proposto pelo Professor Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias, docente no Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM sob o parecer 8137280920. Os animais foram distribuídos em dois grupos contando com 6 animais cada. Para o primeiro grupo (SL – small litter), representando um modelo de programação por excesso, utilizou-se o modelo de Redução de Ninhada no qual foi mantido o máximo de 3 animais por ninhada, o que afeta a oferta de leite durante a lactação, induzindo o sobrepeso e a disfunção metabólica. Para o segundo grupo, o Controle (NL – normal litter), os animais foram mantidos com a ninhada normal. Após desmame, ambos os grupos foram mantidos aos trios em caixa climatizada, ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração comercial *ad libitum* durante todo o período do experimento.

### **2.2. Indução da Síndrome Metabólica**

Todo o processo de indução da SM foi realizado na parte experimental do projeto “EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA E HIDROXICLOROQUINA EM PARÂMETROS METABÓLICOS DE CAMUNDONGOS VELHOS, MAGROS E OBESOS PROGRAMADOS NA LACTAÇÃO”. Foram adquiridos 70 camundongos BALB/c adultas fêmeas e 35 camundongos adultos machos junto ao Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, em caixas de prolipopileno com as dimensões de 15 cm, 30 cm, 45 cm, sendo altura, largura e comprimento, respectivamente. Tendo passado uma semana para a adaptação, os animais foram alocados em caixas para cruzamento, na proporção de duas fêmeas para cada macho. Constatada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais com livre acesso a ração comercial (Nuvilab® CR1) e água até o nascimento dos filhotes, sendo este considerado dia 0. No dia 1 as ninhadas de todos os grupos foram padronizadas para 9 filhotes por lactante, mantendo a proporção de 6 machos e 3 fêmeas. Os machos utilizados no cruzamento foram eutanasiados com tiopental i.p. a uma dose letal (150mg/kg), associado a lidocaína (10 mg/mL). Para o modelo de programação por excesso, foi utilizado o modelo de Redução de Ninhada (SL). No terceiro dia, realizou-se o ajuste de ninhadas, mantendo apenas 3 animais para cada lactante, o que alterou a oferta de leite aos filhotes durante a lactação induzindo ao sobrepeso e disfunção metabólica. Os filhotes não utilizados foram eutanasiados por sobredosagem anestésica (Tiopental 150mg/kg + Lidocaína 10mg/kg).

### **2.3. Coleta do material biológico**

Após 180 dias desde o nascimento dos filhotes, os camundongos foram pesados e submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico com isoflurano. Após laparotomia, aproximadamente 1 centímetro do jejuno foi coletado para a realização do processamento histológico, o qual consistiu na fixação do órgão em paraformaldeído tamponado, que foi seguido da inclusão em parafina e então a confecção de lâminas contendo de 4 a 6 cortes semi-seriados de 5 µm. Estas lâminas foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) para quantificação de linfócitos intraepiteliais e morfometria de parede; Ácido

Periódico de Schiff (PAS), AlcianBlue pH 2,5 (AB 2,5) e AlcianBlue pH 1,0 (AB 1,0) – para detecção de diferentes tipos de mucinas; Picrosirius red – para evidenciar colágenos dos tipos I e III; Azul de Toluidina – para quantificação de mastócitos totais.

#### 2.4. Análises morfométricas

Para as análises morfométricas, foram utilizados os dados de apenas 4 animais por grupo. As mensurações foram realizadas com auxílio do software Image-Pro Plus 2.0®. Foram analisadas 16 imagens capturadas de 4 cortes histológicos do mesmo animal utilizando uma câmera digital (Moticam 2000, 2.0 Megapixel) acoplada a um microscópio de luz trinocular (MOTIC B5), sendo 1 imagem/quadrante/corte coradas por HE. Nas imagens capturadas com a objetiva de 20X foi determinada a altura e largura dos vilos, espessura da túnica submucosa, das camadas musculares e da parede intestinal total. Nas lâminas coradas com Picrosirius red foram capturadas 16 imagens em microscópio de luz polarizada para a mensuração das fibras colágenas do tipo I e III e 16 imagens sem luz polarizada para a mensuração das fibras de colágeno total.

#### 2.5. Quantificação celular

A quantificação de linfócitos intraepiteliais (LIEs) foi realizada em microscópio ótico, objetiva de aumento de 40x, onde foram contadas 2560 células do epitélio da túnica mucosa intestinal e os LIEs presentes entre essas células. A contagem de células calciformes foi realizada pelo mesmo procedimento em cada uma das colorações (PAS, AB 2,5 e 1,0). Posteriormente foi calculada a proporção de LIEs ou células calciformes/100 células epiteliais. Para a quantificação dos mastócitos totais foi realizada a contagem de todas as células presentes em 100 campos microscópicos aleatórios na objetiva de 100x em 4 cortes por animal e os resultados serão apresentados pelo número de células por mm<sup>2</sup>.

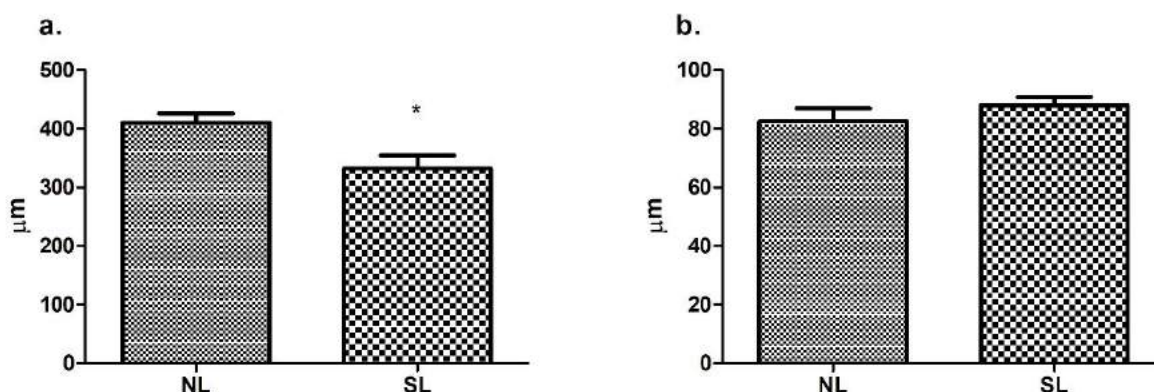
#### 2.6. Análise estatística

Para as análises morfológicas e para a quantificação de células foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, no qual todos dados apresentaram distribuição normal. Para a comparação entre os grupos foi realizado o teste T e os resultados foram apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão, tendo sido considerados significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

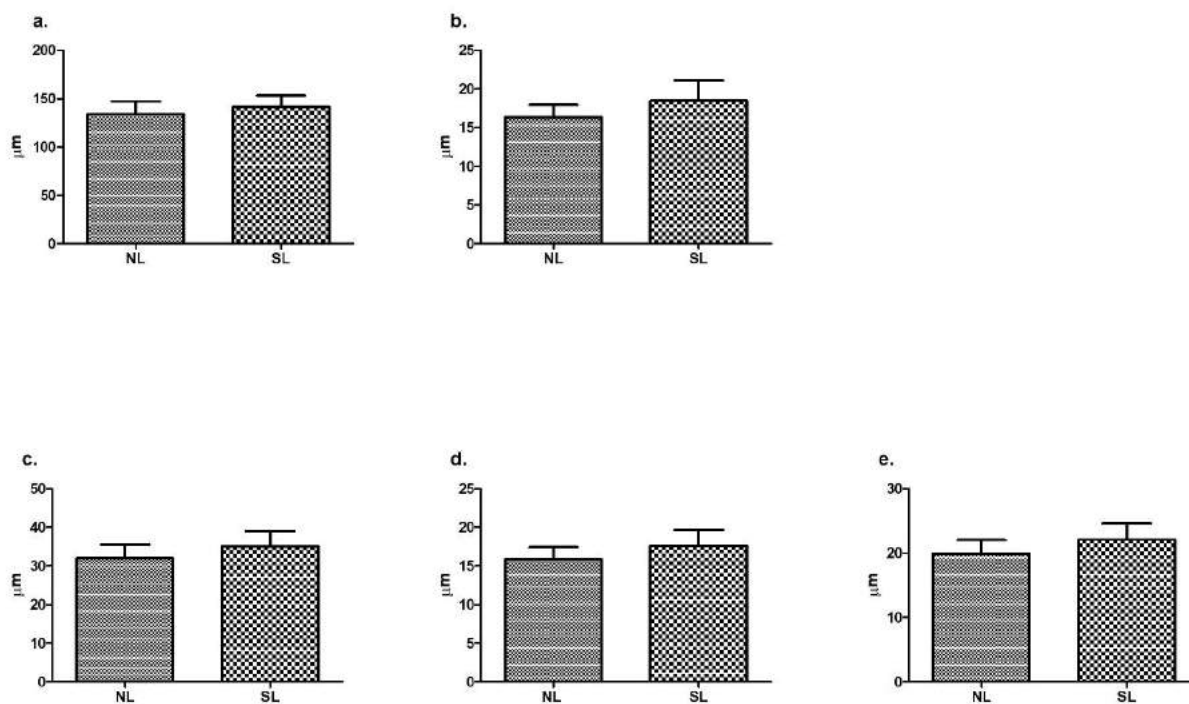
O intestino é um órgão luminal e apresenta vilosidades e microvilosidades em seu interior, dispostas na camada mucosa da parede intestinal, a qual é constituída de tecido conjuntivo denso. De forma mais externa, está a camada muscular, dividida em longitudinal e circular (11).

O grupo SL ( $332,1 \pm 44,59 \mu\text{m}$ ) apresentou uma diminuição na altura dos vilos quando comparado ao grupo NL ( $410,2 \pm 44,59 \mu\text{m}$ ) (Figura 1). Por outro lado, não foram verificadas alterações significativas na largura de vilos, espessura da parede intestinal total, túnica submucosa, camada muscular total, longitudinal e circular (Figura 2).



**Figura 1 Morfometria de vilos.**

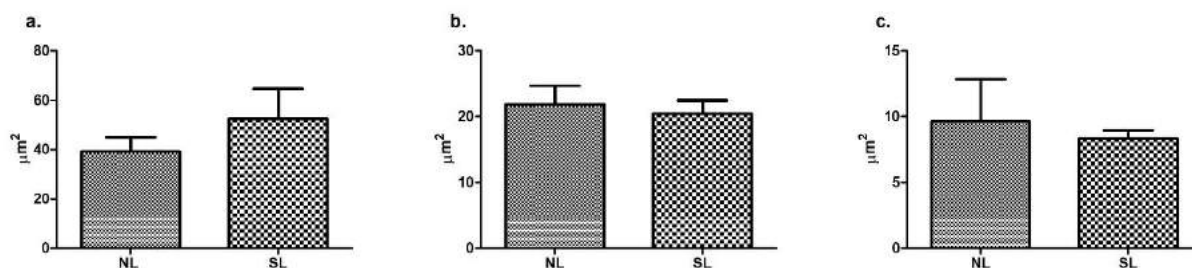
(a) Representa a altura, enquanto (b) representa a largura dos vilos, ambos dos grupos *normal litter* (NL) e *small litter* (SL). Todos os resultados estão expressos em  $\mu\text{m}$  e foram considerados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram  $p < 0,05$ , com (\*) indicando significância.



### Figura 2. Mensuração de parede.

(a) Representa a espessura da parede total, (b) túnica submucosa, (c) camada muscular total, (d) muscular longitudinal e (e) muscular circular dos grupos *normal litter* (NL) e *small litter* (SL). Todos os resultados estão expressos em  $\mu\text{m}$  e foram considerados significativos aqueles que apresentaram  $p < 0,05$ .

Com relação aos valores referentes à mensuração de fibras colágenas (Figura 3), também não foram encontradas diferenças significativas na área ocupada pelas fibras colágenas totais, tipo I e tipo III.

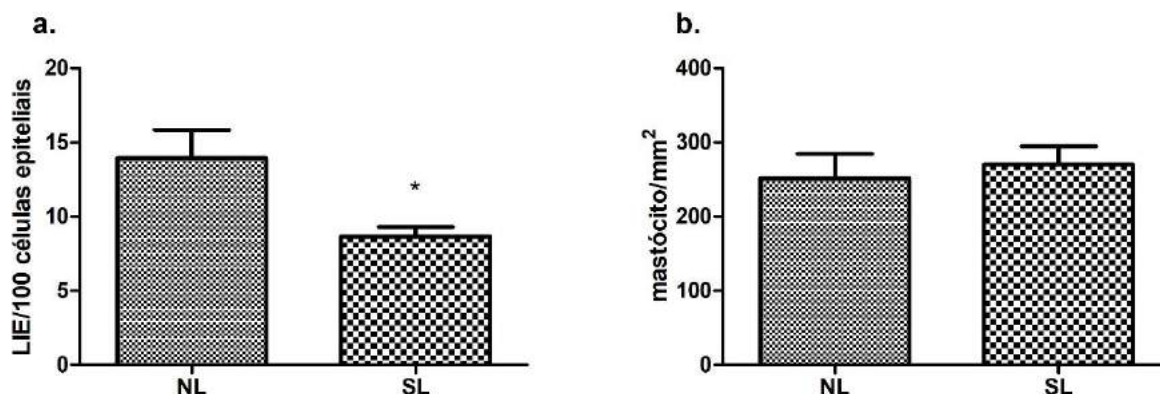


### Figura 3. Mensuração de fibras colágenas.

Os gráficos representam as mensurações de fibras colágenas dos grupos *normal litter* (NL) e *small litter* (SL) e os resultados estão representados pela média de fibras colágenas em  $\mu\text{m}^2$ , sendo (a) fibras colágenas totais, (b) fibras colágenas do tipo I e (c) fibras colágenas do tipo III.

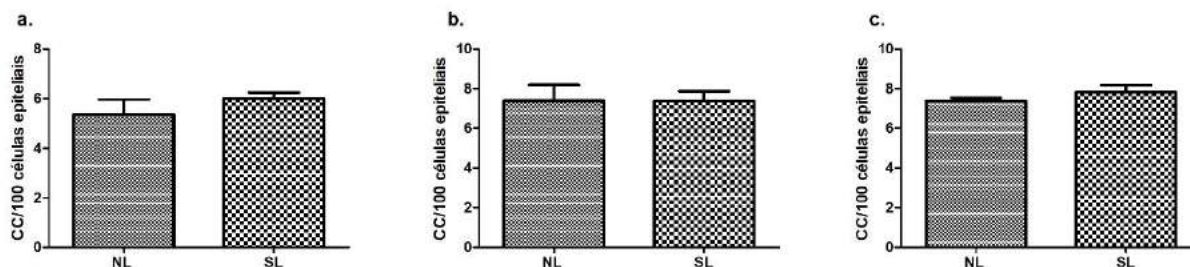
Os resultados da quantificação de linfócitos intraepiteliais e mastócitos estão representados na Figura 4. Observamos que o grupo SL ( $8,66 \pm 1,41$  LIE/100 células epiteliais) apresentou uma diminuição na proporção de LIE quando comparado ao grupo NL ( $13,92 \pm 4,34$  LIE/100 células epiteliais). Por outro lado, não houve diferença significativa no número de mastócitos. Na proporção de células calciformes coradas pelas técnicas

de Alcian Blue pH1,0, Alcian Blue pH 2,5 e PAS (Figura 5), também não houve alteração.



**Figura 4. Quantificação de linfócitos intraepiteliais e mastócitos.**

Em (a) estão representados os números de linfócitos intraepiteliais para 100 células epiteliais dos grupos *normal litter* (NL) e *small litter* (SL). O gráfico (b) é a representação do número de mastócitos por mm<sup>2</sup> dos mesmos grupos. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p < 0,05$ , com (\*) indicando significância estatística.



**Figura 5. Quantificação de células caliciformes.**

Todos os gráficos representam o número de células caliciformes para 100 células epiteliais dos grupos *normal litter* (NL) e *small litter* (SL). Em (a), os resultados referentes a análise das lâminas coradas pela técnica de Alcian Blue pH 1,0, em (b), Alcian Blue pH 2,5 e em (c), PAS. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

#### 4. DISCUSSÃO

Devido ao grande número de pessoas afetadas no mundo todo pela Síndrome Metabólica e a relação de seus componentes com diversos órgãos incluindo o intestino, um importante órgão imune e endócrino, o qual influencia direta e indiretamente no metabolismo, buscamos em nosso estudo demonstrar os efeitos causados pela SM programada na lactação sobre a morfologia intestinal e sobre alguns grupos celulares do jejuno de camundongos BALB/c, afim de melhor entender essa relação e quais as consequências essa síndrome pode trazer para este órgão (5, 7, 10).

Em nosso estudo não foram encontradas alterações significativas em parâmetros morfológicos com exceção da altura de vilos, que demonstrou diminuição no grupo SL. Tal resultado está de acordo com os achados de Ibegbu et al (2002), os quais descrevem uma diminuição dos vilos no intestino de ratos diabéticos induzidos pela administração de aloxana (14). O acompanhamento do peso destes animais foi realizado durante a parte experimental do projeto “EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA E HIDROXICLOROQUINA EM PARÂMETROS METABÓLICOS DE CAMUNDONGOS VELHOS, MAGROS E OBESOS PROGRAMADOS NA LACTAÇÃO”, estudo do qual os animais foram obtidos, e não demonstraram diferenças de peso (dados não publicados), assim como não foi evidenciada alterações na pesagem que antecedeu a eutanásia de ambos os grupos.

De acordo com a definição de SM dada pelo NCEP-ATP III, a obesidade não é um fator obrigatório para que o transtorno seja considerado, porém diversos estudos demonstram a relação da Síndrome Metabólica com o aumento da gordura corporal (1,3). O não aumento do peso dos animais demonstrado em nosso estudo pode estar relacionado com o achatamento dos vilos identificado no grupo SL, visto que as vilosidades e microvilosidades são responsáveis pelo aumento da superfície do epitélio intestinal e a sua diminuição pode levar a uma falha na absorção de nutrientes (12).



Com relação à quantificação celular, os resultados referentes às contagens de células caliciformes nas três técnicas de coloração realizadas não apresentaram diferença significativa, bem como a quantificação de mastócitos totais. Na contagem de linfócitos intraepiteliais foi identificada uma diminuição da proporção de células no grupo SL. Tal resultado contrasta com estudos que sugerem um alto nível inflamatório no intestino de animais obesos e diabéticos, como verificado por Crakes et al (2021). Neste estudo, o diabetes induzido por meio da administração de aloxana em cães machos causou o aumento de LIE no duodeno e infiltrado inflamatório no íleo dos animais (15). Por outro lado, a diminuição da expressão de IL-7, citocina liberada por células do epitélio intestinal (16), e da IL-15 (17) que é importante para a sobrevivência e proliferação de LIE pode interferir negativamente nas populações de linfócitos do intestino.

Assim, a diminuição de LIE encontrada em nosso trabalho pode estar relacionada com o achatamento dos vilos, que leva a um prejuízo nas células epiteliais, entretanto, outras análises devem ser realizadas para melhor compreensão desses resultados.

Apesar de grande parte dos parâmetros analisados em nosso estudo não demonstrarem significância estatística, existem várias evidências de que a Síndrome Metabólica afeta a morfologia intestinal e leva a inflamação no órgão. A não significância dos nossos resultados pode estar relacionada ao fato de serem resultados preliminares e compreenderem um número baixo de animais por grupo. Ademais, não foram realizadas análises funcionais do intestino, o que poderia levar a uma maior compreensão dos resultados. São necessários mais estudos, com novas técnicas e grupos celulares, bem como outros componentes do TGI para que seja compreendida melhor essa relação entre o intestino e a SM.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do nosso estudo, conclui-se que a Síndrome Metabólica induzida por programação na lactação não leva a grandes alterações morfológicas no intestino, bem como alterações quantitativas nas células do epitélio intestinal. Todavia, pode levar a um achatamento das vilosidades e diminuição do número de linfócitos intraepiteliais, o que a longo prazo, considerando as suas funções, poderia acarretar em prejuízos ao organismo, levando a uma diminuição na absorção de nutrientes e falhas na defesa intestinal.

## 6. FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## 7. AGRADECIMENTOS

Agradeço a todo o grupo de pesquisa em Neurogastroenterologia da Universidade Estadual de Maringá, por todo o suporte e auxílio oferecidos para a execução deste trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS

1. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol.* 2018;36(1):14-20. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
2. Lemieux I, Després JP. Metabolic Syndrome: Past, Present and Future. *Nutrients.* 2020;12(11):3501. 2020. doi:10.3390/nu12113501.
3. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(2):12. 2018. doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
4. Lira Neto JC, Xavier MA, Borges JWP, Araújo MFM, Damasceno MMC, Freitas RW. Prevalence of Metabolic Syndrome in individuals with Type 2 Diabetes Mellitus. *Revista brasileira de enfermagem*, v. 70, n. 2, p. 265-270, 2017. ISSN 00347167.
5. López-Jaramillo P, Zanchetti A. Consenso latino-americano de hipertensão em pacientes com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 58, n. 3, p. 205-225, 2014. ISSN 0004-2730
6. Oliveira LVA, Santos BNS, Machado IE, Malta DC, Velasquez-Melendez G, Felisbino-Mendes MS. Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 25, p. 4269-4280, 2020. ISSN 1413-8123.
7. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33:54–66.
8. Camilleri M, Malhi H, Acosta A. Gastrointestinal Complications of Obesity. *Gastroenterology.* 2017;152(7):1656-1670. doi:10.1053/j.gastro. 2016.12.052.
9. Vitale S, Picascia S, Gianfrani C. The cross-talk between enterocytes and intraepithelial lymphocytes. *Mol Cell Pediatr.* 2016 Dec; 3(1):20.
10. Posovszky C. Development and Anatomy of the Enteroendocrine System in Humans. *Endoc develop.* 2017; 20–37.

11. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2017.
12. Góis MB, Hermes-Uliana C, Barreto Zago MC, Zanoni JN, da Silva AV, de Miranda Neto MH, et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. *Exp Parasitol*. 2016 May 164:56–63.
13. Behera SK, Praharaj AB, Dehury B, Negi S. Exploring the role and diversity of mucins in health and disease with special insight into non-communicable diseases. *Glycoconj J*. 2015 Nov 32(8):575–613.
14. Ibegbu AO, Singh SP, Hambolu JO, Onyemelukwe GC, Ojo SA. Morphological and morphometric changes in the small intestine in drug-induced diabetic rats. *Bioscience Research Communications*. 2002 Feb 28;14(01) DOI 0795-8072/2002.
15. Crakes KR, Pires J, Quach N, Ellis-Reis RE, Greathouse R, Chittum KA. *Et. Al.* Fenofibrate promotes PPAR $\alpha$ -targeted recovery of the intestinal epithelial barrier at the host-microbe interface in dogs with diabetes mellitus. *Scientific Reports*. 2021 Jun 28;11(13454) DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92966-7>. Available from: <http://www.nature.com/scientificreports>
16. Sun L, Li T, Tang H, Yu K, Ma Y, Yu M, *et al.* Intestinal Epithelial Cells-Derived Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Is Essential for the Homeostasis of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. *Front Immunol*. 2019 Apr 16;10:806. doi: 10.3389/fimmu.2019.00806. PMID: 31040849; PMCID: PMC6476974.  
Hu MD, Jia L, Edelblum KL. Policing the Intestinal Epithelial Barrier: Innate Immune Functions of Intraepithelial Lymphocytes. *Curr Pathobiol Rep* 6, 35–46 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40139-018-0157-y>

**Palavras-chave:** jejuno; disfunção metabólica; morfometria;



## **ESTUDO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM TRABALHADORES DA AGRICULTURA FAMILIAR EXPOSTOS CRONICAMENTE A AGROTÓXICOS**

**Nadya Garcia de Oliveira<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Raul Gomes Aguera<sup>2</sup>; Any Carolina Chagas Almeida<sup>3</sup>; Aline Amenencia de Souza<sup>4</sup>; Beatriz Truzzi Silva<sup>4</sup>; Clayton Mendonça Ferreira<sup>1</sup>; Jurandir Fernando Comar<sup>5</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>6</sup>**

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

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

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>4</sup>Pesquisador, Bolsista Graduado, Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>5</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: nadyagarcia9@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O uso indiscriminado de agrotóxicos pode acarretar prejuízo à saúde dos trabalhadores que os manipulam (1,2). Porém a utilização desses é essencial para o manejo de lavouras e controle de pragas, de forma a permitir o máximo aproveitamento na agricultura. O uso em grande escala de agrotóxicos tem sido responsável por milhares de mortes na última década. Dados apontam que a utilização de agrotóxicos no Brasil teve aumento de 900% entre os anos de 1998 e 2008 e em 2009, 90% dos produtores agrícolas usavam agrotóxicos (3).

Segundo dados do departamento de informática do Sistema Único de Saúde (SUS) - DATASUS, no ano de 2020 houve 1.512 notificações de casos envolvendo intoxicação por agrotóxico de uso agrícola, sendo que desses, 767 (76,7%) casos representam exposição no ambiente de trabalho, ou seja, mais da metade dos casos de intoxicação está relacionada com o contato ocupacional aos praguicidas. No estado do Paraná 129 casos notificados de intoxicação envolvendo o ambiente de trabalho foram registrados no mesmo período (4). De acordo com dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), em 2020 o Brasil comercializou 685.745,68 toneladas de agrotóxicos, apresentando um aumento de 10,51% em relação ao ano de 2019, e o estado do Paraná ocupou a 4ª posição em vendas de agrotóxicos (5).

Os impactos de maior significado para a saúde da população oriundos do processo de exposição são as intoxicações agudas e crônicas (6). A exposição a agrotóxicos pode levar a quadros de síndrome cardiometabólica, inflamação e injúria no sistema nervoso (7), bem como estudos demonstraram que a exposição crônica a níveis altos de agrotóxicos, estão associados com modificações dos marcadores de estresse oxidativo no plasma (8) que pode estar associada na fisiopatologia de diversas doenças ocupacionais, associadas a problemas de sono, ansiedade, exaustão fisiológica, estresse psíquico induzidos em trabalhadores com longas jornadas de trabalho (9).

A entrada de substâncias tóxicas no organismo induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e se não neutralizadas pela capacidade antioxidante, gera danos nas células. Estudos têm demonstrado que nestes indivíduos tem sido observado o aumento na concentração plasmática de marcadores pró-oxidantes associado a diminuição da capacidade antioxidante, instalando-se o estresse

oxidativo (10-11). Durante o processo de instalação do estresse oxidativo marcadores biológicos são gerados permitindo a identificação e quantificação dos danos ocasionados ao organismo.

Em casos onde a produção de espécies reativas de oxigênio é maior que o sistema antioxidante, estas EROs em excesso podem oxidar lipídios de membrana, desnaturar proteínas e atacar ácidos nucleicos, que constitui a base molecular de várias doenças de caráter inflamatório (12). A proteína carbonilada é utilizada como marcador de estresse oxidativo proteico, levando em conta que durante o processo de estresse oxidativo, fragmentações das cadeias proteicas e oxidação de aminoácidos ocorrem, tendo como produto final compostos carbonilados (13). Os grupos tióis atuam como agentes antioxidantes, realizando a proteção de algumas enzimas da oxidação e também servindo como varredores de espécies reativas do organismo (14).

A proposta deste trabalho foi investigar trabalhadores da agricultura familiar expostos cronicamente a agrotóxicos, por meio da avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo advindo da exposição a estes contaminantes.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto foi desenvolvido em conjunto com as atividades do Projeto de Extensão Institucional “Monitoramento da Exposição Ocupacional” (Processo nº7303/08), do Núcleo de Pesquisa Centro de Controle de Intoxicações da Universidade Estadual de Maringá, do Laboratório de Toxicologia da UEM (LATOX-UEM), e das atividades do projeto PPSUS “**Exposição crônica a agrotóxicos e disfunções metabólicas e psicoemocionais: análise da microbiota fecal e perfil inflamatório como estratégia de investigação**” aprovado pela **CHAMADA PÚBLICA 11/2020 - PROGRAMA PESQUISA PARA O SUS: GESTÃO COMPARTILHADA EM SAÚDE - PPSUS EDIÇÃO 2020/2021**, bem como por meio da parceria estabelecida com o IDR-PR (Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná) de Marialva e prefeitura municipal de Marialva-Paraná (PR).

Trata-se de um estudo observacional, transversal realizado na população de agricultores residentes no município de Marialva-PR, cadastrados no IDR-Paraná (Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná).

### **2.1. Público alvo**

Trabalhadores da agricultura familiar dos gêneros masculino e feminino com idades entre 21 e 71 anos, que consentiram em participar do estudo.

### **2.2. Avaliação do estresse oxidativo**

Para avaliação do estresse oxidativo foi coletado sangue total com EDTA e foram realizadas a determinação dos níveis de grupos sulfidrila reduzidas de proteínas (tióis) (15); determinação de proteínas carboniladas (16) e determinação de proteínas totais (17).

#### **2.2.1. Coleta e preparação das amostras**

As coletas foram realizadas no salão paroquial da cidade de Marialva-PR. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) na concentração de 3 mmol/L foi utilizado como anticoagulante. O sangue total coletado foi imediatamente centrifugado a 1.000g por 10 minutos e o sobrenadante (plasma) separado e congelado a - 80°C para posterior análise.

#### **2.2.2. Determinação dos níveis de grupos sulfidrila reduzidas por proteínas (tióis)**

Os níveis de grupamentos tióis reduzidos de proteínas no plasma foram determinados por espectrofotometria (412 nm) utilizando o composto 5,5' ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) (ELLMAN, 1959) conforme descrito por FAURE e LAFOND (1995). Os valores foram expressos como mMI de tióis reduzidos por ml de plasma, por mg de proteínas totais e por mg de albumina.

#### **2.2.3. Determinação de proteínas carboniladas**

Os níveis de carbonilação de proteínas foram determinados por espectrofotometria de acordo com LEVINE et al (1990). Os grupamentos carbonila são derivados com o composto 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), formando um complexo que absorve em 370 nm. Os resultados foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 22.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressos em  $\eta$ mo de grupos carbonila por ml de plasma.

#### **2.2.4. Determinação de proteínas totais**

O conteúdo de proteínas totais no plasma foi determinado conforme descrito por LOWRY e Cols (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

### **2.3. Análises estatísticas**

A sistematização de dados foi realizada na planilha no programa Excel<sup>®</sup> complementado no programa Epidata 3.1<sup>®</sup> (www.openepi.com) e as análises estatísticas no *software* Stata 9.0<sup>®</sup> (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

### **2.4. Comitê de Ética**

O estudo é aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (CAAE N°65018017.7.0000.0104, parecer n° 4.040.007).

### 3. RESULTADOS

Até o momento, foram avaliadas amostras de 37 indivíduos participantes em nosso projeto, sendo 31 homens e 6 mulheres, com idade variando entre 21 e 71 (média 51,5 anos  $\pm$  15). Em relação à escolaridade, a maioria (64,8%) dos agricultores relataram ter estudado apenas até o ensino fundamental. As informações a respeito do perfil da população estudada, foram coletadas através de questionário aplicado no formato de entrevista (Tabela 1).

**Tabela 1. Perfil dos agricultores, expostos a agrotóxicos, da Cidade de Marialva-PR**

	N=37
Gênero	31 (83,8%) Masculino
	6 (16,2%) Feminino
Idade (Média $\pm$ DP*)	51,5 $\pm$ 15
Escolaridade	24 (64,8%) Ensino fundamental
	3 (8,1%) Ensino médio
	6 (16,2%) Ensino superior
	1 (2,7%) Pós graduação
	3 (8,1%) NS/NR

\*DP: Desvio-padrão

Entre os participantes, 73% dos agricultores relataram apresentar exposição atual aos agrotóxicos. Quanto à utilização do equipamento de proteção individual (EPI), que é indispensável tanto no preparo quanto na aplicação dos agrotóxicos, muitos trabalhadores relataram não fazer a utilização de nenhum EPI durante o contato com o agrotóxico (45,9%), como demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2. Contato atual com agrotóxicos e uso de Epi\* de agricultores da Cidade de Marialva-PR**

	N=37
Contato Atual com agrotóxicos	10 (27,0%) Não
	27 (73,0%) Sim
Uso de Epi*	20 (54,1%) Sim
	17 (45,9%) Não

\*EPI: Equipamento de proteção individual

Em relação ao tempo (em anos) em que essa população encontra-se exposta aos agrotóxicos, 48,6% relatou que estão em contato com estes a mais de 20 anos, sendo que, 5,4% utilizaram a expressão de que "desde sempre" estão em contato com tais agentes. Além disso, 29,7% dos respondentes disseram não saber ou não responderam a quantidade de anos em que estão expostos, podendo então ser ainda maior a porcentagem de indivíduos que estão a longo período de tempo expostos. Apenas 16,2% dos entrevistados relataram menos de 20 anos de exposição, sendo o menor tempo de exposição igual a 1 ano.

O tempo em dias, em que os agricultores relataram ter o último contato com agrotóxicos, variou desde 0 dias, onde representa que o agricultor teve o contato com o pesticida no dia da entrevista, até relatos de mais de 700 dias, equivalente a quase 24 meses sem que ocorresse o contato.

Em relação aos valores de proteína carbonilada encontrados nos agricultores, o menor valor encontrado foi igual a 0,71 nmoles carbonil/mg ptna e o maior valor foi de 6,96 nmoles carbonil/mg ptna. Os resultados de média e desvio padrão encontrados a partir da análise dos biomarcadores de estresse oxidativo, estão ilustrados na tabela a seguir.

**Tabela 5. Média dos níveis de proteínas carboniladas e tióis em amostras de plasma de agricultores da cidade de Marialva-PR.**

	Proteína Carbonilada nmoles carbonil/mg ptna	Tióis. (mM)
Média	2,88	0,484

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo o objetivo principal foi investigar trabalhadores da agricultura familiar expostos cronicamente a agrotóxicos. Em relação aos resultados preliminares, destaca-se a pouca utilização de EPI pelos agricultores. Em nossa população quase metade dos agricultores (45,9%) relataram não fazer a utilização de nenhum EPI. Diversos estudos trazem que grande parte dos agricultores negligenciam a utilização de tais equipamentos, como observado no estudo realizado no ano de 2016 nas cidades de Santo Antônio do Sudoeste e Pranchita, no Sudoeste do Paraná (PR), onde 55,6% dos agricultores, relataram não fazer a utilização de EPI (18). Mesmo em estudos realizados fora do país, demonstraram a baixa utilização desses equipamentos pelos agricultores, como em pesquisa realizada na zona rural do Sudoeste da Etiópia, que segundo Gesesew et al., (2014) notou-se que aproximadamente 42% dos agricultores entrevistados nunca usaram nenhum EPI contra a exposição a agrotóxicos (19). Desta população, 32,5% dos agricultores relataram ser analfabetos, podendo ser considerado um fator importante em relação ao entendimento dos possíveis riscos causados pela utilização crônica dos agrotóxicos sem a correta proteção. Em nosso estudo mais da metade dos indivíduos (73%) relataram ter estudado apenas até o ensino fundamental, tal fato deve ser levado em conta uma vez que segundo, Monquero, Inácio e Silva (2009), a exposição segura aos agrotóxicos exige a correta utilização dos equipamentos de proteção individual e a subutilização ou a falta de utilização desses, representa perigo à saúde de quem o aplica, podendo se apresentar como um fator de risco para maior exposição aos agrotóxicos e conseqüentemente maior dano oxidativo (20).

A carbonilação de proteínas é capaz de refletir os efeitos dos agrotóxicos sobre os organismos não-alvo, podendo ser utilizados como biomarcadores de exposição a estes (21). As proteínas presentes no plasma, são responsáveis por realizar inúmeras funções fisiológicas, dentre elas a manutenção do volume sanguíneo. A ocorrência de danos, leva a modificação química dessas proteínas ou em seus aminoácidos durante condições que levam ao estresse oxidativo, dando origem às proteínas carboniladas (22).

Em estudo realizado por Mori e colaboradores (2015), onde marcadores de estresse oxidativo foram avaliados em uma população de agricultores no Rio Grande do Sul, os níveis plasmáticos dos parâmetros de estresse oxidativo, se apresentaram aumentados quando comparados com o grupo controle no estudo. O valor de proteínas carboniladas encontrado no referido trabalho foi de 11,78 nmol carbonil/mg proteína, uma vez considerados esses resultados como aumentados, podem indicar ocorrência de oxidação crônica nos agricultores, podendo levar a graves conseqüências para a saúde (23). A média do nível de proteínas carboniladas encontrados em pacientes expostos a agrotóxicos na cidade Ibirubá-RS, situou-se entre 5 e 6 nmol carbonil/mg proteína (24). Em nosso trabalho, a partir da análise das 37 amostras, obtivemos a média de 2,88 nmol carbonil/mg proteína, sendo o maior valor encontrado de 6,96 nmol carbonil/mg proteína, correspondendo a um paciente exposto a 26 anos, relatou possuir apenas o ensino fundamental e relatou último contato com agrotóxico 5 dias antes da coleta. O menor valor de proteínas carboniladas encontrado, foi de 0,71 nmol carbonil/mg proteína, que corresponde a um indivíduo que relatou não possuir contato atual com agrotóxicos e possui nível superior completo. Vale ressaltar que não existem valores de referência para a determinação desses biomarcadores de estresse oxidativo, podendo esse efeito também ser desencadeado por outros fatores.

Em contra partida, a produção de antioxidantes endógenos como os tióis, bem como o consumo de antioxidantes a partir da dieta, são considerados importantes ao combate na produção das EROs, uma vez que os antioxidantes, ajudam no processo de neutralização e reparo de danos ocasionados pelo estresse oxidativo (25). Até o momento em nosso estudo, o valor encontrado de grupos tióis foi de 0,48 mM. Em estudo realizado com indivíduos que trabalhavam em empresa de produção de agrotóxicos, foi verificado que o valor médio da determinação de grupos tióis foi de 0,160 mM. Portanto, nossa população apresentou valores maiores de atividade antioxidante, sugerindo que tal elevação pode indicar uma resposta à produção acentuada de EROs a fim de manter o balanço redox (26).

#### 5. CONCLUSÃO

A detecção de valores elevados de antioxidantes no plasma pode sugerir uma resposta frente à produção excessiva de EROs, em busca de manter o balanço redox. Até o momento, a maioria de nossos agricultores, apresentam longo tempo de exposição aos agrotóxicos associado a baixa utilização de equipamento de proteção individual, além disso, há indícios de que esses trabalhadores, apresentam alterações que sugerem estresse oxidativo, evidenciando a importância do monitoramento desta população.

#### FINANCIADORES

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-PR / SESA-PR / DECIT / SCTIE/MS / CNPq.

## REFERÊNCIAS

1. Furlong, M, Tanner CM, Goldman SM., Bhudhikanok GS, Blair A, Chade A, et al. Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease. *Environ Int.* 2015;75:144-50.
2. Garcia-Garcia CR, Parron T, Requena M, Alarcon R, Tsatsakis AM, Hernandez AF. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sci.* 2016;145:274-83.
3. Sharma A. Vinod K, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, et al., Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 2019. 1(11): p. 1446.
4. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), 2020. Intoxicação Exógena – Notificações registradas no SINAN NET – Brasil. [Internet]. [atualizado em 2020 Fev 07; citado em 2020 Fev 16]. Disponível em: [TabNet Win32 3.0: INTOXICAÇÃO EXÓGENA - Notificações registradas no Sinan Net - Brasil \(datasus.gov.br\)](http://tabnet.win32.3.0:INTOXICAÇÃO_EXÓGENA_-_Notificações_registradas_no_Sinan_Net_-_Brasil_(datasus.gov.br)).
5. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos/ Boletins anuais/ Boletim de 2020. Atualizado em out. de 2020. [Acesso em: 23 jul 2022]. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>.
6. Carneiro FF, Pignati WA, Rigotto RM, Augusto LGS, Pinheiro ARO, Faria NMX et al. (orgs.) Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Expressão Popular. P.624, 2015.
7. Lushchak, VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J*, 2018. 17: p. 1101-1136.
8. Lee KM, Park S-Y, Lee K, Oh, S.-S., & Ko, S. B. (2017). Pesticide metabolite and oxidative stress in male farmers exposed to pesticide. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 29(1). Doi:10.1186/s40557-017-0162-3.
9. Zelzer S, Tatzber F, Herrmann M, Wonisch W, Rinnerhofer S, Kundi M, et al. Work Intensity, Low-Grade Inflammation, and Oxidative Status: A Comparison between Office and Slaughterhouse Workers. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 1-7.
10. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr.* 2010;4(23):629-43. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
11. Bertolin TE, Farias D, Guarienti C, Petry FTS, Colla LM, Costa JAV. Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. *Braz Arch Biol Technol.* 2011;54(4):7338. [dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000400012](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000400012)
12. Er TK, Tsai SM, Wu SH, Chiang H, Lin HC, Lin SF, et al. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clin Biochem.* 2007;40(13-14):1015-9.
13. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007;30(5):1323-38. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
14. Continguiaba GG, Nascimento Silva JRN, Azevedo, RRS, Rocha TJM, Santos AF. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma revisão de literatura. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*; 15(3):231-7, 2013.
15. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*, v. 37, p. 277-281, 2004.
16. Levine R.L, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol*, v. 186, p 464- 78, 1990.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, p. 265-275, 1951.

18. Marcelino AF, Wachtel CC, Ghisi NC. Are Our Farm Workers in Danger? Genetic Damage in Farmers Exposed to Pesticides. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Jan 27;16(3):358. doi: 10.3390/ijerph16030358.
19. Gesesew HA, Woldemichael K, Massa D, Mwanri L. Farmers Knowledge, Attitudes, Practices and Health Problems Associated with Pesticide Use in Rural Irrigation Villages, Southwest Ethiopia. 2014. Disponível em: &lt; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5021266/?tool=pubmed> &gt;.
20. Monqueiro PA, Inácio EM, Silva AC. Levantamento de agrotóxicos e utilização de equipamento de proteção individual entre agricultores da região de Araras. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, SP: v.76, n.1, p.135-139, 2009. [Acesso em: 28 jul 2022]. Disponível em: <HTTP://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v761/monquero.pdf>.
21. Cattaneo B, Clasen B, Loro VL, Moraes B, López T, Avila LA, et al. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice–fish cultivation. *Eco Environ Safety*. Volume 77, 1 March 2012, Pages 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.001>
22. Griffiths HR, Dias IH, Willetts RS, Devitt A. Redox regulation of protein damage in plasma. *Redox Biol*. 2014 Jan 20;2:430-5. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.010)
23. Mori NC, Horn RC, Oliveira C, Leal PAP, Golle DP, Koefender J et al. Biochemical and toxicological changes among family farmers from the Alto Jacui region, Rio Grande do Sul state, Brazil. *Scientia Medica*, ISSN-e 1980-6108, Vol. 25, Nº. 3, 2015.
24. Reis G, Murussi C, Santi A, Clasen B, Loro VL, Nagel AS et al. Avaliação do perfil oxidativo e da atividade da enzima AChE em agricultores expostos a pesticidas agrícolas.
25. Antunes JMFN, Paula L. Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a prática de atividade física. *Braz J Biomot*, v. 5, p. 117- 131, 2011.
26. Akram R , Parvin P, Alireza S, Mohammad A. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. *Toxicol Lett* 2002 May 28;131(3):191-4. doi: 10.1016/s0378-4274(02)00033-4.

**Palavras-chave:** agrotóxicos; exposição ocupacional; estresse oxidativo.





## TREATMENT WITH RITALIN® DURING ADOLESCENCE PROGRAM GLYCEMIC HOMEOSTASIS DYSFUNCTION IN ADULT RATS

**Maria Natalia Chimirri Peres<sup>1</sup>; Anna Rebeka Ferreira Oliveira<sup>1</sup>; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro<sup>1</sup>; Scarlet Rodrigues Raposo<sup>2</sup>; Anna Carolina Huppes de Souza<sup>3</sup>; Gabriel Kian Guimarães Lopes<sup>3</sup>; Leticia Ferreira Barbosa<sup>3</sup>; Paulo Cesar de Freitas Mathias<sup>4</sup>; Kesia Palma-Rigo<sup>5\*</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>5\*</sup>**

<sup>1</sup> Graduate Student (Doctorate), Laboratory of Cell Biology of Secretion, State University of Maringa.

<sup>2</sup> Graduate Student (Masters), Laboratory of Cell Biology of Secretion, State University of Maringa, Maringá

<sup>3</sup> Scientific initiation student, Laboratory of Cell Biology of Secretion, State University of Maringa, Maringá

<sup>4</sup> Professor, Department of Cell Biology, State University of Maringa

<sup>5</sup> Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa

\*Those authors contributed equally to this work

e-mail: nataliamncp@hotmail.com

### 1. INTRODUCTION

Although Ritalin® is an FDA-approved medication for use as a treatment for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) whose symptoms persist in adolescence and adulthood (1, 2). Currently, around 5% of children and adolescents and 35% of university students have made indiscriminate use of medication, both for recreational use and believing in the improvement of concentration and learning from the medication (3, 4). The Ritalin® active principle is the Methylphenidate, which inhibits the transporters of dopamine and norepinephrine in the presynaptic cleft, thus inhibiting the reuptake of these neurotransmitters mostly in prefrontal cortex, reducing the severity of ADHD symptoms; making it a first-choice drug for the treatment of this disorder (2, 5). Sympathetic signaling by norepinephrine in adipose tissue promotes lipolysis and reduced fat mass (6) while dopamine is a neurotransmitter associated with stimulation, motivation and the reward system (7). A potent natural reward is food, which makes it a conditioning stimulus, with dopamine being a neurotransmitter associated with the development of obesity (8).

The DOHaD (developmental origin of health and disease) concept points that lifestyle-related diseases depend on the relationship between genes and the environment in critical phases of body development, programming the organism for diseases in adulthood, such as the cardiometabolic syndrome (9-12). The plasticity organism response to environmental stimuli or insults can be beneficial or harmful, leading, the last, to the development of metabolic dysfunctions (11). Programming the organism during a critical phase of development, when there is plasticity in the alteration of organ functionality (13, 14), this injury or insult can be nutritional through environmental pollution and even pharmacological (10). Previously we have shown that the peripubertal phase can be considered a programming window (15-18). Alberga *et al*, point why the adolescence is a critical developmental phase, showing that the plasticity caused by the hormonal discharge is responsible for the physiological and behavioral changes during this life phase (19). Studies carried out in our laboratory show that adult rats exposed to dietary insults during puberty have dyslipidemia, accumulation of visceral fat, hyperinsulinemia and insulin resistance, pointing to the importance of the peripubertal phase in metabolic programming (15, 20, 21).

It is well known that Ritalin® can cause changes in the bone structure, body weight, and heart rate among others (2). Fell studies point that methylphenidate can cause long-term reduction in body weight and bone structure (22). Furthermore, it is unknown the long-term impact of the increased synaptic concentration of dopamine and noradrenaline, in the context of DOHaD concept. The dopaminergic system is still in maturation during adolescence, the reward-signaling dopaminergic innervation originating from the ventral tegmental area to the prefrontal cortex and nucleus accumbens matures during adolescence becoming a system vulnerable to insults at this life stage (23, 24). Dopamine is closely related to the control of insulin secretion in the body and plays a role in glycemic homeostasis by regulating peripheral glucose metabolism through optogenetic activation of dopamine in the nucleus accumbens (25, 26). In this context, we hypothesize that the treatment with Ritalin® during peripubertal phase can program a glycemic homeostasis dysfunction in adult life. Therefore, the present study investigated the relationship of treatment with Ritalin in adolescence and its metabolic implications (body fat and insulin secretion) in puberty and in adult life, in rats.

### 2. MATERIAL AND METHODS

## 2.1. Animals and experimental conditions

The experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee for Animal use and Experimentation at the State University of Maringá (protocol number 5343210520). Wistar male rats at post-natal day (PN) 25 were obtained from the Central Animal Facility of the State University of Maringá (UEM) and housed in the Sectorial Animal Facility of the Cell Biology of Secretion Laboratory. After five days of adaptation (PN30), the animals were divided into two experimental groups: animals treated with Ritalin® (Rit; n=120;), by gavage, at a dose of 5 mg/kg/day (22, 23) between PN30 and PN60 (peripubertal life phase); and animals that received vehicle (0.9% saline, Sal; n=120), in the same administration via and life period. One tablet of Ritalin® was dissolved in 10 ml of 0.9% saline, and 0,005ml/g of body weight was administrated. The Sal group received 0.9% saline gavage in the same volume.

At PN60 and PN120 a cohort of animals was fasted overnight and then euthanized with a guillotine. Overnight fasting was performed to match metabolic conditions between the animals for subsequent biochemical analysis. Bodyweight was recorded and fat depots (retroperitoneal, mesenteric and periepididymal) were dissected and weighed.

## 2.2. Oral glucose tolerance test (oGTT)

After overnight fasting (20:00–08:00 h), a glucose gavage (1,5g/kg BW) was given to both groups PN60 and PN120, and blood samples were collected immediately before the glucose load (0 min, basal) and at 15, 30, 45, 60, and 120 min. All blood samples were obtained from the tail vein, and the glucose concentration was determined by a digital glucometer (Freestyle Optimum H, Abbott). Insulin measurements were made from blood samples collected at times 0,15,30,120 of the OGTT, using the kit Rat Ins 1 Insulin ELISA Kit (Sigma). HOMA-IR index  $[(\text{Glycemia (mg/dL)} \times 0,0555) \times \text{Insulin } (\mu\text{i/ml})] \div 22,5$  was also evaluated.

## 2.3. Statistical analysis of data

The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). GraphPad Prism 8 (GraphPad software, La Jolla, CA, United States) was used for statistical analysis and graphical representation. The statistical analysis was performed after the analysis of data distribution (Shapiro Wilk test). The comparison between the groups was performed using the Student's T test for each age. Results are considered significant when  $p < 0.05$ .

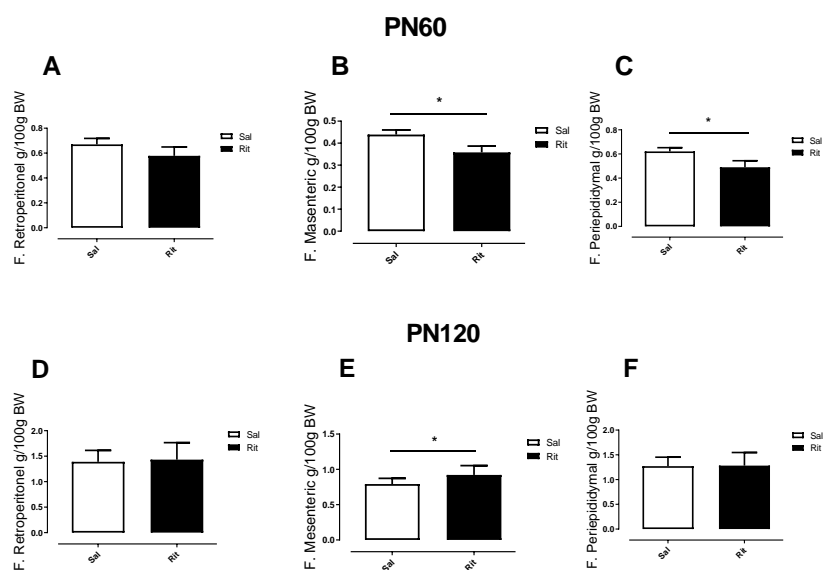
## 3. RESULTS

### 3.1. Biometric Parameters and food intake

There was no statistical difference between the groups in body weight neither in food intake.

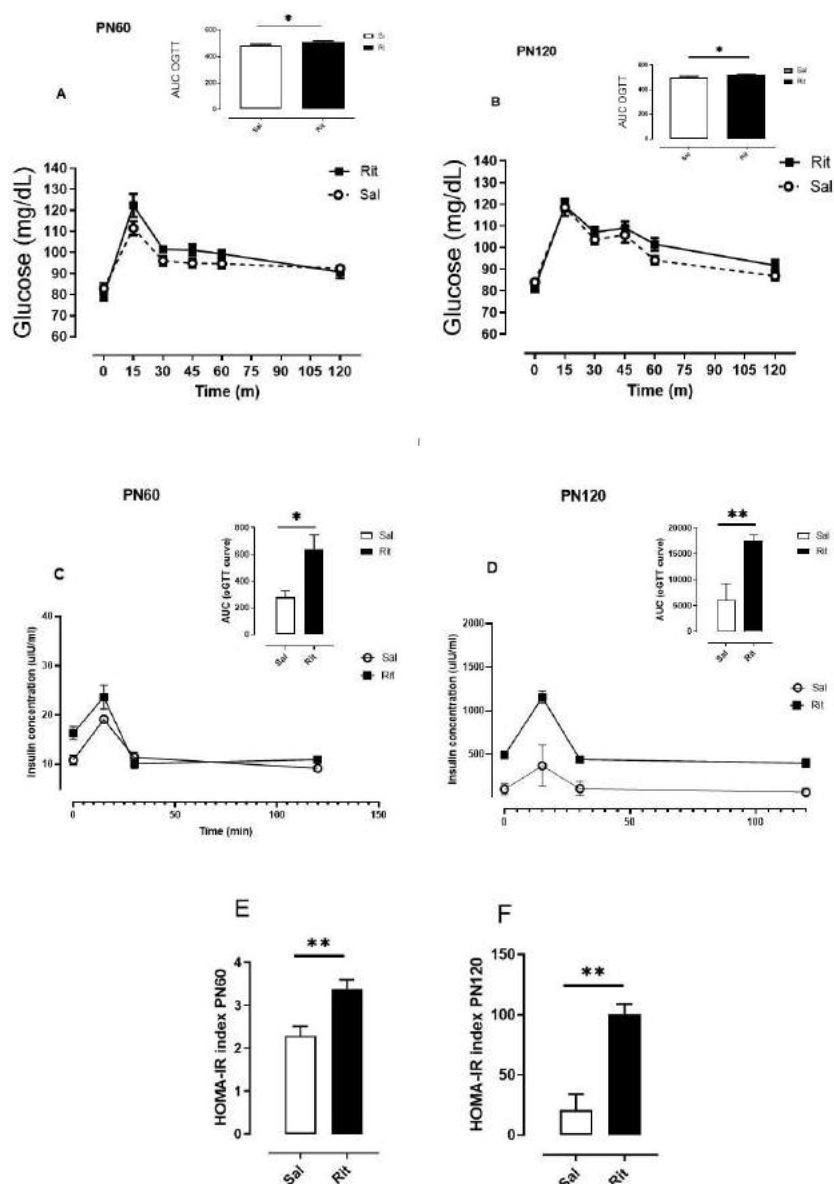
### 3.2. Body Fat

Peripubertal treatment with Ritalin reduced perigonadal and mesenteric fat pads by 26.5% and 22.8% at PN60 compared with Sal group ( $p < 0.03$  and  $p < 0.02$ , respectively; Fig 1 B and C, respectively). At PN120, mesenteric fat pad was 28.5% increase in Rit animals compared with Sal group ( $p < 0.02$ ; Fig 2 E). There was no statistical difference in the other evaluated body fat pads (Fig 1 A, D and F).



**Figure 1** Body Fat at PN 60 and PN 120 Retroperitoneal fat (A), Mesenteric fat (B), Periepididymal fat (C) and at PN 60. Retroperitoneal fat (D), Mesenteric fat (E), Periepididymal fat (F), at PN 120. n = 14-12 animals per group. Sal, animals treated with saline;

Rit, animals treated with Ritalin®. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . Statistical significance of differences between Sal and Rit for probability based on Tukey's multiple comparison test.



**Figure 3 “Oral glucose tolerance test curve (oGTT)”** Insulin dosage curve of OGTT and HOMA-IR index. Oral glucose tolerance test at the end of treatment (A), oral glucose tolerance test at the end of the experimental protocol (B), Insulin dosage of OGTT at the end of treatment (C), Insulin dosage of OGTT at the end of the experimental protocol (D), HOMA-IR index at PN60 (E) and HOMA-IR index at PN120 (F).  $n = 14-15$  animals per group. Sal, animals that ingested saline solution; Rit, animals that ingested ritalin. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  Statistical significance of differences between Sal and Rit for probability based on Tukey's multiple comparison test.

### 3.3. Oral glucose tolerance test (oGTT)

Figure 3 shows the glycemia and insulinemia during oral glucose tolerance tests and the HOMA-IR index. At PN60 and at PN120 both groups showed similar response to oral intake of glucose where the animals of Rit group had an increase in the area under curve (AUC) of the glycemia compared with the animals from Sal group (+5% and +4% respectively;  $p < 0.04$ ).

The insulinemia evaluation at the OGTT test at PN60 shows that the Rit group had an increase of 100% in the AUC of insulin levels ( $p < 0.01$ ) compared with the animals of Sal group. At PN120 the Rit group had an increase of 150% in the insulin levels compared with Sal group ( $p < 0.01$ ). The HOMA-IR index was 47.8% and 300% greater in the Rit group at PN60 and PN120 respectively ( $p < 0.008$  and  $p < 0.001$ ).

## 4. DISCUSSION

The present study shows that exposure to Ritalin® (5mg/kg/day) during peripubertal life induces glycemic homeostasis dysfunction, which persist until the adult life. The observed increase in glycemia during the oral glucose tolerance test points to a glucose intolerance which is consistent with the increased

insulinemia at PN60 and PN120, been all these changes are consequence of the insulin resistance, as pointed by the increased HOMA-IR index at PN60 and PN120 (27). This metabolic pattern is consistent with diabetes type II, as described by other authors (28, 29), however, few studies have explored the Ritalin® implication in this disease. Furthermore, although the treatment did not affect weight gain nor the food intake, it was observed a decrease in visceral fat in peripubertal phase and an increase in the mesenteric fat in adult life, which is related with systemic inflammatory condition (30). The present pattern points to a metabolic dysfunction that appear just after the chronic treatment with Ritalin® and persist until the adult life, pointing to the programming of disease later in life.

The experimental animal studies on drug effect are good tools to obtain fast results to understand the long-term impact of the intervention in the DOHaD concept context, however, the translation of the result from animals to humans need to be performed with precautions. It is important to consider the drug administration condition and used dose, as well as the animal model and its lifetime to make a coherent translation. In the present study, we explored the peripubertal life period, which has recently been pointed as an important susceptible window for development (31). Bolanos et al. (2003) show that a clinically relevant dose of methylphenidate, 2mg/kg/day, used during the peripubertal life of animals does not interfere with food intake, nor with body weight gain (32) therefore a 5mg/kg/day can be correlated as dose that causes metabolic dysfunction even if it does not change body weight or food intake (23, 33). Another study, by Elfers and Roth (2011), using a greater methylphenidate dose (20mg/kg/day) shows a reduction in food intake and consequent loss of body mass during treatment in adult animals with induced obesity (34).

The present glucose homeostasis dysfunction, characterized by an increased glycemia and insulinemia in the Rit group is coherent with the literature as it was shown that prolonged treatment with methylphenidate leads to enhancement of the insulin response to a glucose load (35). Previous studies shows that prenatal exposure to the commonly abused psychostimulants such as amphetamine, cocaine, and methamphetamine induces permanent impairment of glucose homeostasis in the offspring, leading to lifelong glucose intolerance (36). This pattern observed in perinatal developmental studies is reproduced in the present study as we show that the peripubertal exposure to Ritalin® deregulates glycemic homeostasis and this effect persists into adulthood. The present persistent insulin resistance estimated by the HOMA-IR, associated with the persistent basal hyperinsulinemia, points to the potential development of diabetes mellitus later in life. The glucose homeostasis is maintained by release of hormones from the endocrine pancreas. If this function is compromised, the body loses its ability to regulate blood glucose levels, which is causal to developing diabetes mellitus (37). The insulin has a primary function of maintaining glucose homeostasis so is the main hormone enrolled on diabetes mellitus development (38). Furthermore, it has been shown that the insulin secretion is regulated by cell surface fatty acid receptors (39).

Obesity-prone rats have increased free fatty acids in the blood after lipolysis of accumulated fat (40). The reduction in the mass of mesenteric and periepididymal fat during Ritalin® treatment is consistent with human adolescents studies, that show a decrease in body fat during treatment with Ritalin® (41). However, the literature points that after the end of the treatment these fats begin to accumulate (41) in humans, as we also observed in the present animal study, where the mesenteric fat was increased in the Rit animals in adulthood, which may be an indication of central obesity (42).

## 5. CONCLUSION

Finally, the present study shows that treatment with Ritalin® during the prepubertal phase deregulates glycemic homeostasis, making the animals intolerant to a glucose load, and inducing insulin resistance, which can lead to the subsequent development of type 2 Diabetes Mellitus.

## FINANCERS

CAPES and CNPq.

## ACKNOWLEDGEMENT

We thank the collaborators of the Laboratory of Cell Biology of Secretion of the State University of Maringa.

## REFERENCES

1. Yang X, Duan J, Fisher J. Application of Physiologically Based Absorption Modeling to Characterize the Pharmacokinetic Profiles of Oral Extended Release Methylphenidate Products in Adults. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164641.
2. Verghese C, Abdijadid S. Methylphenidate. 2018.
3. Clemow DB. Misuse of methylphenidate. *J Non-medical illicit use of psychoactive drugs*. 2015:99-124.
4. Mehta MA, Owen AM, Sahakian BJ, Mavaddat N, Pickard JD, Robbins TW. Methylphenidate enhances working memory by modulating discrete frontal and parietal lobe regions in the human brain. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(6):RC65-RC.

5. Somkuwar SS, Katak KM, Bardo MT, Dwoskin LP. Adolescent methylphenidate treatment differentially alters adult impulsivity and hyperactivity in the Spontaneously Hypertensive Rat model of ADHD. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016;141:66-77.
6. Zeng W, Pirzgalska RM, Pereira MM, Kubasova N, Barateiro A, Seixas E, et al. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *Cell.* 2015;163(1):84-94.
7. Maldonado R. Comparison of the pharmacokinetics and clinical efficacy of new extended-release formulations of methylphenidate. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(8):1001-14.
8. Volkow ND, Wang G-J, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends in cognitive sciences.* 2011;15(1):37-46.
9. Gill KE, Chappell AM, Beveridge TJ, Porrino LJ, Weiner JL. Chronic methylphenidate treatment during early life is associated with greater ethanol intake in socially isolated rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(8):2260-8.
10. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ.* 1990;301(6761):1111.
11. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med.* 2009;27(5):358-68.
12. Arima Y, Fukuoka H. Developmental origins of health and disease theory in cardiology. *J Cardiol.* 2020;76(1):14-7.
13. Suzuki K. The developing world of DOHaD. *J Dev Orig Health Dis.* 2018;9(3):266-9.
14. Barker DJP. Mothers, babies and health in later life. 1998.
15. Alberga A, Sigal R, Goldfield G, Prud'Homme D, Kenny G. Overweight and obese teenagers: why is adolescence a critical period? *Pediatric obesity.* 2012;7(4):261-73.
16. de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol.* 2013;216(2):195-206.
17. de Oliveira Belém M, Cirilo CP, de Santi-Rampazzo AP, Schoffen JPF, Comar JF, Natali MRM, et al. Intestinal morphology adjustments caused by dietary restriction improves the nutritional status during the aging process of rats. *Experimental Gerontology.* 2015;69:85-93.
18. de Oliveira JC, de Moura EG, Miranda RA, de Moraes AMP, Barella LF, da Conceicao EPS, et al. Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. *J Endocrinol.* 2018;237(3):243-54.
19. Carucci S, Balia C, Gagliano A, Lampis A, Buitelaar JK, Danckaerts M, et al. Long term methylphenidate exposure and growth in children and adolescents with ADHD. A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience Biobehavioral Reviews.* 2021;120:509-25.
20. Naneix F, Peters KZ, Young AMJ, McCutcheon JE. Age-dependent effects of protein restriction on dopamine release. *Neuropsychopharmacology.* 2021;46(2):394-403.
21. Ustione A, Piston DW, Harris PE. Minireview: Dopaminergic regulation of insulin secretion from the pancreatic islet. *Mol Endocrinol.* 2013;27(8):1198-207.
22. Haleem DJ, Inam QU, Haleem MA. Effects of clinically relevant doses of methylphenidate on spatial memory, behavioral sensitization and open field habituation: a time related study. *Behav Brain Res.* 2015;281:208-14.
23. Garcia-Aviles A, Albert-Gasco H, Arnal-Vicente I, Elhajj E, Sanjuan-Arias J, Sanchez-Perez AM, et al. Acute oral administration of low doses of methylphenidate targets calretinin neurons in the rat septal area. *Front Neuroanat.* 2015;9:33.
24. Whishaw IQ, Pellis SM, Gorny BP. Skilled reaching in rats and humans: evidence for parallel development or homology. *Behavioural brain research.* 1992;47(1):59-70.
25. Klein A, Sacrey L-AR, Whishaw IQ, Dunnett SB. The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neuroscience Biobehavioral Reviews.* 2012;36(3):1030-42.
26. Kharas N, Reyes-Vazquez C, Dafny N. Locus coeruleus neuronal activity correlates with behavioral response to acute and chronic doses of methylphenidate (Ritalin) in adolescent rats. *Journal of Neural Transmission.* 2017;124(10):1239-50.
27. Tang Q, Li X, Song P, Xu L. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug discoveries therapeutics.* 2015;9(6):380-5.
28. Niroomand M, Fotouhi A, Irannejad N, Hosseinpanah F. Does high-dose vitamin D supplementation impact insulin resistance and risk of development of diabetes in patients with pre-diabetes? A double-blind randomized clinical trial. *Diabetes research clinical practice.* 2019;148:1-9.
29. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002.
30. Karagiannides I, Pothoulakis C. Neuropeptides, mesenteric fat, and intestinal inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008;1144(1):127-35.

31. Malta A, de Moura EG, Ribeiro TA, Tofolo LP, Abdennebi-Najar L, Vieau D, et al. Protein-energy malnutrition at mid-adulthood does not imprint long-term metabolic consequences in male rats. *Eur J Nutr.* 2016;55(4):1423-33.
32. Bolanos CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry.* 2003;54(12):1317-29.
33. Bethancourt JA, Camarena ZZ, Britton GB. Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. *Behavioural brain research.* 2009;202(1):50-7.
34. Elfers C, Roth C. Effects of Methylphenidate on Weight Gain and Food Intake in Hypothalamic Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2(78).
35. Greeley GH, Jr., Kizer JS. The effects of chronic methylphenidate treatment on growth and endocrine function in the developing rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;215(3):545-51.
36. Korchynska S, Krassnitzer M, Malenczyk K, Prasad RB, Tretiakov EO, Rehman S, et al. Life-long impairment of glucose homeostasis upon prenatal exposure to psychostimulants. *The EMBO journal.* 2020;39(1):e100882.
37. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental molecular medicine.* 2016;48(3):e219-e.
38. Rachdaoui N. Insulin: the friend and the foe in the development of type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences.* 2020;21(5):1770.
39. Imai Y, Cousins RS, Liu S, Phelps BM, Promes JA. Connecting pancreatic islet lipid metabolism with insulin secretion and the development of type 2 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2020;1461(1):53-72.
40. Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JOJAJoP-E, et al. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. 2000;279(4):E875-E85.
41. Ptacek R, Kuzelova H, Paclt I, Zukov I, Fischer S. ADHD and growth: anthropometric changes in medicated and non-medicated ADHD boys. *Med Sci Monit.* 2009;15(12):CR595-9.
42. Bosomworth NJ. Normal-weight central obesity: Unique hazard of the toxic waist. *Canadian Family Physician.* 2019;65(6):399-408.

**Keywords:** metabolic programming; methylphenidate; insulin resistance.



## **LOW PROTEIN DIET DURING PERI-PUBERTAL LIFE PROGRAMS TO CARDIAC HYPERTROPHY AND RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM DYSFUNCTION IN MALE ADULT RATS**

**Anna Rebeka Oliveira Ferreira<sup>1</sup>; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro<sup>1</sup>; Maria Natalia Chimirri Peres<sup>1</sup>; Guilherme Bernardo Cornélio Coelho<sup>1</sup>; Mariane Carneiro<sup>2</sup>; Letícia Ferreira Barbosa<sup>3</sup>; Gabriel Kian Guimarães Lopes<sup>3</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>4</sup>; Paulo Cezar de Freitas Mathias<sup>5</sup>; Kesia Palma-Rigo<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Postgraduate Student (doctorate degree), Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>2</sup> Postgraduate Student (doctorate degree), Cell Biology Program, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>3</sup>Graduate Student in Biochemistry, Laboratory of Secretion Cell Biology, State University of Maringa, Maringa, PR

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

<sup>5</sup>Professor, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, State University of Maringa, Maringa, Maringa, PR

e-mail: anna.rebeka108@gmail.com

### **1.INTRODUCTION**

The World Health Organization (WHO) estimated that, in 2021 there were 1.28 billion hypertensive people in the world predisposing this population to stroke, myocardial infarction, heart failure and renal failure (1). In 2019, 17.9 million people died from cardiovascular disease, with over three-quarters of these individuals being based in low- and middle- income countries (2). The projection for 2030 is that approximately 23.3 million people will die from cardiovascular disease across the globe, reinforcing the fact that hypertension is a public health problem associated with vast social and economic consequences (3).

Among the regulatory systems that may be acting in the maintenance of hypertension, we can highlight the renin angiotensin system (RAS) which acts both in the regulation of blood pressure and electrolyte balance. Angiotensin 2 (Ang 2) is the main effector of the RAS. It is produced by the enzymatic cascade reaction where renin is the key enzyme that cleaves the angiotensinogen produced in the liver generating angiotensin 1 (4). Angiotensin converting enzyme (ACE) cleaves angiotensin 1 producing Ang 2, which binds to the angiotensin subtype 1 receptor (AT1). Activation of this receptor is related to hypertension, due to its vasoconstrictor role, regulation of sodium and water retention increasing blood volume through aldosterone, and its action by increasing sympathetic activity (4).

There is now clear evidence that environmental insults, including dietary restriction or imbalance, during sensitive windows of development increases the susceptibility to noncommunicable chronic diseases in adulthood, including hypertension (5, 6). This concept, termed the Developmental Origins of Health and Disease, or developmental programming is not new, however the mechanisms underpinning the programming of hypertension are still being elucidated.

Post-weaning until the end of adolescence has also been established as a critical window of development. We have previously demonstrated metabolic dysfunction in adult animals exposed to dietary protein restriction during puberty/adolescence (7-9). Furthermore, experimental studies in models of malnutrition in post-weaning/peri-puberty indicate that hypertension (10-13), vascular sympathetic hyperactivity (14) and increase activity of renin angiotensin system (15) occur immediately after the exposure period, and these may be associated with a central glutamate disorganization (16). However, the long-term cardiovascular dysfunction and activity of renin angiotensin system in this model have not yet been evaluated, pointing to a gap in the literature concerning the programming of hypertension induced by insults during adolescence or the peri-pubertal period. The hypothesis of this study is that hypertension and cardiac remodeling caused by a low protein diet during adolescence may be dependent on renin-angiotensin system dysfunctions.

## 2. METHODS

The experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee for Animal Use and Experimentation at the State University of Maringa (protocol number 3353060421). Male Wistar rats were obtained from the Central Animal Facility of the State University of Maringa and kept in the Sectorial Vivarium of the Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology for adaptation for five days.

At post-natal day (PN) 30 animals were assigned into two groups; those fed an isocaloric low-protein diet palletized (4% protein; LP) or a balanced commercial control diet (20.5% protein; Nuvital®, Curitiba / PR, Brazil; NP) until PN60. After the dietary manipulation period, from PN60 until PN120, all animals were fed the same commercial control diet (20.5% protein; Nuvital®, Curitiba / PR, Brazil).

At PN120 both groups underwent evaluation of the peripheral renin angiotensin system and cardiovascular parameters.

### 2.1. Arterial and venous catheterization

After anesthesia (ketamine-xylazine; 75mg + 15mg / kg, i.p.) two cannulae (P10 -Micro-Renathane connected to P50 cannulae (ClearTygon) were inserted; one into the femoral artery, for monitoring of arterial pressure, and one in the femoral vein, for drug administration. At the end of surgeries, animals received anti-inflammatory analgesic (Meloxicam, 0.4mg / kg, i.v.) and antibiotic (Enrofloxacin 5mg / kg, i.v.) cover, the lines were heparinized (250 units/mL) after arterial catheter implantation and animals kept in individual boxes for recovery (17-19). After 48 hours of recovery, the protocol for assessment of cardiovascular function and peripheral renin angiotensin system was carried out over for a period of three days.

### 2.2. Echocardiography

At PN120, a cohort of animals was anesthetized with thiopental (40mg/kg) and submitted to transthoracic echocardiography using an ultrasound system equipped with a 12 MHz transducer. Left ventricular (LV) internal diameters, interventricular septum thickness, and LV posterior wall thickness were analyzed in diastole and systole. Ejection fraction and fractional shortening were calculated through algorithms of the equipment software. All parameters were measured at least three times per animal and was compared between the groups.

### 2.3. Peripheral renin angiotensin system

After cannulation, as described in item 2.1., the function of renin-angiotensin system was evaluated through drugs that stimulate or inhibit the system. After 48 hours of surgery, the animals were submitted to a three-day experimental protocol. On the first day, blood pressure was evaluated under baseline conditions, followed by the evaluation of the angiotensin conversion function with the enzyme inhibitor (ACE) enalapril (5 mg/kg, i.v.). Recording was continued for at least 30min after the injection.

On the second and third days of the protocol, the mean arterial pressure (MAP) was evaluated with increasing doses of Ang II. After stabilization, each rat received two doses of Ang II (50, 200, 300 and 400 ng/kg, i.v.) and recordings continued for at least 30 minutes after the injection (15).

On the third day of the protocol, an intravenous injection of a ganglion blocker, hexamethonium (30 mg / kg, i.v.), was performed and after five minutes the AT1 receptor antagonist losartan was applied (10 mg/kg, i.v.), to evaluate the RAS function over MAP for 30 minutes (15, 20).

### 2.4. Statistical analysis

The data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Results are considered significant when  $P < 0.05$ . GraphPad Prism 8 was used for graphical representation and statistical analysis. The comparison between the groups was performed using the Student's T test.

## 3. RESULTS

Animals given a low protein diet during peri-puberty showed an increase in MAP (+15%,  $p = 0.047$ ; Fig. 1A). There was no significant difference in heart rate (HR) between groups (Fig. 1B).

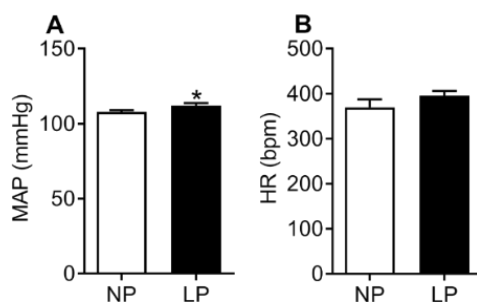
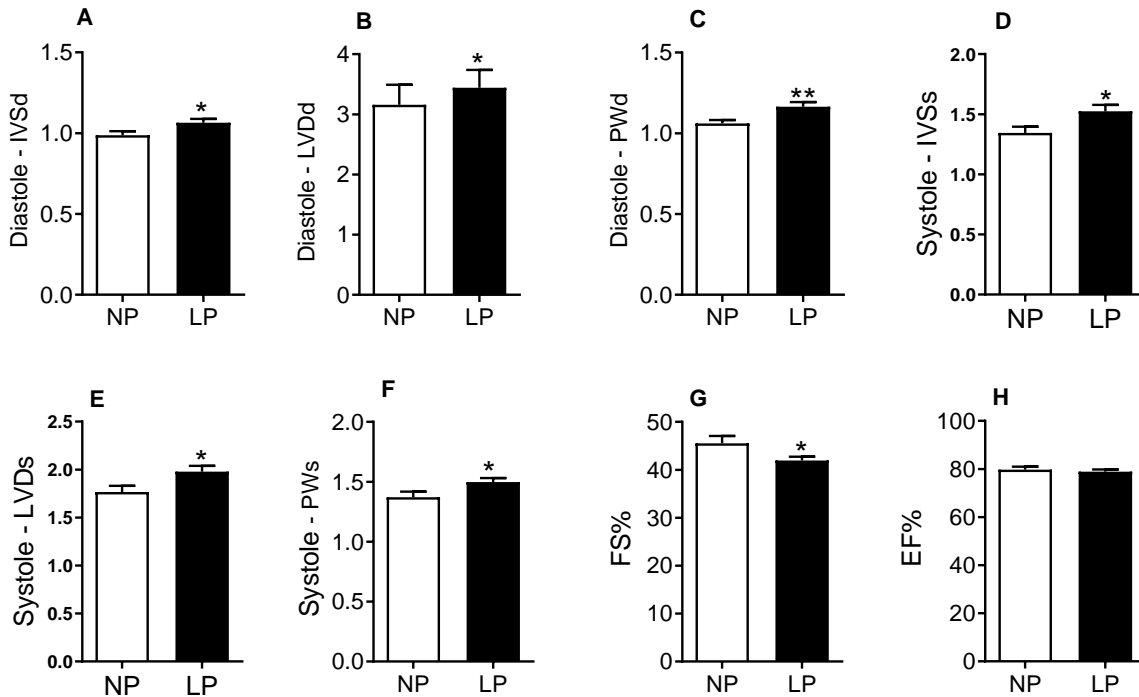


Figure 1 – Basal arterial pressure in 120 days old animal.



Mean arterial pressure (A) and heart rate (B) at basal condition. NP, normal protein diet; LP, low protein diet. Values presented as mean  $\pm$  SD \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 indicate statistical significance (Student's T test).

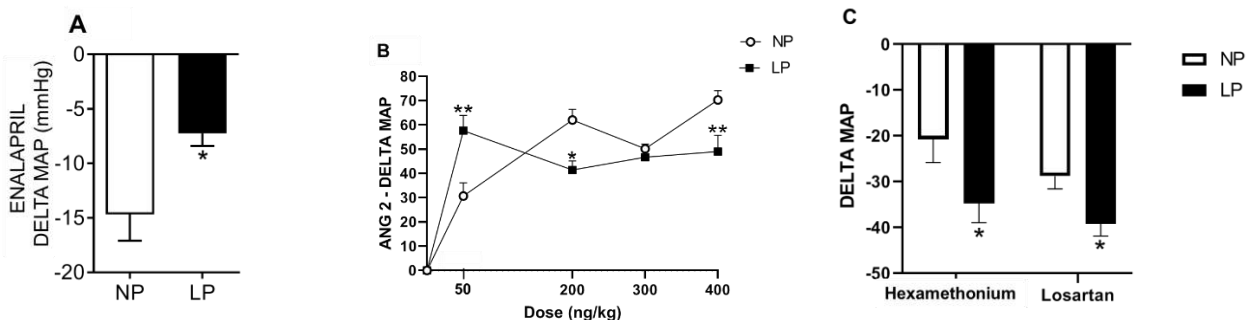
In the echocardiogram, the left ventricle in diastole and systole, respectively showed an increase in the interventricular septum (IVS) (+8%, p=0.040; Fig. 2A and +13%, p=0.026; Fig. 2D), in the diameter (LVD) (+8%, p=0.012; Fig. 2B and +11%, p=0.023; Fig. 2E), and in the posterior wall (PW) (+9%, p=0.08; Fig. 2C and +9%, p=0.028; Fig. 2F) of LP animals compared with control animals. The evaluation of the functional parameter shows that the LP group have a decrease in fractional shortening (FS) (-8%, p=0.033; Fig. 2G) without significant difference in ejection fraction (EF) between groups (Fig. 2H).



**Figure 2 – Echocardiogram.**

Interventricular septum in diastole and systole (A) and (D), diameter in the left ventricle in diastole and systole (B) and (E), posterior wall in the left ventricle (C) and (F), fractional shortening (G) and ejection fraction (H). NP, normal protein diet; LP, low protein diet. Values presented as mean  $\pm$  SD \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05 indicate statistical significance (Student's T test).

LP animals showed a greater decrease in MAP following enalapril and angiotensin converting enzyme inhibitor (-50%, p = 0.015; Fig. 3A). The angiotensin 2 dose response curve shows that the LP animals have an increased pressor response to angiotensin 2 at the low dose (50 ng/Kg) (+90%, p=0.007; Fig. 3B), with a reduction in the pressor response at the intermediary dose (200 ng/Kg) (+66%, p=0.219; Fig. 3B) and high dose (400 ng/Kg) (+70%, p=0.015; Fig. 3B). In the depressor response to hexamethonium and losartan, the LP group showed a greater decrease in MAP respectively (-80%, p=0.296 and -40%, p=0.190, Fig. 3C)



**Figure 3 – Evaluation of the renin-angiotensin system.**

Representative of the depressor response to enalapril, change in mean arterial pressure (A), pressure response to angiotensin 2 (B) and depressor response to hexamethonium and losartan. NP, normal protein diet; LP, low protein diet. Values presented as mean  $\pm$  SD \*\*\* p <0.001, \*\* p <0.01, \* p <0.05 indicate statistical significance (Student's T test).

#### 4. DISCUSSION

This work demonstrates that dietary protein restriction in peri-pubertal period followed by 60 days of nutritional recovery results in hypertension and cardiac morphological and functional impairment in young adulthood which appears to be underpinned by increased activity of the renin-angiotensin system. And this dysfunction may be to the maintenance of hypertension in adulthood.

Rat models programmed to protein restriction during peri-pubertal evaluation after insult indicate that hypertension (10-13) and vascular sympathetic hyperactivity (14) occur immediately after the exposure period. Furthermore, in this model, the increase in blood pressure is related to increased activity of the renin-angiotensin system, with an increased response to angiotensin 2 at low doses and with a saturation response at high doses, evidencing that these animals may have saturation of the angiotensin 2 receptor response. This profile increased the activation of this system may begging right after the insult in adolescence and remained until adulthood (15).

This increase in the response of the renin-angiotensin system via AT1 receptor in these animals may be acting to maintain the increase in blood pressure. Among the mechanisms that may contribute, greater activation of Angiotensin II receptor type 1, both peripherally, such as in the aorta and heart, and centrally by the central regulation of blood pressure, through a deregulation of glutamate (an excitatory neurotransmitter of the nervous system) in the RVLM (16) or nucleus of the solitary tract (NTS) (21) or due to an increase a activation of the RAS components (15, 22, 23) that cloud be related to sympathetic hyperactivity in this model, as previously described (9).

The renin-angiotensin system may also be contributing to increased morphological and functional cardiac overload of the heart, evidenced in the echocardiogram, as the heart also has local components responsible for the production of angiotensin 2 (24). In LP programming models an increase in plasma and left ventricular angiotensin 2 was also found (25) and an increase in AT1 expression in the left ventricle (26, 27), which may be associated with increase remodeling heart in these animals.

#### 5. CONCLUSION

Protein restriction in peri-pubertal phase leads to hypertension and cardiac morphological and functional impairment in adulthood, which may depend on the renin-angiotensin system.

#### FUNDING

CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) (grant number 500698/2013-9, 400762/2014-5) and grant JBS (José Batista Sobrinho).

#### REFERENCES

1. WHO. Hypertension 2021 [updated 25 August 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.
2. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) 2021 [updated 11 June 2021. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
3. Mathers CD, Loncar DJPm. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. 2006;3(11):e442.
4. Irigoyen MC, Consolim-Colombo FM, Krieger EM. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. Rev Bras Hipertensão. 2001;8(1):55-62.
5. Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. Acta paediatrica. 2004;93(446):26-33.
6. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. International journal of epidemiology. 2002;31(6):1235-9.
7. de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. The Journal of endocrinology. 2013;216(2):195-206.
8. de Oliveira JC, de Moura EG, Miranda RA, de Moraes AMP, Barella LF, da Conceicao EPS, et al. Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. The Journal of endocrinology. 2018;237(3):243-54.
9. Ferreira ARO, Ribeiro MVG, Peres MNC, Piovani S, Gonçalves GD, Saavedra LPJ, et al. Protein Restriction in the Peri-Pubertal Period Induces Autonomic Dysfunction and Cardiac and Vascular Structural Changes in Adult Rats. Frontiers in Physiology. 2022:663.
10. Murca TM, Magno TS, De Maria ML, Capuruco CA, Chianca DA, Jr., Ferreira AJ. Cardiac responses of rats submitted to postnatal protein restriction. Appl Physiol Nutr Metab. 2012;37(3):455-62.

11. Penitente AR, Fernandes LG, Cardoso LM, Silva ME, Pedrosa ML, Silva AL, et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sci.* 2007;81(7):609-14.
12. Penitente AR, Novaes RD, Silva ME, Silva MF, Quintao-Junior JF, Guatimosim S, et al. Basal and beta-adrenergic cardiomyocytes contractility dysfunction induced by dietary protein restriction is associated with downregulation of SERCA2a expression and disturbance of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> regulation in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(2):443-54.
13. Loss IdO, Fernandes LG, Martins CD, Cardoso LM, Silva ME, Dias-da-Silva VJ, et al. Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. 2007;81(11):944-50.
14. Martins CD, Chianca DA, Jr., Fernandes LG. Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38(2):89-93.
15. Gomide JM, de Menezes RC, Fernandes LG, Silva FC, Cardoso LM, Miranda PH, et al. Increased activity of the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems is required for regulation of the blood pressure in rats fed a low-protein diet. *Exp Physiol.* 2013;98(1):57-66.
16. Rodrigues FA, Chianca DA, Jr., Goncalves Fernandes L. Malnutrition affects the pressor response to microinjection of L-glutamate into the RVLM of awake rats. *Biol Res.* 2012;45(4):337-43.
17. Simas BB, Nunes EA, Crestani CC, Speretta GF. Cardiovascular and metabolic consequences of the association between chronic stress and high-fat diet in rats. *Stress.* 2018;21(3):247-56.
18. Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD.* 2015;25(1):123-30.
19. Paulino-Silva KM, Costa-Silva JH. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(11):1046-53.
20. Barros MAV, de Brito Alves JL, Barros RGN, Santana ESM, Nasser S, Tourneur Y, et al. Effects of maternal protein restriction on central and peripheral renin-angiotensin systems in male rat offspring. *Life Sci.* 2020;263:118574.
21. Rodrigues-Barbosa MC, Carneiro CM, de Oliveira LB, Silva FC, Xavier CH, Goncalves Fernandes L, et al. Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex. *Brain Res.* 2012;1483:20-30.
22. Silva RB, Mesquita FF, Andreo M, Assalin HB, Ant J, Boer PA. Effect of gestational protein restriction on left ventricle hypertrophy and heart angiotensin II signaling pathway in adult offspring rats. *Health.* 2013;5: 78-84.
23. Watanabe IKM, Jara ZP, Volpini RA, Franco MDC, Jung FF, Casarini DE. Up-regulation of renal renin-angiotensin system and inflammatory mechanisms in the prenatal programming by low-protein diet: beneficial effect of the post-weaning losartan treatment. *J Dev Orig Health Dis.* 2018;9(5):530-5.
24. Oigman W, Neves MFT. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens.* 2000;3: 261-7.
25. Ren XS, Ling L, Zhou B, Han Y, Zhou YB, Chen Q, et al. Silencing salusin-beta attenuates cardiovascular remodeling and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep.* 2017;7:43259.
26. Silva RB, Mesquita FF, Andreo M, Assalin HB, Ant J, Boer PA. Effect of gestational protein restriction on left ventricle hypertrophy and heart angiotensin II signaling pathway in adult offspring rats. *Health.* 2013;5: 78-84.
27. da Costa TSR, Masson GS, Eichler R, Silva JCS, Lacchini S, Michelini LC. Training-Induced Deactivation of the AT1 Receptor Pathway Drives Autonomic Control and Heart Remodeling During the Transition From the Pre- to Hypertensive Phase in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ J.* 2020;84(8):1294-303.

**Keywords:** diet, protein-restricted; angiotensin 2; hypertension.



# **CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DE PACIENTES ADULTOS INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL MARINGÁ (HUM) COM SUSPEITA DE COVID-19 EM DIFERENTES MOMENTOS DA PANDEMIA**

**Isis Aleixo Barone Esquiçati<sup>1</sup>; Thais Sena de Paula Domingues<sup>2</sup>; Hellen Carla Rickli<sup>3</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>4</sup>; Vânia Ramos Sela da Silva<sup>4</sup>; Edson Roberto Arpini Miguel<sup>5</sup>; Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>4</sup>.**

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

<sup>2</sup>Estatística, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós-Graduação 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 Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: isisaleixobarone@gmail.com

## **1. INTRODUÇÃO**

A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) é uma síndrome respiratória viral infecciosa causada por vírus influenza e outros agentes etiológicos, como o vírus sincicial respiratório (VSR), parainfluenza e adenovírus, que infectam o trato respiratório superior. Os pacientes infectados apresentam um quadro gripal associado à dispneia ou taquipneia ou hipoxemia, com saturação de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) < 95% em ar ambiente. O monitoramento epidemiológico de SRAG no Brasil foi criado em 2009 por meio da vigilância epidemiológica com o preenchimento das fichas de notificação através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe), por parte das unidades hospitalares sentinelas distribuídas em todo o país (1). Preconizava inicialmente a vigilância da pandemia de influenza pelo vírus H1N1, mas se aperfeiçoou e incorporou o acompanhamento de outros vírus respiratórios, aumentando a abrangência da vigilância desde setembro de 2012. Desta forma, os casos de SRAG e óbitos decorrentes devem ser compulsoriamente notificados pelas unidades hospitalares sentinelas.

Em dezembro de 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi informada sobre o aparecimento de casos de pneumonia de causa desconhecida, em Wuhan, China. O agente causal viral foi então isolado e identificado e posteriormente denominado de SARS-CoV-2, devido à sua semelhança genética com o vírus SARS-CoV (responsável pela epidemia de SARS em 2002, também na China). Da China, o vírus rapidamente disseminou-se para outros países e a doença pulmonar causada pelo SARS-CoV-2 recebeu o nome de COVID-19 pela OMS em 11 de fevereiro de 2020, que declarou a doença pulmonar causada pelo SARS-CoV-2 (COVID-19) como pandemia em 11 de março de 2020. Aproximadamente 80% dos pacientes com COVID-19 apresentam doença leve, 15% doença grave e 5% doença crítica, sendo que a SRAG constitui um dos principais desfechos relacionados aos casos graves e críticos. Os pacientes que foram hospitalizados com COVID-19, cerca de um quarto daqueles com quadro grave morrem e fatores de risco como idade, obesidade, sexo masculino, gestação, imunossupressão e comorbidades estão associados a resultados adversos. Porém, os grandes estudos de coorte publicados de pacientes com COVID-19 grave normalmente não têm um grupo de comparação ou controle (2-10). Sendo assim, considerando as possíveis mudanças no contexto da SRAG após o surgimento da pandemia de COVID-19, em diferentes cenários vacinais e com diferentes variantes virais, muitas questões de extrema importância permanecem sem resposta. Para auxiliar na busca de respostas à estas importantes questões, este estudo objetivou examinar e comparar características epidemiológicas e clínicas de pacientes com SRAG suspeitos de COVID-19 internados no Hospital Universitário Regional de Maringá/PR- HUM, em diferentes momentos da pandemia de COVID-19.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1. Critérios de inclusão de casos

Este é um estudo de coorte retrospectiva com base na revisão dos prontuários médicos eletrônicos e ficha de registro individual - CASOS DE SRAG GRAVE HOSPITALIZADO, obtidas via SIVEP Gripe, de pacientes hospitalizados no HUM de Maringá/PR, hospital ensino que atende os 32 municípios da região e sentinela para monitoramento de SRAG. Foram incluídos casos de pacientes adultos ( $\geq 18$  anos) hospitalizados por SRAG nos quais tenha sido realizado teste para SARS-CoV-2 por reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) em swab naso/orofaríngeo, independente de resultado positivo ou negativo, de 16/02/2020 a 30/03/2022. O estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes de boas práticas clínicas e a legislação brasileira sobre pesquisa clínica e proteção de dados (Lei Geral de Proteção de Dados-LGPD, Lei nº 13.709, de 14 de agosto de 2018). A confidencialidade dos pacientes foi protegida pela atribuição de um identificador anônimo para cada participante incluído. Este projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – COPEP/ Universidade Estadual de Maringá (CAAE 50719221.9.0000.0104).

## 2.2. Coleta, agrupamento e análises de dados

Pesquisadores extraíram dados demográficos (faixa etária, sexo, raça/cor, escolaridade), fatores de risco e comorbidades (diabetes, hipertensão, obesidade, outras), sintomas no momento da internação (febre, tosse, saturação  $O_2 < 95\%$ , dispneia), internamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), uso de suporte ventilatório (invasivo e não invasivo), resultado do RT-PCR para SARS-CoV-2 e evolução do caso (alta hospitalar ou óbito).

Com base no resultado do RT-PCR, dados de pacientes COVID-19 positivos e negativos foram comparados nos três subperíodos do estudo, sendo: P1-período de início da pandemia (16/02 a 20/06/2020); P2-pandemia pré-vacinação (21/06/2020 a 16/02/2021); e P3-pandemia com vacinação (17/02/2021 a 30/03/2022). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (*The R Project for Statistical Computing*) e as variáveis categóricas, resumidas em contagens, foram comparadas usando diferenças em proporções com o teste qui-quadrado. As variáveis contínuas, expressas como medianas e intervalos interquartílicos (IQR), foram analisadas usando o teste U de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Características gerais da população incluída

Um total de 1.465 pacientes com SRAG internados no HUM foram incluídos no período proposto no estudo, apresentando as seguintes características: idade média de  $58,43 \pm 19,15$  anos, sendo 682 mulheres e 783 homens. Os 509 (34,7%) casos admitidos em UTI e os 345 (23,5%) que foram a óbito, comparativamente aos que evoluíram para alta hospitalar sem complicações, apresentaram idade média maior ( $62,24 \pm 16,87$  anos vs.  $56,41 \pm 19,97$  anos), maior frequência pacientes a partir de 40 anos, em pessoas do sexo masculino, com diabetes, hipertensão e obesidade.

### 3.2. Características comparativas entre casos de SRAG positivos e negativos para COVID-19

#### 3.2.1. Em todo o período do estudo

Considerando os resultados de RT-PCR para SARS-CoV-2, 739 (50,4%) pacientes apresentaram resultado negativo e 726 (49,6%) resultado positivo.

Comparativamente entre os dois grupos, **pacientes COVID-19 positivo foram associados com:** idade média menor do que dos pacientes negativos, com predomínio na faixa etária de 50-59 anos; escolaridade à nível médio e superior; maior taxa de mortalidade (62%) e de admissão em UTI; febre, tosse, saturação  $O_2 < 95\%$ , dispneia, necessidade de uso de suporte ventilatório (invasivo e não invasivo) e obesidade. Já os **pacientes COVID-19 negativos** foram somente associados com faixa etária de 80 anos ou mais e escolaridade à nível fundamental (2º. Ciclo) (Tabela 1).

#### 3.2.2. Em cada um dos 3 subperíodos do estudo

Considerando cada um dos 3 subperíodos do estudo, no P1 foram incluídos 102 pacientes, 602 no P2 e 761 no P3, com taxas crescentes de positividade para COVID-19, sendo de 25,5%, 47,7% e 54,3%, respectivamente. Comparativamente entre pacientes positivos e negativos para COVID-19 entre os 3 subperíodos, os **pacientes COVID-19 positivos:** no P1, apresentaram idade média menor ( $52,92 \pm 15,60$  anos) que dos negativos ( $57,50 \pm 19,78$  anos) e foram associados com tosse; no P2, idade média ( $59,84 \pm 16,64$  anos) similar à dos negativos ( $60,67 \pm 19,71$  anos) e foram associados com febre, tosse, obesidade e evolução clínica para óbito ( $p = 0,02213$ ). No P3, a idade média ( $55,89 \pm 18,64$  anos) menor que a dos negativos ( $58,89 \pm 20,88$  anos), incidindo principalmente na faixa etária de 50-59 anos, sendo associados com escolaridade à nível de ensino médio, febre, tosse, saturação  $O_2 < 95\%$ , dispneia, mais uso de suporte ventilatório invasivo e não invasivo, obesidade, maior admissão em UTI e evolução clínica para óbito.

Ainda comparativamente entre pacientes positivos e negativos para COVID-19, **pacientes negativos** apresentaram as seguintes associações: no P2, com a faixa etária de 18-29 anos e com outras comorbidades; no P3, menor uso de suporte ventilatório invasivo e não invasivo.

**Tabela 1. Características epidemiológicas e clínicas de pacientes com SRAG hospitalizados no Hospital Universitário Regional de Maringá/PR- HUM de 16/02/2020 a 30/03/2022, conforme o resultado do teste de RT-PCR para SARS-CoV-2.**

Características epidemiológicas	Total	Pacientes positivos para COVID-19	Pacientes negativos para COVID-19	Comparação estatística p-value
<b>Idade média +-SD</b>	58,43±19,15	57,34±17,87	59,50±20,28	0.00671
<b>Faixa etária</b>				0.00000424
18-29 anos	139	59	80	
30-39 anos	160	79	81	
40-49 anos	166	91	75	
<b>50-59 anos</b>	258	<b>161</b>	97	
60-69 anos	261	135	126	
70-79 anos	263	116	147	
<b>80 anos ou mais</b>	218	85	<b>133</b>	
<b>Escolaridade</b>				0.00001415
Analfabeto	133	56	77	
Fundamental 1º ciclo (1ª a 5ª série)	443	219	224	
<b>Fundamental 2º ciclo (6ª a 9ª série)</b>	380	162	<b>218</b>	
<b>Médio (1º ao 3º ano)</b>	228	<b>137</b>	91	
<b>Ensino superior</b>	63	<b>42</b>	21	
<b>Febre</b>				0.00001204
Sim	654	<b>366</b>	288	
Não	810	359	451	
<b>Tosse</b>				0.0000002577
Sim	936	<b>511</b>	425	
Não	527	213	314	
<b>Saturação O<sub>2</sub>&lt; 95%</b>				0.0085
Sim	959	<b>500</b>	459	
Não	505	226	279	
<b>Dispneia</b>				0.0006813
Sim	1058	<b>548</b>	510	
Não	307	178	229	
<b>Obesidade</b>				0.0000807
Sim	163	<b>105</b>	58	
Não	1302	621	681	
<b>Outras comorbidades</b>				0.0000000000000004499
Sim	416	138	278	
Não	1049	588	461	
<b>Internamento UTI</b>				0.0262
Sim	509	<b>273</b>	236	
Não	956	453	503	
<b>Suporte ventilatório</b>				0.0000006437
Invasivo	321	<b>177</b>	144	
Não invasivo	767	<b>407</b>	360	
Não utilização	371	140	231	

<b>Evolução do caso</b>				0.00001341
Cura	883	424	459	
Óbito	345	214	131	

\*Utilização do Teste de Mann-Whitney para análise da idade média dos pacientes e Teste Qui-Quadrado para as outras variáveis.

#### 4. DISCUSSÃO

Até onde sabemos, este é um dos primeiros estudos a examinar e comparar características epidemiológicas e clínicas de pacientes com SRAG internados e suspeitos de COVID-19, em diferentes momentos da pandemia. Os dados foram levantados de pacientes internados no Hospital Universitário Regional de Maringá/PR- HUM, que é um hospital sentinela para monitoramento de SRAG, e evidências importantes foram detectadas.

De maneira geral, a taxa de positividade por RT-PCR para SARS-CoV-2 na população hospitalizada com SRAG deste estudo foi de 49,6%, com crescente positividade do P1, P2 a P3 (25,5%, 47,7% e 54,3%, respectivamente). Desta forma, fica evidente o impacto da COVID-19 na etiologia da SRAG no período avaliado. Porém, não pode ser excluída a hipótese de que alguns desses resultados negativos por RT-PCR para SARS-CoV-2 tenham sido falsos negativos (11). Apesar dessa possibilidade, pacientes RT-PCR positivos comparativamente aos negativos, apresentaram diferenças importantes em aspectos epidemiológicos e clínicos de pacientes hospitalizados por SRAG.

Importante destaque referente aos dados de que pacientes COVID-19 positivo apresentaram-se mais sintomáticos na admissão hospitalar, necessitaram de mais suporte ventilatório não invasivo e invasivo, com maior admissão em UTI e taxa de mortalidade muito superior (62% maior que os negativos). Assim, o número de sintomas na admissão hospitalar parece funcionar como preditivos para SRAG por COVID-19. Ainda, considerando que de maneira geral os pacientes admitidos em UTI e os que foram a óbito apresentaram associação com sexo masculino, diabetes, hipertensão e obesidade, mas aqueles positivos para COVID-19 foram associados apenas com obesidade, este parece ser um fator de risco independente preditivo de agravamento. Finalmente, as taxas de mortalidade de pacientes COVID-19 positivos são superiores aos descritos em grandes estudos de coorte de pacientes hospitalizados por COVID-19, que mostraram que cerca de um quarto dos pacientes com COVID-19 grave morrem (2-10). Porém, estes estudos não incluíram grupo controle, ou seja, pacientes suspeitos de COVID-19 grave, mas que apresentaram resultado negativo por RT-PCR, evidenciando a importante contribuição do presente estudo com dados sólidos sobre a COVID-19.

Considerando cada um dos 3 subperíodos do estudo, apesar das flutuações observadas nas características epidemiológicas e clínicas de pacientes COVID-19 positivo, podem ser destacados alguns pontos mais relevantes: a idade média foi menor no P1 e no P3 e similar no P2 à pacientes negativos, indicando pouca variação etária nos diferentes momentos da pandemia na região do estudo. Ainda, com o passar do tempo entre P1 e P3, além do aumento na frequência de pacientes COVID-19 positivos, como era esperado, cada vez mais sintomas passaram a ser associados com a positividade, sendo que a maior admissão em UTI e a evolução clínica para óbito foram associadas às pessoas com COVID-19 apenas no P3. Esses dados podem ser explicados, ao menos em parte, pelo que segue. Apesar da vacinação para SARS-CoV-2 no Brasil ter iniciado em fevereiro de 2021 em grupos específicos, grande parte dos pacientes do P3 (17/02/2021 a 30/03/ 2022) deveriam estar protegidos e com características clínicas de gravidade, internamento e óbitos menores. Porém, estes dados podem ser explicados pela entrada no país de “variant of concern” (VOC) do SARS-CoV-2, cujo primeiro caso foi detectado em 30 de dezembro de 2020, a partir da detecção do primeiro caso suspeito de uma “variant of concern” (VOC) no Brasil, que podem apresentar aumento da transmissibilidade, agravamento da situação epidemiológica, assim como mudanças epidemiológicas e clínicas da doença (12,13,14).

#### 5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que pacientes hospitalizados com SRAG por COVID-19 apresentaram-se mais sintomáticos na admissão hospitalar, necessitando de mais suporte ventilatório não invasivo e invasivo, com maior admissão em UTI e taxa de mortalidade superior. Esses achados sugerem que pacientes com SRAG negativos para SARS-CoV-2 parecem ter menor risco de agravamento e evolução clínica desfavorável da SRAG. Ainda, a obesidade foi evidenciada como fator de risco independente preditivo de agravamento em pacientes COVID-19 positivos. Conclui-se que nossos dados podem contribuir para monitoramento da vigilância universal de SRAG, ações de planejamento na atenção à saúde e na vigilância epidemiológica.

#### FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Citologia e ISTs, bem como ao HUM da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil Brasília: MS. 2016.
2. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348(20):1953-1966.
3. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003; 361(936):1319-1325.
4. Rodriguez-Morales AJ, Gallego V, Escalera-Antezana JP, Méndez CA, Zambrano LI, Franco-Paredes C, et al. COVID-19 in Latin America: The implications of the first confirmed case in Brazil. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 35(101613).
5. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. [Acesso em 21 Jan 2022]. Disponível em: <https://covid19.who.int/>.
6. World Health Organization. Infection prevention and control during health care when COVID-19 is suspected - Situation Report - 85. [Acesso em Maio 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/situation-report---85>.
7. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with COVID-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ.* 2020; 369: m1985.
8. Suleyman G, Fadel RA, Malette KM, Hammond C, Abdulla H, Entz A, et al. Clinical characteristics and morbidity associated with Coronavirus Disease 2019 in a series of patients in metropolitan detroit. *JAMA Netw Open.* 2020; 3(6): e2012270.
9. Petrilli CM, Jones SA, Yang J, Rajagopalan H, O'Donnell L, Chernyak Y, et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ.* 2020; 369: m1966.
10. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223): 497–506.
11. Menezes MCS, Pestana DVS, Ferreira JC, de Carvalho CRR, Felix MC, Marcilio IO, et al. Distinct Outcomes in COVID-19 Patients with Positive or Negative RT-PCR Test. *Viruses.* 2022;14(2).
12. Layton AT, Sadria M. Understanding the dynamics of SARS- CoV- 2 variants of concern in Ontario, Canada: a modeling study. *Scientific Reports.* 2022; 12(1):2114.
13. Parums, D. V. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) Terminology for Variants of Concern and Variants of Interest of SARS-CoV-2. *Medical Science Monitor.* 2021; 27: e933622.
14. Nishiura H, Ito N, Kobayashi T, Piantham C, Rodríguez-Morales AJ. Relative Reproduction Number of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) Compared with Delta Variante in South Africa. *Journal of Clinical Medicine.* 2022; 11(1):30.

**Palavras-chave:** COVID-19; epidemiologia; fatores predisponentes.





# IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID-19 NA LOGÍSTICA DE MEDICAMENTOS EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO NO NOROESTE DO PARANÁ

Leonardo Martins Perego<sup>1</sup>; Elza Kimura Grimshaw<sup>2</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 Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

E-mail: peregolm@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

A disponibilização de medicamentos hospitalares, desde a compra até a sua utilização, para o cuidado do paciente é uma das atividades fundamentais do serviço de farmácia dentro do hospital. O consumo destes medicamentos apresenta sazonalidade de demanda e de ressuprimento, porém, em situações adversas, podem ocorrer flutuações significativas no consumo, dificultando o planejamento da logística de aquisição de medicamentos hospitalares(1-3).

A pandemia de COVID-19, decretada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no início de 2020, afetou negativamente os sistemas globais de saúde, expondo as fragilidades na prestação de serviços à população (4, 5). No Sistema Único de Saúde (SUS), em seu primeiro trimestre de 2021, pode-se observar que mais da metade das federações brasileiras encontravam-se com taxas de ocupação de leitos de UTI, especificamente para adultos com COVID-19, de pelo menos 90%(6). Este alto índice de ocupação saturou a capacidade de atendimento, refletindo no alto consumo de medicamentos e impactando na aquisição desses produtos(7). No final de setembro de 2021 o estado do Paraná registrava mais de um milhão e meio de casos de covid-19 confirmados e as três regionais de saúde com maior representatividade a esse número foram: 2°. Regional (29,2%), 17° Regional (9,5%) e 15° (8%)(8).

Os hospitais públicos foram os primeiros a serem afetados na aquisição de produtos hospitalares(9, 10), pois dependiam de contratos de licitação realizados antes do início da pandemia e o quantitativo contratado foi completamente consumido logo nos primeiros meses do ano de 2020, gerando a necessidade de realizar dispensa de licitações emergenciais(9, 10). Em virtude das aquisições serem baseados no histórico de consumo anual, houve necessidade da busca por alternativas que pudessem atender de imediato, ao grande número de pacientes infectados com a COVID-19(11).

Em situações de tragédias e emergências, os hospitais públicos são os primeiros a serem acionados e abrigam os pacientes, entretanto, a maioria dos hospitais públicos não estão preparados para enfrentar um aumento súbito da demanda no consumo de medicamentos, e arcar com um custo inesperado e não planejado. Portanto, esse estudo tem por objetivo descrever quanto a pandemia de COVID-19 impactou nos gastos do hospital para garantir o abastecimento de medicamentos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, utilizamos informações do Hospital universitário regional de Maringá, um serviço de saúde público, vinculado a Universidade Estadual de Maringá e com atendimento direcionado as regiões pertencentes a 15° Regional de saúde do estado do Paraná.(12) O período estabelecido para levantamento de dados foi entre Outubro de 2018 à Setembro de 2021. Para a análise dos dados consideramos o período Pré-Pandemia entre os meses de Outubro de 2018 à Março de 2020 e o período Pandemia de Abril de 2020 a Setembro 2021.

As informações de número de atendimentos hospitalares divididos por setores e período foram fornecidas pelo serviço de prontuário ao paciente (SPP), setor responsável pelo controle e monitoramento dos atendimentos do hospital. Os dados de gastos com medicamentos foram obtidos através do relatório "Dispensado com valor" utilizando o filtro "medicamentos" gerado através do "Sistema de gestão hospitalar e ambulatorial (GSUS)" utilizado pelo hospital. Os valores de gastos mensais foram divididos pela média da cotação do dólar no respectivo mês(11) para suprimir o efeito da variação cambial sobre o preço dos medicamentos. Para os dados de consumo dos medicamentos injetáveis que apresentaram dificuldades de aquisição conforme central de abastecimento farmacêutico (CAF) do hospital, foi utilizado o relatório "Livro

de Registro” através do GSUS para cada medicamento.

Os dados foram analisados mediante análise descritiva e apresentado em tabelas e gráficos, utilizando o programa Microsoft Office-Excel para Windows.

Este projeto foi autorizado pela Comissão de Regulamentação das Atividades Acadêmicas (COREA) do hospital universitário de Maringá através da solicitação nº030/2021-COREA.

### 3. RESULTADOS

O gasto mensal com medicamentos mostra um aumento crescente no período de pandemia, representando um aumento equivalente a 41% maior do que no período anterior (Figura 1).

No período pré-pandemia é possível observar uma tendência de aumento do consumo de medicamentos conforme inicia os períodos de outono e inverno, reduzindo conforme a primavera e verão se aproximam. Este padrão não foi observado no período da pandemia, onde houve uma curva crescente independente da chegada do verão. O mês de maior consumo de medicamentos no período pré-pandemia foi o mês de outubro de 2019 com gasto aproximado de \$ 115.000, enquanto que durante a pandemia, o mês com maior gasto foi junho de 2021 no valor aproximado de \$225.000.

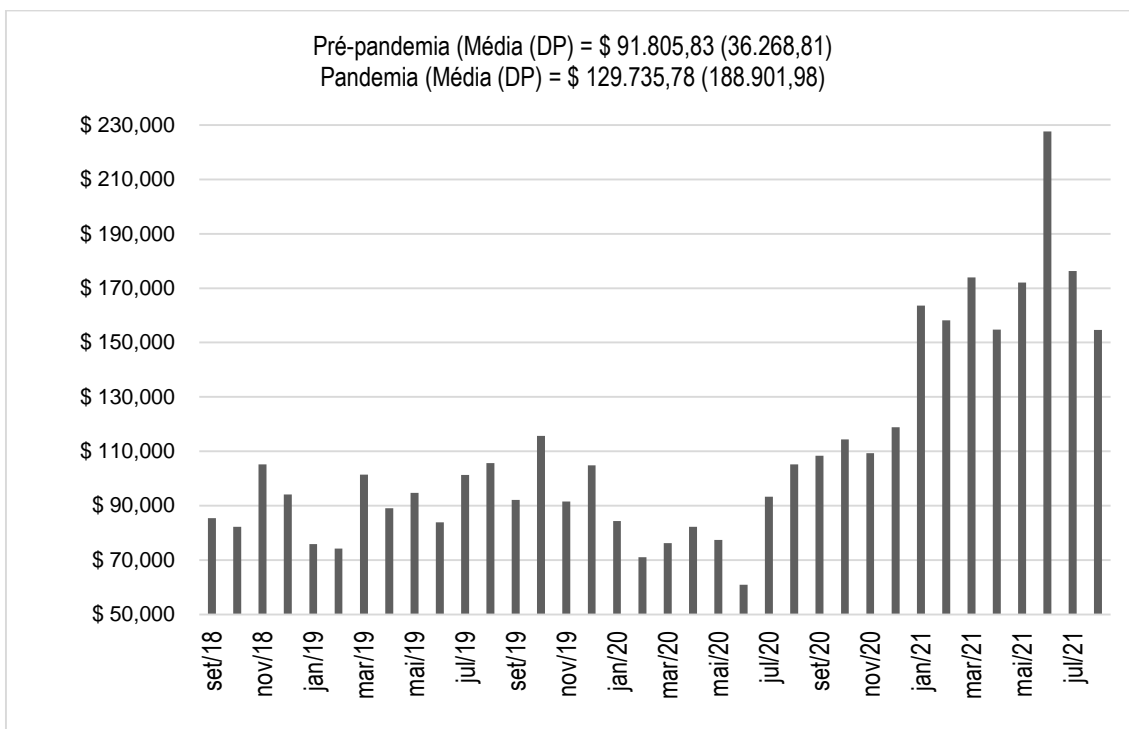


Figura 1. Evolução de gastos com medicamentos

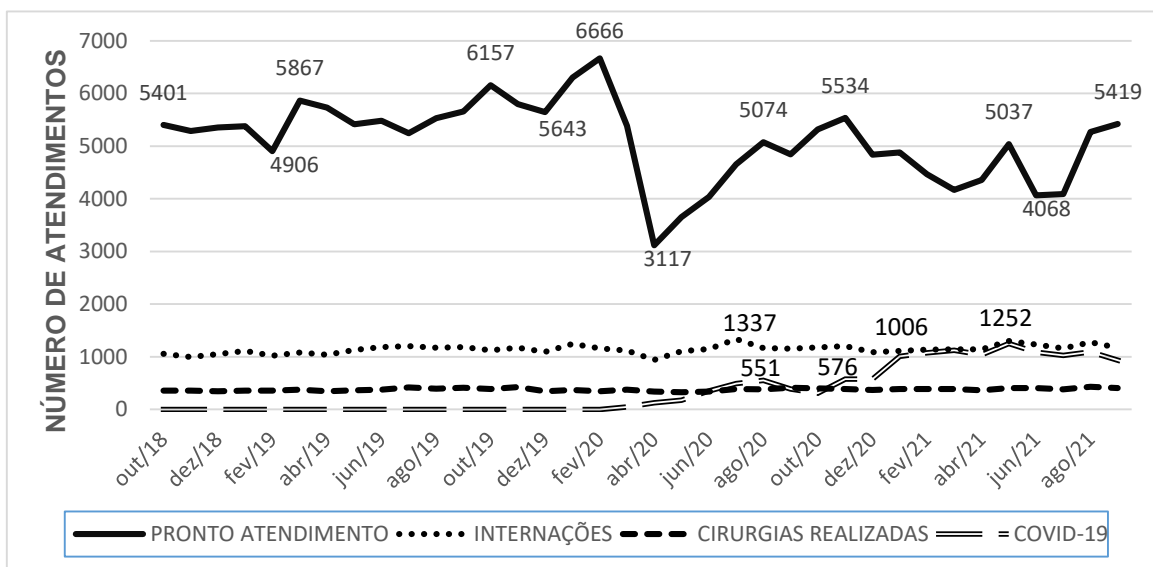


Figura 2. Evolução no número de atendimentos por setores

A partir de Abril de 2020 podemos verificar uma queda nos atendimentos do Pronto Atendimento provavelmente devido às restrições de circulação de pessoas e direcionamento para atendimento apenas emergenciais. Porém, como o número de leitos, nas alas de internação e cirurgias, são limitados, esses se mantiveram estáveis até dezembro de 2020. Após esse período podemos verificar um aumento das internações com o surgimento da ala COVID-19.

**Tabela 1. Atendimentos por setores de internação**

Setores de internação	Pré-Pandemia (Média)	Pandemia (Média)
Enfermarias	1060,11	992,33
UTI Adulto	24,61	52,44
Pronto Atendimento	5625,17	4879,78
UTIs neonatal e pediátrica	34,78	30,67

O aumento no número de pacientes com COVID-19 que precisaram de ventilação mecânica invasiva levou ao aumento no consumo de medicamentos para analgesia e sedação. Os dez medicamentos que tiveram aumento significativo na pandemia estão apresentados na Tabela 2. A análise do consumo médio e a diferença percentual de cada período mostrou um aumento expressivo no consumo de rocurônio, medicamento usado para relaxamento muscular e facilitação na expansão pulmonar e da enoxaparina, para profilaxia de tromboembolismo, visto que a COVID-19 apresentava um alto risco de formação de microtrombos.(13, 14) Observamos que todos os medicamentos analisados apresentaram elevado aumento em seu consumo, destacando os medicamentos utilizados para intubação.

**Tabela 2. Média do consumo e diferença percentual da média de medicamentos injetáveis que apresentaram dificuldades de aquisição na pandemia de COVID-19.**

Medicamentos	Média de Consumo		% de aumento
	Pré-Pandemia	Pandemia	
Rocurônio 10 mg/ mL (5 mL)	38,17	2499,83	6449,80%
Enoxaparina Sódica 20 mg (0,2 mL)	50,89	1176,39	2211,70%
Polimixina B 500.000 UI	53,83	353,78	557,20%
Meropenem 1 g Pó liofil FA	245,61	737,83	200,40%
Midazolam 5 mg/ mL (10 mL)	1771,28	5309,94	199,80%
Dextrocetamina 50 mg/mL (10 mL)	125,06	360,56	188,30%
Norepinefrina, Hemitartrato 2 mg/ mL(4 mL)	1408,67	3713,61	163,60%
Fentanila 0,05 mg/ mL (10 mL)	1812,83	4532,06	150,00%
Omeprazol 40 mg Pó liofil	622,06	1104,44	77,50%
Dexametasona, Fosfato Dissódico 4 mg/ mL (2,5 mL)	443,28	768,17	73,30%

#### 4. DISCUSSÃO

A pandemia de COVID-19 aumentou consideravelmente os gastos com medicamentos na instituição referida. A média de gastos foi 41% maior na pandemia do que no período anterior a esta. Comparado com os dados da Federação Nacional de Saúde Suplementar que apresentou um estudo com aumento no custo de internação de 27%, entre Janeiro de 2021 a Abril de 2021, período considerado pandêmico no presente estudo (15). Este aumento nos custos e recursos foi observado também em países árabes em que o ônus da COVID-19 nos sistemas de saúde, em termos de uso e custos de recursos, foi substancial (16).

Devido às medidas restritivas impostas à população em que só atendimentos de emergência e casos de COVID-19 seriam atendidos nos hospitais, isto provocou uma ligeira queda no número médio total de atendimentos nos meses da pandemia. Verificou-se que, sendo o pronto-atendimento o setor que mais impacta no quantitativo de atendimentos da instituição, nos primeiros meses de pandemia houve considerável queda dos mesmos, mantendo-se em níveis abaixo dos patamares encontrados antes da pandemia. Em contrapartida, no período pandêmico, houve um ligeiro aumento no número de internações e

procedimentos cirúrgicos. Esta mesma tendência foi observada em países como a Holanda (14) onde houve queda no número de pacientes emergenciais com trauma, porém com aumento nas admissões cirúrgicas pelo mesmo motivo(17) e na França houve queda de 47% nas consultas emergenciais(18).

A pandemia aumentou os gastos com os medicamentos chegando a cinco vezes maior da média do custo com medicamentos durante o período analisado. Isso pode caracterizar a dificuldade de planejamento orçamentário diante de tamanha variabilidade no consumo (2, 16). Associado a isso, os dados de consumo das medicações elencadas nos mostram um aumento de pelo menos 70%, chegando a um aumento específico e extraordinário acima de 6000% no uso de rocurônio, demonstrando uma inviabilidade de planejamento causada pela pandemia, uma vez que não se consegue delimitar uma tendência de demanda e tão pouco uma formulação histórica de consumo para futuras projeções.

A apresentação do histórico de consumo e gastos com tratamentos para doenças específicas permitirá ao hospital elaborar um plano de contingência para mitigar os efeitos causados por emergências hospitalares.

Nosso estudo apresenta algumas limitações e que infelizmente, a metodologia desse trabalho não permitiu avaliar, de forma isolada, o custo de um paciente com diagnóstico de COVID-19, bem como se tais pacientes foram mais custosos do que aqueles com diagnóstico de outras síndromes respiratórias agudas. Uma vez que identificamos a influência da situação nos gastos com medicamentos, trabalhos futuros podem examinar suas possíveis causas.

## 5. CONCLUSÃO

A pandemia de COVID-19 gerou aumento de mais de 40% nos gastos com medicamentos no Hospital Universitário Regional de Maringá. Além disso ocorreu 2,13 vezes mais internações de UTI no período. Dentre os medicamentos injetáveis de difícil aquisição, destacamos o aumento de 65,49 vezes no consumo de rocurônio 50mg e 23,11 vezes no consumo de enoxaparina sódica 20mg. Com tudo, grandes foram os desafios na gestão logística de medicamentos enfrentados no hospital

## REFERÊNCIAS

1. Naraiana A. Gerenciamento de estoque em farmácia hospitalar. Santa Catarina: GELOG-UFSC; 2005.
2. Sforsin ACP, Souza FS, Sousa MB, Torreão NKAM, Galembeck PF, Ferreira Paula. Gestão de compras em farmácia hospitalar. Farmácia Brasileira 2012;16(83).
3. Penaforte TR, Forste AC, Simões MJ. Evaluation of the performance of pharmacists in terms of providing health assistance at a university hospital. Clinics (Sao Paulo). 2007;62(5):567-72.
4. World Health Organization. Clinical management of COVID-19: living guidance. 2021.
5. Lear-Claveras A, Oliván-Blázquez B, Clavería A, Couso-Viana S, Botaya RM. Analysis of Clinical Parameters, Drug Consumption and Use of Health Resources in a Southern European Population with Diabetes That Did Not Contract COVID-19: A Longitudinal Big Data Study. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(11).
6. Cruz FO. Boletim Observatório COVID-19. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2021. p. 22.
7. Pulk RA, Leber M, Tran L, Ammar M, Amin N, Miller L, et al. Dynamic pharmacy leadership during the COVID-19 crisis: Optimizing patient care through formulary and drug shortage management. Am J Health Syst Pharm. 2020;77(22):1874-84.
8. Secretaria de Estado de Saúde do Paraná. Informe epidemiológico, Coronavírus (Covid-19). [Internet]. 2021 [Acesso em 19 ago 2022]. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Coronavirus-COVID-19>
9. Brasil. LEI Nº 13.979, DE 6 DE FEVEREIRO DE 2020. Dispõe sobre as medidas para enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do coronavírus responsável pelo surto de 2019. Brasília-DF: Diário oficial da união; 2020.
10. Souza CL, Land MGP. ESTRATÉGIAS DE GESTÃO DE ESTOQUE HOSPITALAR EM ORGANIZAÇÕES PÚBLICAS NO BRASIL: UM ESTUDO DE CASO. RAHIS-Revista de Administração Hospitalar e Inovação em Saúde. 2020;17(3):64-81.
11. Bermejo-Vicedo T, Queralt Gorgas M. COVID-19 Pandemic. New challenge for hospital pharmacy services. Farm Hosp. 2020;44(7):3-4.
12. Secretaria de Estado de Saúde do Paraná. Regionais de saúde. [Internet]. 2022 [Acesso em 19 ago 2022]. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Regionais-de-Saude>.
13. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020;395(10223):497-506.

14. World Health Organization. COVID-19 clinical management: living guidance, 25 January 2021. Geneva: World Health Organization; 2021 2021. Contract No.: WHO/2019-nCoV/clinical/2021.1.
15. Suplementar AFNdS. Covid-19 causa aumento de até de 5.275% nos custos dos planos de saúde com medicamentos de intubação. <https://fenasaude.org.br/noticias/covid-19-causa-aumento-de-ate-de-5-275-nos-custos-dos-planos-de-saude-com-medicamentos-de-intubacao>.  
html#:~:text=A%20quantidade%20m%C3%A9dia%20comprada%20para,para%20os%20planos%20disparar%205.275%25. 2021.
16. Khan AA, AlRuthia Y, Balkhi B, Alghadeer SM, Temsah M-H, Althunayyan SM, et al. Survival and Estimation of Direct Medical Costs of Hospitalized COVID-19 Patients in the Kingdom of Saudi Arabia. International journal of environmental research and public health. 2020;17(20):7458.
17. van Aert GJJ, van der Laan L, Boonman-de Winter LJM, Berende CAS, de Groot HGW, Boele van Hensbroek P, et al. Effect of the COVID-19 pandemic during the first lockdown in the Netherlands on the number of trauma-related admissions, trauma severity and treatment: the results of a retrospective cohort study in a level 2 trauma centre. BMJ open. 2021;11(2):e045015-e.
18. Montagnon R, Rouffilange L, Agard G, Benner P, Cazes N, Renard A. Impact of the COVID-19 Pandemic on Emergency Department Use: Focus on Patients Requiring Urgent Revascularization. The Journal of emergency medicine. 2021;60(2):229-36.

**Palavras-chave:** farmácia hospitalar; medicamentos; covid-19.



## OPTIMIZATION OF COVID-19 VACCINATION POINTS IN PARANÁ USING SPATIAL ANALYSIS

**Lincoln Luís Silva<sup>1</sup>; Thiago Augusto Hernandez Rocha<sup>2</sup>; Luciano de Andrade<sup>3</sup>; Catherine Ann Staton<sup>4</sup>; João Ricardo Nickenig Vissoci<sup>4</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Post-Graduation Student (PhD candidate), Post-Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>2</sup>Pan American Health Organization (PAHO), Washington D.C

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

<sup>4</sup>Faculty, Department of Surgery, Duke University, Durham, North Carolina

<sup>5</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: sirlincolnls@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the causative agent of COVID-19 that caused the death of millions of people and left several hospitals in critical condition around the world (1). In 2022, more than six million deaths have already been reported (2), of which 677 thousand occurred in Brazil (3). To mitigate the progress of cases and, consequently, the number of deaths, several measures were adopted, such as the use of masks, mass testing, and social distancing (4). But these actions only partially helped the problem, and only the large-scale vaccination appeared to be the solution to the problem (4). Some vaccines against COVID-19 have been authorized for human use. However, they need to be properly distributed to achieve control of COVID-19 (5).

In addition, to achieve this goal, it is necessary that people vaccination coverage is between 70 and 75%, depending on the vaccine's effectiveness (6). Vaccination coverage is the proportion of the target population that is vaccinated, and is considered an important indicator of the performance of national health and immunization systems (7). Vaccination coverage stands out for the benefits it brings to socioeconomic determinants (8), such as: its contributions to increased children's school attendance and educational performance, increases in family income and, ultimately, greater national economic growth (9). However, vaccination coverage depends on coordinated strategic planning combining forces from federal government, health professionals, and public managers to be functional.

Recently, some countries have shown interest in the use of Geographic Information Systems (GIS) to support the development of strategies that optimize vaccination sites (10, 11). The use of GIS tools has played a critical role in understanding the spatial clustering and transmission trend of COVID-19 (12), distribution of hospital beds (13), and is being instrumental in real-time case mapping (14). In addition, there are several approaches that can be used to optimize the implementation of vaccination sites in order to increase vaccine coverage, one of which is location-allocation (15), in which the spatial technique seeks to maximize the population that can be served within a limited distance for a number of service locations (15). Therefore, this tool provides theoretical and practical foundations that can help public health managers to better plan the destination of health resources for the population.

Considering the situation of COVID-19 in Brazil, the urgent need for immunization of the Brazilian population, and the use of GIS tools for public health, strategic and coordinated planning is necessary to ensure that vaccination is carried out in an optimized way. Thus, this work proposes a geospatial analysis to verify the optimized number of health facilities needed to serve the largest number of people potentially eligible to be vaccinated against COVID-19 in Paraná, a state in southern Brazil.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Study design**

This is an ecological study with secondary data from people vaccinated against COVID-19 in Paraná - Brazil, in order to locate the vaccination sites and, from there, perform a location-allocation spatial analysis to verify the possibility of new sites to be included to increase vaccination coverage in the state.

### **2.2. Population study**

All persons vaccinated with the first dose of COVID-19 vaccine in the state of Paraná who are registered in the National Immunization Program Information System (SI-PNI) were included in this study. According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), the state of Paraná is located in the southern region of Brazil, with a territorial area of 199 thousand km<sup>2</sup>, divided into 399 municipalities, 22 health regions, and an estimated population of 11.5 million inhabitants (16).

### **2.3. Vaccination sites**

In Brazil, qualified locals for vaccination are in the primary health care network, in which belongs to Basic Health Units (BHU), where they have a room structurally prepared for the application of vaccines (17). In addition, these places have an identification number registered in the National Registry of Health Establishments (CNES), which is informed on the vaccination record of each patient and thus makes it possible to identify the place where each patient was vaccinated.

### **2.4. Spatial analysis**

To verify the number of Basic Health Units needed to serve the largest number of people in the state of Paraná, it was necessary to carry out five steps: first, the locations that were used for vaccination were identified and geolocated, then the distribution of the population was determined, the transport network was extracted to verify the displacement to reach the BHU, and finally the location-allocation analysis to identify new possible places that can increase vaccination coverage.

#### **2.4.1. Geolocation of vaccination sites**

The CNES number of the place where the person was vaccinated was accessed on the CNES website (<https://cnes.datasus.gov.br/>) to obtain the street and municipality to which that establishment belongs. Then, the geographic coordinates of the street were obtained using OpenStreetMap (OSM), a worldwide collaborative base where geographic coordinates are accessible to the public (18).

#### **2.4.2. Population distribution**

The population distribution in Paraná was estimated using Dasymetric modeling from Worldpop in 2021 (19). Dasymetric modeling produces estimates using relationships between population distribution and geographic layers. We then performed a tessellation technique to verify the number of people inside of hexagons with area of 25 km<sup>2</sup>, because hexagons are suitable for reducing sampling bias due to edge effects compared to other shapes (20).

#### **2.4.3. Transportation**

In this work, the terrestrial transport network obtained by OSM (18) was used. This mesh has metadata that provides more reliable navigation results as it contains maximum street speed, and direction.

#### **2.4.3. Location-allocation**

The model was configured to maximize service to the population within 7 minutes of travel towards to the nearest BHU using the transport network. This model maximizes service coverage by minimizing weighted distance and assumes that the population will use the nearest facility (15). The optimization was assayed when the coverage reached its plateau, meaning that addressing more facility would not improve the coverage.

### **2.5. Data collection**

Data on vaccinated patients in Paraná were obtained from the SI-PNI (<https://dados.gov.br/>). Information regarding health facilities is available on the CNES website (<https://cnes.datasus.gov.br/>). The shapefiles used to produce the maps were obtained from the IBGE (16). All data is publicly available and can be accessed without restrictions.

### **2.6. Data analysis**

The social and demographic characteristics of the study population were explored using absolute and relative frequency using R version 4.0 software. For spatial analysis, ArcGIS Pro version 2.9 software was used. For the elaboration of the figures, the software QGIS 3.18 was used.

### **2.7. Ethics**

This study was developed using secondary data without any sensitive information. In addition, all information contained herein is openly available to the public. Therefore, this research did not require the Research Ethics Committee.

### 3. RESULTS

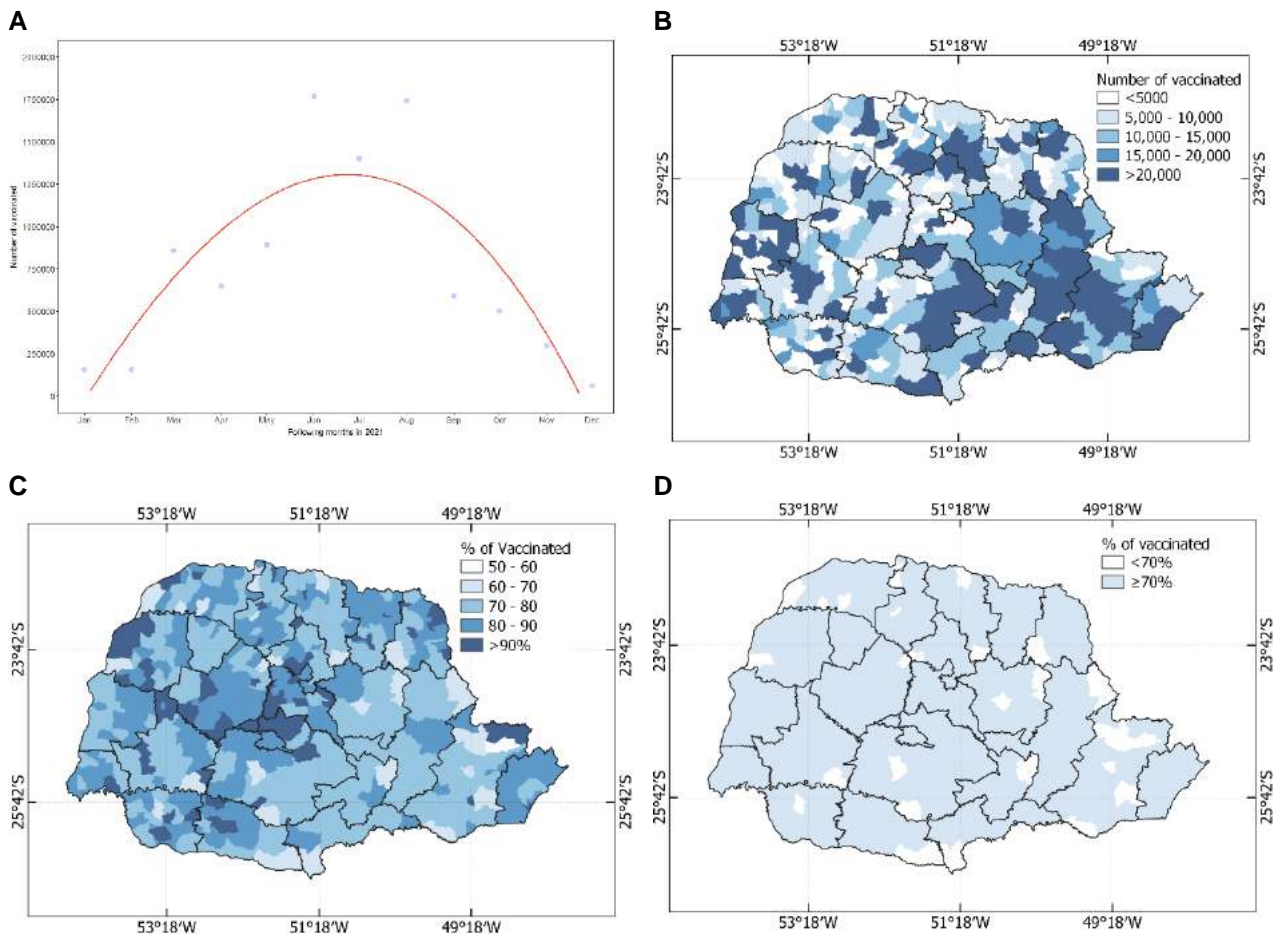
From January 2021 to January 2022, 9,100,843 people in Paraná were vaccinated with the first dose of COVID-19 vaccine. In Paraná, four vaccines from different manufacturers were used: Astrazeneca, representing the majority of those vaccinated with the first dose (38.70%), Pfizer, SINOVAC/Butantan, Janssen. In addition, each of these vaccines represented a different age group vaccinated, which can be explained by the time when a given vaccine was available to be applied and the target population according to the vaccination schedule. Regarding gender, there was a balance between male and female (52.57% vs 47.43%), as for race, most were white (63.51%).

**Table 1. Descriptive analysis of vaccinated people with the first dose against COVID-19 in Paraná, Brazil.**

Characteristic	Overall N = 9,100,843 (100%)	Astrazeneca N = 3,522,094 (38.70%)	Janssen N = 858 (<0.01%)	Pfizer N = 3,379,762 (37.14%)	SINOVAC/Butantan N = 2,198,129 (24.15%)
<b>Median age</b>	40 (26, 56)	51 (39, 59)	38 (29, 46)	27 (18, 40)	46 (29, 71)
<b>Sex</b>					
Female	4,316,276 (47.43%)	1,630,274 (46.29%)	771 (89.86%)	1,687,159 (49.92%)	998,072 (45.41%)
Male	4,784,471 (52.57%)	1,891,799 (53.71%)	87 (10.14%)	1,692,541 (50.08%)	1,200,044 (54.59%)
<b>Race</b>					
Yellow	460,903 (5.06%)	180,478 (5.12%)	50 (5.83%)	166,160 (4.92%)	114,215 (5.20%)
White	5,780,044 (63.51%)	2,243,942 (63.71%)	412 (48.02%)	2,130,838 (63.05%)	1,404,852 (63.91%)
Indigenous	11,766 (0.13%)	614 (0.02%)	0 (0.00%)	2,631 (0.08%)	8,521 (0.39%)
Brown	749,305 (8.23%)	274,141 (7.78%)	66 (7.69%)	298,027 (8.82%)	177,071 (8.06%)
Black	198,877 (2.19%)	80,619 (2.29%)	17 (1.98%)	66,556 (1.97%)	51,685 (2.35%)
Ignored	1,899,863 (20.88%)	742,282 (21.08%)	313 (36.48%)	715,494 (21.17%)	441,774 (20.10%)

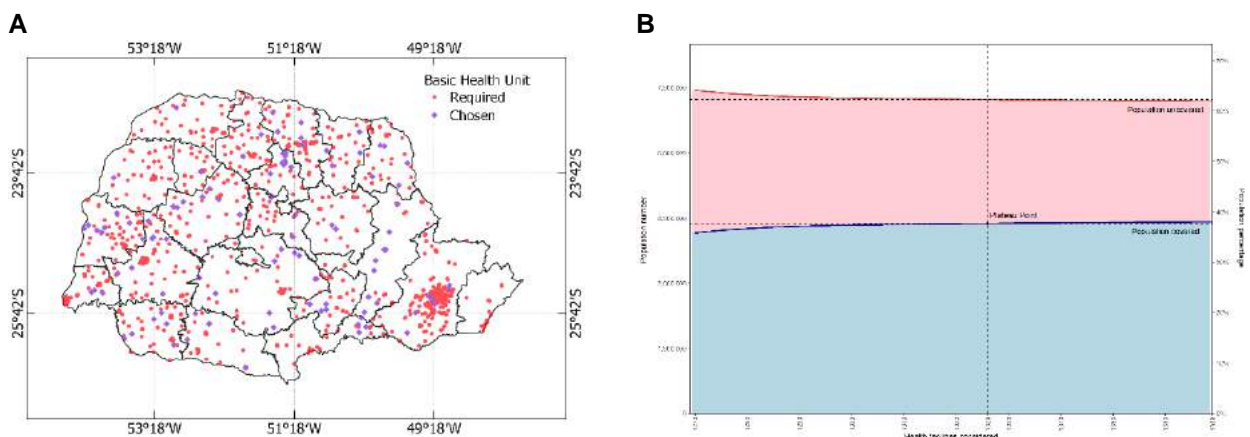
Panel A in Figure 1 shows the monthly evolution of the number of people from Paraná vaccinated with the first dose of COVID-19 vaccine during the year 2021. It is possible to see that June, July and August were the months in which there were the highest number of vaccinated people. Panel B shows the number of people vaccinated by the municipality. All 399 municipalities in Paraná until the end of the study period had cases of first-dose vaccination. C represents the amount of population vaccinated, and D shows the amount of population vaccinated below and above 70% as recommended by the public health managers.

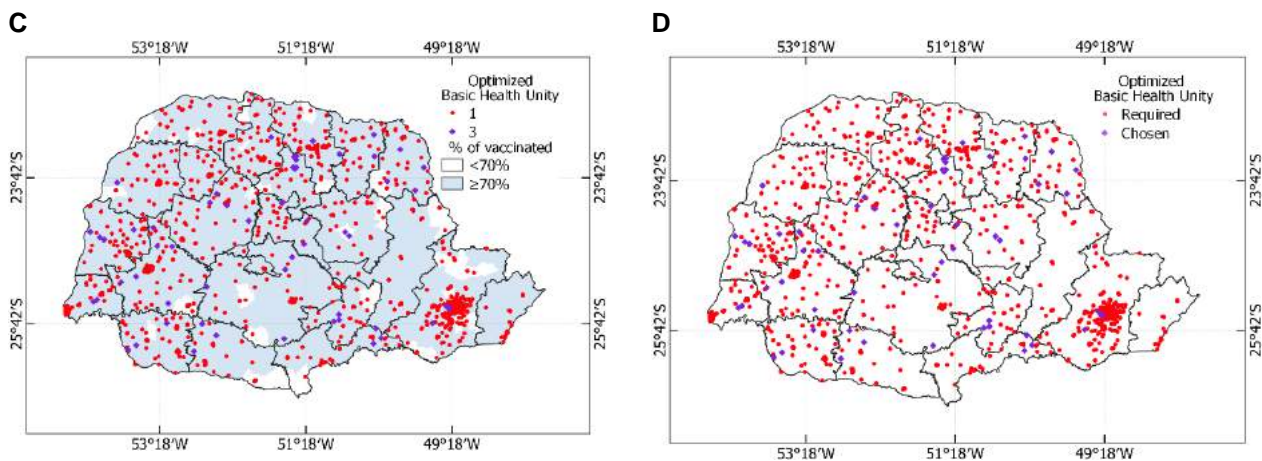




**Figure 1. Panel A shows the timeline of people vaccinated with the first dose of COVID-19 in Paraná in 2021.** The purple circle shows the number of people vaccinated and the red line represents the trend line. Panel B shows the spatial distribution of the vaccinated population. C and D represents the amount of population vaccinated.

Regarding vaccination sites, 1,269 health establishments were used. A total of 100 BHU out of 678 candidates were used to simulate the increase in vaccination coverage. In panel A of Figure 2, it is possible to verify that the BHU already used in the network, and the BHU chosen to join the network. In our model, 56 more BHU were enough to cover the maximum number population in Parana. Therefore, when adding these 56 potential establishments in the vaccination network, the population covered ranged from 35.84% to 37.69%, which represents a gain of 1.85% and covers 214,344 more people (panel B in Figure 2). In panel C we can see the required and chosen BHU overlapping the percentage of people vaccinated. And last, panel D shows the distribution of the health facilities based on the optimized model.





**Figure 2. Distribution of the Optimized Basic Health Unity and municipalities vaccination coverage.**

The red circles in panel A show the Basic Health Units used in the vaccination network, and the purple diamond shows the possible strategic locations to increase vaccination coverage. In B, it shows the number of people covered, uncovered, and the optimized number of basic health units necessary to cover the maximum number of people. In C shows the Basic Health Units required and chosen overlapping the percentage of people vaccinated in each municipality. In D shows the locations of the optimized chosen facilities.

#### 4. DISCUSSION

Vaccination coverage is an indicator used to verify the quality of the vaccination program and access to health care (21). The use of GIS technologies as location-allocation has proved to be an important tool to develop strategies to select new vaccination sites in order to increase vaccine coverage against COVID-19. In this study, for example, the possible recruitment of 100 new Basic Health Units to help the 1,269 establishments already used for vaccine application would contribute to a coverage gain of 2.15%, which would benefit 250,077 people, that is, almost 38 % of the population of Paraná would have access to the vaccine 7 minutes away by car from the nearest UBS.

Access to vaccines is just one of the four pillars that ensure the immunization of the population. The other 3 points involve vaccine development and production, dose acquisition, and distribution (5). The race of countries for immunization is fierce, in which the more developed countries have benefited greatly in relation to the low-income countries, which practically depended on donations (22). Therefore, less developed countries are expected to take longer and face more challenges to immunizing their populations (22).

Although vaccination has been developed as the most effective public health intervention to prevent communicable diseases, save lives, and reduce the burden of disease (23), many people are reluctant to receive the immunizer, as shown in some studies in which about 91.3 % of the adult population in China accepts the vaccine against COVID-19, 64% in the United Kingdom (23), and globally it is around 72% acceptance (24). Therefore, more important than having access to the vaccine, other strategies are essential to encourage vaccination in the population (25).

From the point of view of strategic planning for the expansion of vaccine coverage against COVID-19, GIS technology using location-allocation fulfills its role by providing valuable information for health managers to plan the next steps to implement this tool. However, the participation of other government sectors is important to optimize this resource based on the logistical expenses required in the distribution of vaccines to these new locations.

#### 5. CONCLUSION

Our work detailed the sociodemographic characteristics of people from Paraná vaccinated against COVID-19 and presented 56 more BHU would cover substantially the largest number of people in the state to expand vaccination coverage.

#### FUNDING

CAPES.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Global Emergency Medicine Innovation and Implementation (GEMINI/Duke University), Group of Studies in Digital Technologies and Geoprocessing in Health (GETS/UEM), and Laboratory of Medical Bacteriology (BAC/UEM).

## REFERENCES

1. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020.
2. World Health Organization. Strategic preparedness, readiness and response plan to end the global COVID-19 emergency in 2022. World Health Organization; 2022.
3. Our World in Data. <https://ourworldindata.org> (accessed August 1, 2022).
4. Li Z, Lu J, Lv J. The Inefficient and Unjust Global Distribution of COVID-19 Vaccines: From a Perspective of Critical Global Justice. *Inquiry*. 2021;58:469580211060992.
5. Wouters OJ, Shadlen KC, Salcher-Konrad M, Pollard AJ, Larson HJ, Teerawattananon Y, et al. Challenges in ensuring global access to COVID-19 vaccines: production, affordability, allocation, and deployment. *Lancet*. 2021;397(10278):1023-34.
6. Bartsch SM, O'Shea KJ, Ferguson MC, Bottazzi ME, Wedlock PT, Strych U, et al. Vaccine Efficacy Needed for a COVID-19 Coronavirus Vaccine to Prevent or Stop an Epidemic as the Sole Intervention. *Am J Prev Med*. 2020;59(4):493-503.
7. Utazi CE, Thorley J, Alegana VA, Ferrari MJ, Takahashi S, Metcalf CJE, et al. Mapping vaccination coverage to explore the effects of delivery mechanisms and inform vaccination strategies. *Nat Commun*. 2019;10(1):1633.
8. Sarker AR, Akram R, Ali N, Chowdhury ZI, Sultana M. Coverage and Determinants of Full Immunization: Vaccination Coverage among Senegalese Children. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(8).
9. Mihigo R, Okeibunor J, Masresha B, Mkanda P, Poy A, Zawaira F, et al. IMMUNIZATION AND VACCINE DEVELOPMENT: Progress towards High and Equitable Immunization Coverage in the Africa Region. *J Immunol Sci*. 2018;Suppl(1):1-9.
10. Krzysztofowicz S, Osińska-Skotak K. The Use of GIS Technology to Optimize COVID-19 Vaccine Distribution: A Case Study of the City of Warsaw, Poland. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(11).
11. Ali D, Levin A, Abdulkarim M, Tijjani U, Ahmed B, Namalam F, et al. A cost-effectiveness analysis of traditional and geographic information system-supported microplanning approaches for routine immunization program management in northern Nigeria. *Vaccine*. 2020;38(6):1408-15.
12. Ahasan R, Hossain MM. Leveraging GIS and spatial analysis for informed decision-making in COVID-19 pandemic. *Health Policy Technol*. 2020.
13. Silva LL, de Carvalho Dutra A, de Andrade L, Iora PH, Rodrigues Ramajo GL, Peres Gualda IA, et al. Emergency Care Gap in Brazil: Geographical Accessibility as a Proxy of Response Capacity to Tackle COVID-19. *Front Public Health*. 2021;9:740284.
14. Kamel Boulos MN, Geraghty EM. Geographical tracking and mapping of coronavirus disease COVID-19/severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) epidemic and associated events around the world: how 21st century GIS technologies are supporting the global fight against outbreaks and epidemics. *Int J Health Geogr*. 192020. p. 8.
15. Polo G, Acosta CM, Ferreira F, Dias RA. Location-allocation and accessibility models for improving the spatial planning of public health services. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119190.
16. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Séries estatísticas & séries históricas. Rio de Janeiro. 2018.
17. Souza EL, Eshriqui I, Masuda ET, Bonfim D, Barra RP, Paresque MAC. Diagnosis of vaccination rooms in Brazilian primary health care centers taking part in the PlanificaSUS project, 2019. *Epidemiol Serv Saude*. 2022;31(2):e2022069.
18. Zhang L, Pfoser D. Using OpenStreetMap point-of-interest data to model urban change-A feasibility study. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212606.
19. Tatem AJ. WorldPop, open data for spatial demography. *Sci Data*. 2017;4:170004.
20. Birch CPD, Oom SP, Beecham JA. Rectangular and hexagonal grids used for observation, experiment and simulation in ecology. *Ecological Modelling*. 2007;206(3):347-59.
21. Cutts FT, Claquin P, Danovaro-Holliday MC, Rhoda DA. Monitoring vaccination coverage: Defining the role of surveys. *Vaccine*. 2016;34(35):4103-9.
22. Peacocke EF, Heupink LF, Frønsdal K, Dahl EH, Chola L. Global access to COVID-19 vaccines: a scoping review of factors that may influence equitable access for low and middle-income countries. *BMJ Open*. 2021;11(9):e049505.
23. Ali I, Ali S, Iqbal S. COVID-19 Vaccination: Concerns About Its Accessibility, Affordability, and Acceptability. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:647294.
24. Kelly BJ, Southwell BG, McCormack LA, Bann CM, MacDonald PDM, Frasier AM, et al. Predictors of willingness to get a COVID-19 vaccine in the U.S. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):338.
25. Muhoza P, Danovaro-Holliday MC, Diallo MS, Murphy P, Sodha SV, Requejo JH, et al. Routine Vaccination Coverage - Worldwide, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021;70(43):1495-500.

**Keywords:** COVID-19; spatial analysis; epidemiology.



# ASSOCIATION OF *HLA* GENE POLYMORPHISM WITH COVID-19: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Victor Hugo de Souza<sup>1</sup>; João Vitor Perez de Souza<sup>1</sup>; Joana Maira Valentini Zacarias<sup>2</sup>; Quirino Alves de Lima Neto<sup>2</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Post Graduation Program in Biosciences and Physiopathology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Immunogenetics, Basic Health Sciences Department, State University of Maringá, Paraná, Brazil

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

## 1. INTRODUCTION

The disease caused by the novel coronavirus (COVID-19) is a viral infection characterized as an acute respiratory syndrome (1) with high transmissibility. According to John Hopkins University, more than 582 million cases have been confirmed worldwide, with more than 6.4 million deaths (2). A complex network of factors related to the host-virus interaction, as well as other aspects such as public health measures, may explain the different pandemic scenarios in the world (3,4). Patients affected by COVID-19 present a wide range of symptoms, from mild ones, to more severe, such as pneumonia (5). The most important risk factor for the disease appears to be advanced age (6). However, other factors such as host genetic susceptibilities are also important (6).

Host genetic appears to modulate the immune response in viral infections (7). The major histocompatibility complex (MHC) system is one of the most important components of the immune system against viral infections because its genes encode cell surface molecules specialized in presenting immunodominant epitopes to immunocompetent cells (8). The human leukocyte antigen (HLA) genes are located on chromosome 6p21, the most polymorphic region of the human genome (9). Thus, distinct *HLA* alleles may modify the affinity of HLA in antigen presentation T lymphocytes and natural killer cells (NK cells) (10–12).

A major problem in association studies is the lack of statistical power due to the need for extremely large samples to detect very subtle genetic effects. Increasing power represents greater accuracy in detecting subtle genetic effects in a population. As the frequency of genetic variants is proportional to the sample size needed to study it, a pool of multiple studies can be very useful to increase the detection of disease-associated genetic variants. Thus, the objective of this systematic review and meta-analysis was to identify and evaluate possible *HLA* alleles associated with COVID-19, as well as alleles associated with different forms of this disease.

## 2. MATERIAL AND METHODS

The research methodology was based on the updated PRISMA statement (13). At least two independent researchers were involved in each step. Searches were performed using MeSH terms described in Figure 1. We searched for original studies evaluating *HLA* genetic variants associated with COVID-19. These articles should provide new evidence for the association of genetic polymorphisms with this disease. MEDLINE (Pubmed) and Web of Science databases were searched using the software R 4.2.0 (packages “wosr” and “easyPubmed”), covering from January 1, 2020 to July 15, 2022. We then merged all these studies and removed duplicates. After this, selected articles were evaluated for applicability to the previously described theme based on their titles and abstracts. Accepted articles were selected for full-text review. In this step, we attempted to remove studies that did not provide new evidence of genetic associations, such as reviews and retracted articles. We also chose to delete studies based solely on *in silico* analysis of molecular structures. After this step, a total of 36 *HLA* original studies were selected, but only 20 of them are available for data collection to meta-analysis.

When available, allele count data were collected from the selected studies for *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* and *HLA-DRB1* locus. They were compared in a  $\chi^2$  test with the sum of the remaining alleles, given by the formula  $y = (2 \times N) - n$ , where “y” is the sum of remaining alleles, “N” the total sample size, and “n” the number of the selected allele. Different groups of COVID-19 were evaluated, totalling 2088 individuals (mixed group). This group were subdivided into disease severity subgroups: asymptomatic (n=234); mild disease (n=705), when individuals do not require hospitalization; moderate disease (n=357), when requiring some degree of hospital care; and severe disease group (n=792), when requiring intensive care or even dying.

Statistical analyses were performed in R (package “meta”) (14). The meta-analysis results are presented in forest plots. This plot summarizes the results in a pool of studies, combining individuals genetic effect size (*Odds Ratio*), resulting in two possible models according to the observed heterogeneity of the studies ( $I^2$ ): fixed and random models. When the value of  $I^2$  was greater than 50%, the random OR model was chosen. This model attempts to reduce the effect that very large or small studies can have on the analysis. When  $I^2$  was less than 50% with no evidence of significant heterogeneity, the fixed model was chosen.

Statistical power analysis was performed using the QUANTO software (15). Different allele frequencies were used in a simulation with different OR sizes, in order to verify the available statistical power and the probability of false negatives.

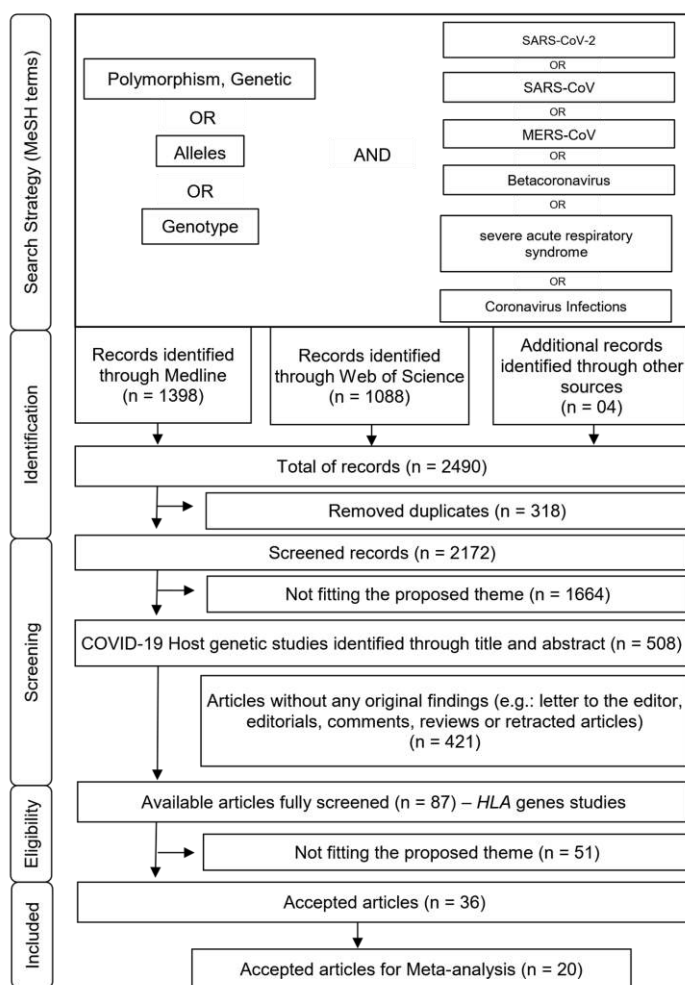


Figure 1. Flowchart of the selected studies.

### 3. RESULTS

This meta-analysis included a total of 3023 COVID-19 subjects and 13823 healthy controls in 20 studies. The meta-analysis comprised the evaluation of 95 low-resolution and 269 high-resolution *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* and *HLA-DRB1* alleles. In this study, different alleles were associated with COVID-19, especially class I alleles. The associated results are shown in Table 1. Many of these associations at low resolution were repeated for some specific alleles at high resolution.

For the selected studies, no statistically significant associations were observed for other alleles and the selected disease groups. The studies evaluated in this meta-analysis are compound from different populations. The vast majority came from populations of European origin (50% of all studies) and from Southeast and East Asian populations (25% of all studies).

**Table 1. Meta-analysis results of HLA alleles association with different groups of COVID-19.**

Allele	Studies (n)	Groups comparison (n) *		Genetic effect		Model	I <sup>2</sup>
				OR	CI 95%		
		Asymptomatic	Mixed				
<i>HLA-B*15</i>	3	219	872	0.59	(0.38 - 0.93)	F	0
<i>HLA-B*15:01</i>	3	219	872	0.52	(0.30 - 0.88)	F	0
<i>HLA-B*35</i>	3	220	825	1.62	(1.06 - 2.48)	F	0
<i>HLA-C*04</i>	3	219	814	1.70	(1.14 - 2.54)	F	43
<i>HLA-C*04:01</i>	3	219	814	1.67	(1.12 - 2.49)	F	48
<i>HLA-DRB1*04</i>	3	191	777	0.73	(0.55 - 0.98)	F	0
<i>HLA-DRB1*04:01</i>	3	191	777	0.62	(0.40 - 0.94)	F	0
		Controls	Mixed				
<i>HLA-A*03</i>	5	7991	656	1.47	(1.12 - 1.93)	F	0
<i>HLA-A*11</i>	7	8119	946	1.38	(1.10 - 1.73)	F	18
<i>HLA-B*54</i>	3	7278	262	1.66	(1.05 - 2.63)	F	22
<i>HLA-B*56</i>	3	4581	465	3.39	(1.76 - 6.52)	F	0
<i>HLA-C*12</i>	7	8738	915	1.42	(1.13 - 1.80)	F	27
<i>HLA-DRB1*16</i>	6	8441	929	1.67	(1.02 - 2.73)	R	58
		Mild	Moderate				
<i>HLA-C*12</i>	4	215	133	0.44	(0.22 - 0.90)	F	0
<i>HLA-C*12:02</i>	3	96	75	0.19	(0.05 - 0.68)	F	0
		Mixed	Severe				
<i>HLA-A*03</i>	9	1121	435	0.74	(0.56 - 0.97)	F	0
		Moderate	Severe				
<i>HLA-A*01</i>	4	158	198	0.54	(0.30 - 0.96)	F	0
<i>HLA-B*51</i>	6	324	343	1.86	(1.12 - 3.09)	F	0
<i>HLA-B*51:01</i>	4	209	228	2.19	(1.18 - 4.05)	F	0

n: Number of selected studies; R: Random model; F: Fixed Model; OR: Pooled Odds Ratio; I<sup>2</sup>: Heterogeneity test.

\* The compared groups consisted of different subgroups of individuals with COVID-19 and a group of healthy controls. For all comparisons P<0.05.

#### 4. DISCUSSION

In this study, different alleles were associated with COVID-19, especially class I alleles. For instance, *HLA-C\*04:01* allele was associated with risk for COVID-19 comparing asymptomatic and symptomatic individuals. This allele was previously predicted, in *in silico* studies, to bind with a smaller amount of SARS-CoV-2 peptides, which suggests a limited ability to present these antigens and build an strong viral immune response (16). Given the role of HLA-C in antigen presentation to NK cells, *HLA-C\*04:01* molecules may cause NK cell hyporesponsiveness. This response may delay SARS-CoV-2 viral recognition and, subsequently, generate an inadequate immune response (17). In this way, studies in the Italian population report a significantly high prevalence of *HLA-C\*04:01* allele and NK-cell inhibitor *KIR2DL1* in COVID-19 (18,19). Finally, *HLA-C\*04:01:01:01* was associated with the severity of COVID-19 in Indians (20) and *HLA-C\*04:01* with COVID-19 in Europeans (21).

In this study, the *HLA-B\*15:01* allele was associated with protection from symptomatic COVID-19. Interestingly, at the HLA-B locus, a large number of studies have observed an association of HLA-B15 serotype alleles with coronavirus, such as *HLA-B\*46:01* (22), *HLA-B\*15:01* (23,24), *HLA-B\*15:02* (25), *HLA-B\*15:03* (3) and *HLA-B\*15:27* (26,27). The *HLA-B\*15:01* allele was also associated with mild and moderate cases of COVID-19 in Spanish population when associated with *KIR3DS1* activating receptor, present on NK cells (23).

On the other hand, a study demonstrated that individuals with the *HLA-B\*15:01* allele would be more protected from COVID-19 symptoms. This effect was enhanced when in the presence of *HLA-DRB1\*01:01*. In addition, *HLA-B\*15:01* was found to bind more easily to the SARS-CoV-2 specific epitope, generating potent CD8+ T cell response, which may lead to better initial disease control (28). Among *In silico* studies, the *HLA-B\*46:01* molecule appears to have low binding to SARS-CoV-2 epitopes, suggesting that individuals expressing this molecule may be more vulnerable to COVID-19 (16). In our study, *HLA-B\*46:01* was present in only 1.6% of individuals with COVID-19, which may indicate a lack of statistical power to detect an association of this allele with the disease. Thus, it seems that serotypes such as *HLA-B\*15* (or *HLA-B\*46*) may be interesting targets for association studies on COVID-19.

Among class II alleles, *HLA-DRB1\*04* was associated with protection from symptomatic COVID-19 in this pool analysis. Nevertheless, contradictory results were observed in the literature. In Iranian population, *HLA-DRB1\*04* allele group was associated with protection to COVID-19 (29), while *HLA-DRB1\*04:06* was associated with risk in Chinese individuals (27). Among Saudi Arabians, the frequencies of *HLA-DRB1\*04* were increased in healthy controls (30). In a study performed in the United Kingdom, *HLA-DRB1\*04:01* had a higher frequency in patients with severe disease (31) and, In a Spanish population, *HLA-DQB1\*04* had an association with high mortality (32). A study in Brazil observed an association between *HLA-DRB1\*04:01* and with symptomatic COVID-19 groups (33).

Due to the great importance of HLA molecules in antigen presentation to T lymphocytes and NK cells, we hypothesized that many HLA antigens must be associated with greater or lesser susceptibility to COVID-19, depending on the type of response that this molecule can trigger and allele distribution among populations. However, many rare alleles association may be missed in population studies due to the limited sample size of these studies.

Therefore, some limitations should be considered in this study. The results obtained in systematic reviews are limited to the quality of available studies and to the profile of populations analysed. In this way, important covariates must be considered in future studies to explain their heterogeneity. Finally, although a pool of studies is carried out in an attempt to overcome this problem, low statistical power remains an important limiting factor in the observation of subtle genetic effects in studies on COVID-19. The lack of information is another important and frequent issue, mainly characterized by: lack of description of non-response rates; incomplete genotype or allele frequency data; covariates of interest not evaluated or described; and incomplete or vague descriptions of statistical methods, group selection, or genetic variants studied.

## 5. CONCLUSION

Different *HLA* alleles have been associated with COVID-19, especially class I alleles (related to antiviral response). The *HLA-C\*04:01* and *HLA-B\*15:01* alleles are examples of alleles that appear to alter the quantity and quality of SARS-CoV-2 antigen presentation to T lymphocytes and NK cells. Despite this, statistical power remains an important limitation for studies of genetic association in COVID-19.

## FUNDING

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária do Estado do Paraná (#2015/0310), and Laboratory of Immunogenetics at State University of Maringá (#1589/2017-CSD-UEM).

## REFERENCES

1. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. Vol. 395, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2020. p. 470–3.
2. Johns Hopkins University. COVID-19 Dashboard [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 12]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
3. Iturrieta-Zuazo I, Rita CG, García-Soidán A, de Malet Pintos-Fonseca A, Alonso-Alarcón N, Pariente-Rodríguez R, et al. Possible role of HLA class-I genotype in SARS-CoV-2 infection and progression: A pilot study in a cohort of Covid-19 Spanish patients. *Clin Immunol*. 2020 Oct 1;219:108572.
4. Li Y, Campbell H, Kulkarni D, Harpur A, Nundy M, Wang X, et al. The temporal association of introducing and lifting non-pharmaceutical interventions with the time-varying reproduction number (R) of SARS-CoV-2: a modelling study across 131 countries. *Lancet Infect Dis*. 2020 Feb 1;21(2):193–202.
5. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020 Mar;382(13):1199–207.
6. Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. Vol. 27, *Nature Medicine*. Nature Research; 2021. p. 28–33.
7. Paíro-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, et al. Genetic mechanisms

- of critical illness in Covid-19. *Nature*. 2020 Dec 11;1–1.
8. Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. Vol. 35, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc.; 2017. p. 149–76.
  9. Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? Vol. 6, *Lancet Infectious Diseases*. Elsevier; 2006. p. 653–63.
  10. Tian C, Hromatka BS, Kiefer AK, Eriksson N, Noble SM, Tung JY, et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nat Commun*. 2017 Dec 1;8(1):1–13.
  11. Hammer C, Begemann M, McLaren PJ, Bartha I, Michel A, Klose B, et al. Amino acid variation in HLA class II proteins is a major determinant of humoral response to common viruses. *Am J Hum Genet*. 2015 Nov 5;97(5):738–43.
  12. Cardozo DM, Moliterno RA, Sell AM, Guelsin GAS, Beltrame LM, Clementino SL, et al. Evidence of HLA-DQB1 contribution to susceptibility of dengue serotype 3 in dengue patients in Southern Brazil. *J Trop Med*. 2014;2014.
  13. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021 Mar 29;372.
  14. Schwarzer G. An R package for meta-analysis. *R News*. 2007;7(3):40–5.
  15. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat Med*. 2002 Jan 15;21(1):35–50.
  16. Nguyen A, David JK, Maden SK, Wood MA, Weeder BR, Nellore A, et al. Human Leukocyte Antigen Susceptibility Map for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J Virol*. 2020 Apr 17;94(13).
  17. Hovhannisyanyan A, Madelian V, Avagyan S, Nazaretyan M, Hyussyan A, Sirunyan A, et al. HLA-C\*04:01 Affects HLA Class I Heterozygosity and Predicted Affinity to SARS-CoV-2 Peptides, and in Combination With Age and Sex of Armenian Patients Contributes to COVID-19 Severity. *Front Immunol*. 2022 Feb 3;13:206.
  18. Littera R, Campagna M, Deidda S, Angioni G, Cipri S, Melis M, et al. Human Leukocyte Antigen Complex and Other Immunogenetic and Clinical Factors Influence Susceptibility or Protection to SARS-CoV-2 Infection and Severity of the Disease Course. The Sardinian Experience. *Front Immunol*. 2020 Dec 4;11.
  19. Littera R, Chessa L, Deidda S, Angioni G, Campagna M, Lai S, et al. Natural killer-cell immunoglobulin-like receptors trigger differences in immune response to SARS-CoV-2 infection. *PLoS One*. 2021 Aug 1;16(8).
  20. Vishnubhotla R, Sasikala M, Ketavarapu V, Reddy DN. High-resolution HLA genotyping identifies alleles associated with severe COVID-19: A preliminary study from India. *Immunity, Inflamm Dis*. 2021 Dec 1;9(4):1781–5.
  21. Weiner J, Suwalski P, Holtgrewe M, Rakitko A, Thibeault C, Müller M, et al. Increased risk of severe clinical course of COVID-19 in carriers of HLA-C\*04:01. *EClinicalMedicine*. 2021 Oct 1;40:101099.
  22. Lin M, Tseng HK, Trejaut JA, Lee HL, Loo JH, Chu CC, et al. Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *BMC Med Genet*. 2003 Sep 12;4.
  23. Bernal E, Gimeno L, Alcaraz MJ, Quadeer AA, Moreno M, Martínez-Sánchez M V., et al. Activating Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors Are Associated with the Severity of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis*. 2021 Jul 15;224(2):229–40.
  24. Abdelhafiz AS, Ali A, Fouda MA, Sayed DM, Kamel MM, Kamal LM, et al. HLA-B\*15 predicts survival in Egyptian patients with COVID-19. *Hum Immunol*. 2022 Jan 1;83(1):10.
  25. Ng MHL, Cheng S, Lau K, Sung J, Zee B, Leung G, et al. Immunogenetics in SARS: a case-control study | HKMJ. *Hong Kong Med J*. 2010;29–33.
  26. Wang W, Zhang W, Zhang J, He J, Zhu F. Distribution of HLA allele frequencies in 82 Chinese individuals with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *HLA*. 2020 Aug 1;96(2):194–6.
  27. Yu X, Ho K, Shen Z, Fu X, Huang H, Wu D, et al. The Association of Human Leukocyte Antigen and COVID-19 in Southern China. *Open Forum Infect Dis*. 2021 Sep 1;8(9).
  28. Augusto DG, Yusufali T, Peyser ND, Butcher X, Marcus GM, Olgin JE, et al. HLA-B\*15:01 is associated with asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci*. 2021 Sep 10;2021.05.13.21257065.
  29. Ebrahimi S, Ghasemi-Basir HR, Majzoobi MM, Rasouli-Saravani A, Hajilooi M, Solgi G. HLA-DRB1\*04 may predict the severity of disease in a group of Iranian COVID-19 patients. *Hum Immunol*. 2021 Oct 1;82(10):719.
  30. Naemi FMA, Al-adwani S, Al-khatabi H, Al-nazawi A. Frequency of HLA alleles among COVID-19 infected patients: Preliminary data from Saudi Arabia. *Virology*. 2021 Aug 1;560:1–7.
  31. Langton DJ, Bourke SC, Lie BA, Reiff G, Natu S, Darlay R, et al. The influence of HLA genotype on the



- severity of COVID-19 infection. *Hla*. 2021 Jul 1;98(1):14.
32. Lorente L, Martín MM, Franco A, Barrios Y, Cáceres JJ, Solé-Violán J, et al. HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Med Intensiva*. 2021 Mar 1;45(2):96–103.
  33. Castelli EC, de Castro M V., Naslavsky MS, Scliar MO, Silva NSB, Andrade HS, et al. MHC Variants Associated With Symptomatic Versus Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Highly Exposed Individuals. *Front Immunol*. 2021 Sep 28;12.

**Keywords:** SARS-CoV-2; Genetic Variation; *HLA* antigens.



## ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE PACIENTES PORTADORES DE HANSENÍASE E SEUS ENDOFENÓTIPOS EM POPULAÇÕES DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ- BRASIL

Érica Aparecida Pereira<sup>1</sup>; Giovana Paola Zaccarias Bemvides<sup>1</sup>; Rafael Moreira Rodrigues<sup>2</sup>; Andressa Mayra dos Santos<sup>3</sup>; Marcelo Távora Mira<sup>4</sup>; Larissa Danielle Bahls Pinto<sup>5</sup>; Jeane Eliete Laguila Visentainer<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 Medicina, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR

<sup>4</sup> Docente, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: [ericaapereira14@gmail.com](mailto:ericaapereira14@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente exclusivamente intracelular e de crescimento lento, que possui tropismo por macrófagos da pele, células de Schwann do Sistema Nervoso Periférico (1). Segundo o boletim da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2), anualmente são registrados cerca de 200 mil novos casos da doença em todo o mundo, sendo o Brasil o segundo país com maior número absoluto de casos (17.979 notificados somente no ano de 2020), ficando atrás apenas da Índia. As características clínicas iniciais mais comuns da doença são lesões de pele com perda de sensibilidade e o espessamento de nervos periféricos. O diagnóstico e tratamento precoces são essenciais para prevenir as possíveis sequelas e incapacidades físicas permanentes responsáveis pelo estigma e preconceito até hoje associados à doença (3). O fenótipo de susceptibilidade à infecção pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é complexo e é influenciado por fatores do hospedeiro e do parasita e pelas condições ambientais.

A Hanseníase apresenta um grande espectro de manifestações clínicas, para as quais existem diferentes propostas de classificação. Segundo o protocolo de classificação da OMS os casos de hanseníase são divididos em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB) para fins de tratamento (4). Há também a classificação de Madri (1953), baseando-se nas características clínicas e baciloscópicas, que divide a hanseníase em quatro classes diferentes: indeterminada, tuberculoide, dimorfa e virchowiana, sendo a forma tuberculoide caracterizada por um quadro mais brando e a virchowiana a forma mais grave, com alta contagem de bacilos e transmissibilidade (5).

Nem todos os indivíduos expostos ao *M. leprae* desenvolverão a doença, além disso, dependendo do perfil imunológico do hospedeiro um grande espectro de manifestações clínicas é se observado, variando desde a forma tuberculoide, até a forma lepromatosa. No polo tuberculoide (paucibacilar), linfócitos T CD4<sup>+</sup> diferenciam-se para o perfil Th1 e produzem citocinas capazes de promover a ativação clássica de macrófagos (M1), além de liberarem citocinas pró-inflamatórias, que junto das citocinas liberadas pelos macrófagos ativados, potencializam a resposta imune celular. Já o polo virchowiano (multibacilar) é resultante da resposta Th2, a qual produz citocinas que agem nas células B, estimulando a produção de anticorpos e, nos macrófagos, promovendo sua ativação alternativa (M2). Os macrófagos M2 não têm sua função microbicida potencializada, ao contrário, produzem citocinas anti-inflamatórias o que culmina numa alta carga bacteriana de *M. leprae* (6).

Sabe-se que esta polarização da resposta imune para Th1 ou Th2 é determinada por sinais gerados por células da imunidade inata em resposta ao reconhecimento dos patógenos, bem como por fatores

genéticos do hospedeiro (6). Em outras palavras, características polimórficas da genética do hospedeiro contribuem significativamente para com o desfecho da infecção. Muitos genes já foram associados com proteção ou risco para as diferentes formas clínicas da hanseníase, a maioria deles codificam moléculas importantes relacionadas ao sistema imunológico do hospedeiro. Entre estes, podemos citar os genes *HLA-DR/DQ*, *LTA*, *IL10*, *PARKN/PACRG*, *NOD2*, *GATA3*, *INFG*, *LR1*, que já foram associados à Hanseníase na população brasileira (4).

Mais recentemente, estudos envolvendo populações com *background* genético distinto que avaliaram a influência de variantes genéticas na Hanseníase revelaram dezenas de regiões/genes ligados/associados à Hanseníase e seus endofenótipos. No entanto, devido à natureza dos estudos de associação, descrita acima, não se pode afirmar se as variantes associadas são causais ou estão em desequilíbrio de ligação com a verdadeira variante causal, o que vem sendo demonstrado por várias evidências clínicas e epidemiológicas (7). Entre os anos de 2019 e 2020, o estado do Paraná foi responsável por, aproximadamente, 80% de novos casos da doença na região sul do país, demonstrando a endemia de hanseníase que ocorre no território paranaense (8). Reforçando a necessidade de novos estudos que demonstrem o perfil epidemiológico das regiões do estado do Paraná-Brasil, gerando indicadores para posteriores estudos em busca de melhores marcadores genéticos associados com as formas clínicas e desfecho da doença. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização epidemiológica dos pacientes portadores de hanseníase acompanhados na região norte/noroeste do Paraná pelo Consórcio Intermunicipal de Saúde do Setentrião Paranaense (CISAMUSEP), como base para um posterior estudo de associação genética com a doença.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Metodologia**

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal, descritivo e retrospectivo, com base na revisão de prontuários de pacientes portadores de hanseníase, entre os anos de 2005 e 2021, que são acompanhados e tratados no CISAMUSEP, que atende o município de Maringá e outras 29 cidades pertencentes a 15ª Regional de Saúde do Paraná, Brasil (Ângulo, Astorga, Colorado, Doutor Camargo, Floral, Floresta, Flórida, Iguaçu, Itaguajé, Itambé, Ivatuba, Lobato, Malaia, Mandaguaçu, Mandaguari, Marialva, Munhoz de Mello, Nossa Senhora das Graças, Nova Esperança, Ourizona, Paiçandu, Paranacity, Presidente Castelo Branco, Santa Fé, Santa Inês, Santo Inácio, São Jorge do Ivaí, Sarandi e Uniflor).

A amostra populacional dos pacientes da região Noroeste do estado do Paraná-Brasil, foi recrutada mediante aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil (COPEP-UEM nº 2.424.046 /2017) e da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (CEP-SESA / HT nº. 400/2011), e assinatura de Termo de Consentimento e Livre Esclarecido (TCLE) pelos participantes no estudo.

Foram revisados 482 prontuários médicos e coletados dados com as seguintes informações: nome, idade, sexo, cor autodeclarada, forma clínica e classificação operacional. Os dados foram obtidos utilizando fichas pré-elaboradas para coleta de dados e material biológico e, posteriormente, estes dados foram transcritos para uma tabela geral de dados no *software* Microsoft *Excel*. As frequências foram determinadas por contagem direta e organizadas sob a forma de tabelas de acordo com as variáveis em estudo. Os resultados obtidos foram comparados por meio do teste Qui-quadrado, utilizando-se o *software* BioEstat v.5.3.

### **2.2. Análise de dados dos resultados**

O estudo epidemiológico foi realizado com base na revisão de prontuários de pacientes portadores de hanseníase, entre os anos de 2005 e 2021, que são acompanhados e tratados no CISAMUSEP, que atende Maringá e outras 29 cidades pertencentes à 15ª Regional de Saúde do Paraná, Brasil (Ângulo, Astorga, Colorado, Doutor Camargo, Floral, Floresta, Flórida, Iguaçu, Itaguajé, Itambé, Ivatuba, Lobato, Malaia, Mandaguaçu, Mandaguari, Marialva, Munhoz de Mello, Nossa Senhora das Graças, Nova Esperança, Ourizona, Paiçandu, Paranacity, Presidente Castelo Branco, Santa Fé, Santa Inês, Santo Inácio, São Jorge do Ivaí, Sarandi e Uniflor).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (Número dos Pareceres: 464.158 - 18/11/2013 e 2.424.046 – 08/12/2017) e assinatura do TCLE.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1 - Resultados parciais - Caracterização epidemiológica dos pacientes portadores de hanseníase acompanhados na região norte/noroeste do Paraná**

Foram incluídos no estudo 482 pacientes diagnosticados com hanseníase no CISAMUSEP entre os anos de 2005 a 2021. Como descrito na tabela 1, a maioria dos pacientes eram do sexo masculino, representando 57,3% (N= 276), contra 42,7% (N= 206) do sexo feminino. Na avaliação da raça ou cor

autodeclarada, a maioria se declarou branco em ambos os sexos, representando 60,2% dos casos, seguidos pelos pardos (28,2%), pretos (10,4%) e amarelos (0,4%) (Tabela 1). Com relação à distribuição etária, a faixa de 40 a 59 anos representou a maior parte dos infectados com 46,3%, seguida pelas faixas etárias e as respectivas porcentagens como demonstrado na tabela 1.

De acordo com a classificação operacional, a forma multibacilar foi a predominante com 64,1%, seguida pela paucibacilar (20,1%). Ao avaliar os indivíduos que possuem forma clínica identificada no prontuário eletrônico, sendo 379 no espaço amostral de 482, a forma virchowiana foi a predominante com 33,6%, entretanto, quando a análise é feita segundo a divisão por sexo, a forma virchowiana preponderou somente no sexo masculino, representando 42% do total de homens. Por outro lado, no sexo feminino, houve o predomínio da forma dimorfa, presente em 30,6% das mulheres em estudo (Tabela 1).

**TABELA 1 – Distribuição dos pacientes portadores de hanseníase do Noroeste do Estado do Paraná, Brasil atendidos no CISAMUSEP\*, no período de 2005 a 2021, segundo cor autodeclarada, faixa etária, classificação operacional e forma clínica.**

Características	Masculino (276)		p-valor*	Feminino (206)		p-valor*	Total (482)		p-valor*
	N	%		N	%		N	%	
<b>Cor autodeclarada</b>									
Branca	160	58,0	ns	130	63,1	ns	290	60,2	ns
Parda	84	30,4	ns	52	25,2	ns	136	28,2	ns
Preta	29	10,5	ns	21	10,2	ns	50	10,4	ns
Amarela	1	0,4	ns	1	0,5	ns	2	0,4	ns
Não declarada**	2	0,7	-	2	1,0	-	4	0,8	-
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>100</b>		<b>206</b>	<b>100</b>		<b>482</b>	<b>100</b>	
<b>Faixa etária (anos)</b>									
1-19	2	0,7	ns	0	0	ns	2	0,4	ns
20-39	49	17,8	ns	25	12,1	ns	74	15,4	ns
40-59	124	44,9	ns	99	48,1	ns	223	46,3	ns
60-79	89	32,2	ns	80	38,8	ns	169	35,1	ns
80-99	10	3,6	ns	2	1,0	ns	12	2,5	ns
Não declarada**	2	0,7	-	0	0	-	2	0,4	-
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>100</b>		<b>206</b>	<b>100</b>		<b>482</b>	<b>100</b>	
<b>Classificação operacional</b>									
Multibacilar	201	72,8	<0,001	108	52,4	<0,001	309	64,1	<0,001
Paucibacilar	39	14,1	-	58	28,2	-	97	20,1	-
Não declarada**	36	13,0	-	40	19,4	-	76	15,8	-
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>100</b>		<b>206</b>	<b>100</b>		<b>482</b>	<b>100</b>	
<b>Forma clínica***</b>									
Virchowiana	116	42,0	<0,001	46	22,3	<0,001	162	33,6	<0,001
Dimorfa	65	23,6	-	63	30,6	-	128	26,6	-
Tuberculoide	30	10,9	-	42	20,4	-	72	14,9	-
Indeterminada	5	1,8	-	12	5,8	-	17	3,5	-
Não declarada**	60	21,7	-	43	20,9	-	103	21,4	-
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>100</b>		<b>206</b>	<b>100</b>		<b>482</b>	<b>100</b>	

\* Consórcio Intermunicipal de Saúde do Setentrão Paranaense.

\*\* Dados que não foram preenchidos nos prontuários dos pacientes.

\*\*\* Baseada na classificação de Madri que divide a hanseníase em quatro formas (virchowiana, dimorfa, tuberculoide e indeterminada).

#### 4. DISCUSSÃO

A partir dos dados analisados, verificou-se o predomínio de indivíduos portadores de hanseníase do sexo masculino, autodeclarados brancos, com prevalência da classificação operacional multibacilar e da forma clínica virchowiana entre os homens e dimorfa entre as mulheres.

O desenvolvimento de uma doença infecciosa, após o contato com o patógeno, depende de uma combinação complexa de fatores relativos ao microrganismo (como a virulência) e ao hospedeiro, incluído seus *make up* genéticos. Sabe-se que o genoma do *M. leprae* vem se mantendo altamente conservado ao longo do tempo (9) e é praticamente clonal ao redor do mundo (10), o que reforça a hipótese de que a grande variabilidade interindividual de fenótipos da hanseníase é amplamente determinada por características inatas do hospedeiro, determinadas geneticamente.

Também as disparidades regionais, geradas pela desigualdade socioeconômica, resultam na manutenção da doença, em locais com maiores níveis de pobreza. Assim, a distribuição espacial da hanseníase é bastante heterogênea nas diferentes regiões brasileiras, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste de maior incidência (11). Apesar da região Sul do Brasil apresentar menor número de novos casos de hanseníase (1.232 casos entre 2019 e 2020), o estado do Paraná foi responsável por aproximadamente 80% deles (974 novos casos) demonstrando endemia de hanseníase no território paranaense.

Em relação à variável raça ou cor autodeclarada, houve predomínio de brancos (60,2%), é provável que esta evidência não esteja relacionada à maior suscetibilidade à infecção e sim ao perfil populacional do Paraná, que concentra maior número de indivíduos que se autodeclararam brancos. Este achado está em consonância com outros estudos, exprimindo o processo histórico de colonização, dinâmica de ocupação territorial, movimentos migratórios, miscigenação e distribuição espacial, justificando a preponderância de brancos na região do município de Maringá (12, 13).

Quanto à distribuição dos pacientes por faixa etária, 297 (61,6%) possuíam de 20 a 59 anos, corroborando com resultados encontrados em outros estudos, mostrando que a população economicamente ativa é a mais atingida pela hanseníase (14 -17). Em relação a associações genéticas, a associação idade-dependente foi encontrada em relação a alguns genes como, *PRKN-PACRG*, *LTA*, *miR-146a* (hanseníase per se) e *TNF SF15-TNF F8*, podendo ser investigada, futuramente, a frequência de seus polimorfismos e desequilíbrio de ligação nesta população (4).

A forma virchowiana foi a preponderante entre os homens representando 42% dos indivíduos do sexo masculino e a forma dimorfa prevaleceu entre as mulheres, o que representou 30,6% dos pacientes do sexo feminino. Já em relação à classificação operacional, preconizada pela OMS, a forma multibacilar superou a forma paucibacilar em ambos os sexos, representando 309 (64,1%) dos pacientes avaliados (Tabela 1). O que não difere de outro estudo realizado previamente na região de Maringá que verificou um maior percentual dessas formas clínicas da hanseníase (18). Comparado com o cenário nacional, a maioria dos casos notificados são do sexo masculino (55,5%) do total, esta predominância foi observada na maioria das faixas etárias, com maior frequência nos indivíduos entre 50 e 59 anos no Brasil (19).

A distribuição dos pacientes por sexo apontou maior prevalência do sexo masculino em todas as faixas etárias, sendo 276 homens (57,3%) contra 206 mulheres (42,7%). A literatura diverge relacionado à prevalência da hanseníase de acordo com o sexo; segundo alguns autores, os homens são os mais acometidos pela enfermidade em decorrência de menor preocupação com a estética corporal, que retarda a procura por auxílio médico e, ainda, devido a uma escassez de políticas de saúde pública com direcionamento específico para a saúde do sexo masculino (20). Por outro lado, outros autores defendem que o predomínio do sexo masculino não é absoluto, já que mulheres, sobretudo gestantes e lactantes, apresentam maior risco de desenvolvimento de reações hansênicas, complicações mais frequentes da hanseníase, o que salienta o perfil imunogenético da doença (21). No Paraná, o maior problema é o desconhecimento da doença, assim, os casos são detectados tardiamente, muitas vezes, apenas pelas sequelas que já apresentam (8).

Além da provável influência da variabilidade genética entre os indivíduos avaliados pelo presente estudo, a maior prevalência das formas multibacilar, virchowiana e dimorfa, expõe um cenário preocupante, pois denota uma baixa adesão às terapias disponibilizadas, diagnóstico tardio, subnotificação, maior estabilização da endemia de hanseníase vigente e, em consequência disso, uma perpetuação do foco de transmissão (22).

#### 5. CONCLUSÃO

Os resultados parciais obtidos neste estudo mostraram maior prevalência da classificação operacional multibacilar, com a forma clínica virchowiana, indicando alta transmissibilidade, diagnóstico tardio, influenciando sobre o grau de incapacidade. Aponta maior frequência de pacientes do sexo masculino, faixa etária entre 40-50 anos de idade, cor autodeclarada branca, classificação operacional multibacilar, forma clínica virchowiana, permitindo delinear o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de Hanseníase na população do Noroeste do Paraná-Brasil. Possibilita também às autoridades responsáveis refletirem

estratégias de saúde pública resolutivas no controle da disseminação da hanseníase e oferece subsídios para futuros estudos imunogenéticos da população desta região.

## FINANCIADORES

Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (nº1589/2017-CSD-UEM). CAPES e CNPq.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá, Consórcio Público Intermunicipal de Saúde do Setentrião Paranaense (CISAMUSEP), aos pacientes que aceitaram participar de nossa pesquisa e as instituições envolvidas neste estudo colaborativo: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina (PUCPR). Universidade Federal de Goiás (UFG), Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), Universidade Estadual de Maringá (UEM). Research Institute of the Mc Gill University Health Centre (RI-MUHC), Escola Fiocruz de Governo, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (ICC/FIOCRUZ).

## REFERÊNCIAS

1. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*. 2004 Apr 10;363(9416):1209-19. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15952-7. PMID: 15081655.
2. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. 2019. [Acesso em 16 de Ago 2022]. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326775/WER9435-36-en-fr.pdf?ua=1>.
3. Lastória JC, Abreu MAMM. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. *An Bras Dermatol*. 2014 Jun; 89(3):389-401.
4. Uaska Sartori PV, Penna GO, Bühner-Sékula S, Pontes MAA, Gonçalves HS, Cruz R, Virmond MCL, et al. Human Genetic Susceptibility of Leprosy Recurrence. *Sci Rep*. 2020 Jan; 10(1):1284. doi: 10.1038/s41598-020-58079-3. PMID: 31992776; PMCID: PMC6987179.
5. Rodrigues Júnior IA, Gresta LT, Noviello Mde L, Cartelle CT, Lyon S, Arantes RM. Leprosy classification methods: a comparative study in a referral center in Brazil. *Int J Infect Dis*. 2016 Apr; 45:118-22. doi: 10.1016/j.ijid.2016.02.018. Epub 2016 Feb 27. PMID: 26928327.
6. Sauer ME, Salomão H, Ramos GB, D'Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. *Clin Dermatol*. 2015 Jan-Feb; 33(1):99-107. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.001. PMID: 25432815.
7. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev*. 2006 Sep; 77(3):189-202. PMID: 17171999.
8. Governo do Estado do Paraná. Secretaria da Saúde. Hanseníase. 2022 [Acesso em 18 de Ago 2022]. Disponível em <https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Hanseniaze>.
9. Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science*. 2013 Jul; 341(6142):179-83. doi: 10.1126/science.1238286. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23765279.
10. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009 Dec; 41(12):1282-9. doi: 10.1038/ng.477. Epub 2009 Nov 1. PMID: 19881526.
11. Silva CLM, Fonseca SC, Kawa H, Palmer DOQ. Spatial distribution of leprosy in Brazil: a literature review. *Rev Soc Bras Med Trop* [online]. 2017 Jul-Aug; (50):439-449. doi.org/10.1590/0037-8682-0170-2016. ISSN 1678-9849.
12. Gil I, Panizzi LNG, Purim KSM. Perfil epidemiológico dos casos notificados de hanseníase no estado do Paraná-Brasil, 2007-2015. *Int J Fam Commun Med*. 2019; 3(5):236-240. doi: [10.15406/ijfcm.2019.03.00163](https://doi.org/10.15406/ijfcm.2019.03.00163).
13. Ferreira NM, Arroyo LH, Gioia TB, Arcoverde MAM, Assis IS, Neto MS, et al. Hanseníase e determinantes sociais em saúde no Sul do Brasil: Análise geograficamente ponderada. *Res Soc Dev*. 2021 Jul; 10(9):16110917823. doi.org/10.33448/rsd-v10i9.17823.
14. Lombardi C, Junqueira TB, Garcia MR de A. Tendência secular da detecção da hanseníase no município de Maringá - PR, 1977/1986. *Hansen. Int*. [Internet]. 2022 Ago; 13(1):1-12.
15. Lima HMN, Sauaia N, Costa VLR, Neto GTC, Figueredo PMS. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase atendidos em Centro de Saúde em São Luís, MA. *Rev Soc Bra Clin Med* 2010 Jan; 8(4):323-327. LILACS | ID: lil-555456.

16. Batista ES, Campos RX, Queiroz RCG, Siqueira SL, Pereira SM, Pacheco TJ, et al. Perfil sócio-demográfico e clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em Campos dos Goytacazes, RJ. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2011 Mar; 9(2):101-106.
17. Miranzi SSC, Pereira LHMN, Altacílio A. Perfil epidemiológico da hanseníase em um município brasileiro, no período de 2000 a 2006. *Rev Soc Bras Med Trop* [online]. 2010 Ago; 43(1):62-67. doi.org/10.1590/S0037-86822010000100014. Epub. ISSN 1678-9849.
18. 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; 6:658. doi: 10.3389/fimmu.2015.00658. PMID: 26793196; PMCID: PMC4709443.
19. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Hanseníase. Número Especial. 2022. [Acesso em 18 de Ago 2022]. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseniase--25-01-2022.pdf>.
20. Melão S, Blanco LFDO, Mounzer N, Veronezi CCD, Simões PWTA. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase no extremo sul de Santa Catarina, no período de 2001 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* [online]. 2011 fev; 44(1):79-84. doi.org/10.1590/S0037-86822011000100018. ISSN 1678-9849.
21. Ribeiro Junior AF, Vieira MA, Caldeira AP. Perfil epidemiológico da hanseníase em uma cidade endêmica no Norte de Minas Gerais. *Rev Bras Clin Med*. 2012 jul-ago; 10(4):272-7.
22. Leano HAM. Análise epidemiológica da hanseníase no nordeste brasileiro: vulnerabilidade individual, programática e social. [Tese] Belo Horizonte (BH): Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*; hanseníase, endofenótipos.



## ASSOCIAÇÃO GENÉTICA DE *HLA-G* NA IMUNOPATOLOGIA DA HANSENÍASE

Giovana Paola Zaccarias Bemvides<sup>1</sup>; Érica Aparecida Pereira<sup>1</sup>; José Renato Pattaro Júnior<sup>2</sup>; Victor Hugo de Souza<sup>3</sup>; Rafael Moreira Rodrigues<sup>4</sup>; Quirino Alves de Lima Neto<sup>5</sup>; Joana Maira Valentini Zacarias Santim<sup>5</sup>; Jeane Eliete Laguilha Visentainer<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 Pós-Graduação (Pós Doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, 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>Acadêmico de Graduação em Medicina, Laboratório de Imunogenética, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

### 1. INTRODUÇÃO

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa, de caráter crônico, causada pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Afeta principalmente a pele, nervos periféricos, articulações, mucosa do trato respiratório superior e os olhos. Conhecida por ser uma doença milenar e negligenciada, é ainda hoje, um problema de saúde pública no Brasil (1). Quanto a incidência de casos, o país perde somente para a Índia (2), lugar populoso com características socioculturais diferentes das brasileiras. Muito estigmatizada, afeta não somente a saúde física dos pacientes, mas a mental também.

Apresenta desfechos com características bem distintas, de acordo com a imunidade do hospedeiro frente ao microrganismo. Desde 1966 a Hanseníase passou a ser categorizada pela classificação de Ridley e Jopling em formas clínicas: tuberculóide (TT), *borderline* ou dimorfas, que são subclassificadas em dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD), dimorfa-virchowiana (DV) e virchowiana-subpolar (VS) e virchowiana (3), sendo tuberculóide o perfil em que a imunidade do hospedeiro é mais eficiente, e virchowiano o perfil em que a imunidade é nula. Outra classificação, muito utilizada na clínica por independe de baciloscopia de esfregaços cutâneos, que por vezes estão indisponíveis no sistema de saúde, leva em consideração a quantidade de lesões que o paciente apresenta. Paucibacilar (PB) para menos lesões ou Multibacilar (MB) quando o número de lesões é maior (4).

Já está bem estabelecido que o sistema imune inato tem papel crucial no desfecho da doença, uma vez que é a primeira linha de defesa, responsável pela ativação de células imunológicas e pelo direcionamento de uma resposta imune adaptativa. O que ainda gera dúvidas sobre a hanseníase é o fato de que a maioria dos indivíduos que entram em contato com o *M. leprae* não desenvolvem a doença, o que gerou a hipótese de que uma resistência inata seria possibilitada por um *background* genético (5). O que reforça a necessidade de estudos que busquem os marcadores genéticos envolvidos na imunopatogenicidade da hanseníase.

Pesquisadores relataram que o gene *HLA-G* e seus ligantes *LILRB1* e *LILRB2* estão associados com o desfecho da doença. *HLA-G*, localizado no *locus* do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), no braço curto do cromossomo 6, região 6p21.3, é um HLA de classe I não clássico (6), conhecido por seu baixo grau polimórfico. A molécula *HLA-G* exerce sua atividade por meio da interação com receptores expressos em células imunológicas e não imunológicas. Através dessas interações, a proteína *HLA-G* é capaz de inibir a função citolítica e induzir a apoptose de linfócitos T citotóxicos (TCD8+) e células *Natural Killer* (NK), evitando a proliferação de células B, TCD4+ e TCD8+, para direcionar células TCD4+ para um perfil imunossupressor e para tolerar células dendríticas. *HLA-G* também pode promover um perfil de citocinas Th2 e induzir a geração de células T regulatórias (7,8).

De acordo com Silva e colaboradores (9), a expressão de *HLA-G* é induzida por IFN- $\gamma$  e ambos estão aumentados em amostra de biópsia de indivíduos paucibacilares (PB) quando comparadas com



amostras de indivíduos multibacilares (MB). Possivelmente, o aumento do *HLA-G* nas formas PB esteja relacionado a uma tentativa de controle da resposta imune celular exacerbada e descontrolada, que poderia ser prejudicial aos tecidos adjacentes. Neste mesmo estudo, foi observado que a expressão de *HLA-G* foi maior nos controles saudáveis que nos pacientes, e as células TCD4+ que expressam a molécula foram descritas como um novo tipo de célula T reguladora natural em humanos, porque equilibram a resposta imune anti-patógeno pró-inflamatória com a resposta anti-inflamatória, que limita o dano tecidual. Desta forma, o objetivo do estudo foi definir blocos haplotípicos na população brasileira e analisar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *HLA-G* em associação com a hanseníase. Para tal, utilizamos amostras de pacientes com Hanseníase e indivíduos saudáveis do estado do Paraná para as genotipagens e comparação de frequências genotípicas e alélicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (Número dos Pareceres: 464.158 - 18/11/2013 e 2.424.046 – 08/12/2017).

### 2.1. Coleta e armazenamento

Foram coletadas amostras de sangue de 92 indivíduos de Maringá/PR e região, diagnosticados com hanseníase pelo Consórcio Público Intermunicipal de Saúde do Setentrão Paranaense (CISAMUSEP) e 89 indivíduos saudáveis sem histórico da doença na família, que aceitaram participar da pesquisa, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Estes indivíduos foram divididos em grupos caso e controle, sendo o diagnóstico de hanseníase o critério de seleção do grupo de casos. Por se tratar de um estudo caso-controle, os resultados obtidos do primeiro grupo foram comparados com os do segundo. Foi preenchida uma ficha cadastral do paciente, contendo variáveis como: idade, sexo, etnia, região em que reside, tratamento e outros; além de dados clínicos da doença, por meio do acesso aos prontuários dos pacientes com a doença.

A coleta do material biológico foi realizada por punção venosa, utilizando-se agulha e seringas estéreis e tubos de 5 mL contendo o anticoagulante EDTA. O procedimento foi realizado nas dependências do CISAMUSEP com salas e EPIs adequados. Após, essas amostras foram alíquotadas em tubos de criopreservação e congeladas a -20°C no Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG- UEM), para uma futura extração do DNA.

### 2.2. Extração do DNA

Para extrair o DNA genômico dessas amostras de sangue total coletadas e armazenadas, foi utilizado o kit comercial Biopur (SR Comercio de Produtos para Laboratórios®, Pinhais, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 200 µL de sangue total. A concentração e pureza do DNA genômico extraído foram avaliadas por meio do equipamento Nanodrop 2000.

### 2.3. Amplificação

*HLA-G* exon 8 (3' UTR) foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* específicos, de acordo com Moraes et al. (10). As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 20µL, contendo 1 x PCR buffer (0,1M Tris-HCl pH 8,8; 0,5 M KCl), 0,25mM de dNTP Mix, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15µM de cada primer, 0,8 unidades de Taq DNA-polymerase e 75ng de DNA genômico. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese, em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe (Invitrogen®, USA). A visualização das bandas foi realizada e documentada em fotodocumentador.

### 2.4. Sequenciamento de Sanger

Os produtos de amplificação foram diluídos em 10x antes do sequenciamento no equipamento ABI3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems -Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante, em volume final de 10µL. Essa técnica foi validada no laboratório de imunogenética para a utilização de apenas um dos iniciadores específicos para os genes (*forward* ou *reverse*).

A etapa de purificação foi realizada por meio de precipitação com Etanol/EDTA de acordo com o protocolo do kit BigDye™ Terminator v3.1. As reações de sequenciamento purificadas e secas foram ressuspensas em 10µL de Hi-Di™ Formamida antes de enviar as amostras para eletroforese capilar. Os resultados foram analisados utilizando software *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

### 2.5. Testes estatísticos

Foi utilizado o programa SNPStats (11) para avaliar as frequências alélicas e haplotípicas, comparações das frequências entre pacientes e controles, risco de desenvolver hanseníase em indivíduos portadores de determinados alelos, através da determinação de OR, além da comparação da frequência observada dos genótipos com a esperada, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para todos os testes valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 3. RESULTADOS

Um total de seis SNPs foram analisados no gene *HLA-G* nos grupos casos e controles de Hanseníase. São eles: *rs1707*, *rs17179101*, *rs17179108*, *rs1063320*, *rs9380142* e *rs1610696*. Todas as amostras encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, no entanto, utilizando o menor valor de AIC para determinar o melhor modelo de herança genética, não foram observadas associações estatisticamente significativas nas variações genéticas analisadas nessas amostras, como é possível identificar nos *P*-valores que constam na Tabela 1. O programa também disponibilizou a combinação de oito possíveis blocos haplotípicos (Tabela 2).

**Tabela 1. Modelos de herança genética e associações de SNPs de *HLA-G***

<b><i>HLA -G exon 8 rs1707</i></b>					
<b>Modelo</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Controle N= 89</b>	<b>Caso N= 92</b>	<b>P - valor</b>	<b>AIC</b>
Codominante	T/T	70 (78,7%)	75 (81,5%)	0,73	256,5
	C/T	17 (19,1%)	16 (17,4%)		
	C/C	2 (2,2%)	1 (1,1%)		
Dominante	T/T	70 (78,7%)	75 (81,5%)	0,51	254,7
	C/T – C/C	19 (21,4%)	17 (18,5%)		
Recessivo	T/T – C/C	87 (97,8%)	91 (98,9%)	0,55	254,8
	C/C	2 (2,2%)	1 (1,1%)		
Superdominante	T/T – C/C	72 (80,9%)	76 (82,6%)	0,63	254,9
	C/T	17 (19,1%)	16 (17,4%)		
Multiplicativo log- aditivo	---	---	---	0,45	254,6
<b><i>HLA – G exon 8 rs17179101*</i></b>					
---	C/C	82 (92,1%)	87 (94,6%)	0,51	254,7
	A/C	7 (7,9%)	5 (5,4%)		
<b><i>HLA – G exon 8 17179108</i></b>					
Codominante	C/C	61 (68,5%)		0,34	255
	C/T	25 (28,1%)			
	T/T	3 (3,4%)			
Dominante	C/C	61 (68,5%)	72 (78,3%)	0,14	253
	C/T – T/T	28 (31,5%)	20 (21,7%)		
Recessivo	C/C – C/T	86 (96,6%)	90 (97,8%)	0,6	254,9
	T/T	3 (3,4%)	2 (2,2%)		
Superdominante	C/C – T/T	64 (71,9%)	74 (80,4%)	0,19	253,4
	C/T	25 (28,1%)	18 (19,6%)		
Multiplicativo log - aditivo	---	---	---	0,15	253,1
<b><i>HLA – G exon 8 rs1063320</i></b>					
Codominante	G/G	28 (31,5%)	26 (28,3%)	0,81	256,7
	C/G	40 (44,9%)	46 (50%)		
	C/C	21 (23,6%)	20 (21,7%)		
Dominante	G/G	28 (31,5%)	26 (28,3%)	0,78	255,1
	C/G – C/C	61 (68,5%)	66 (71,7%)		
Recessivo	G/G – C/G	68 (76,4%)	72 (78,3%)	0,64	254,9
	C/C	21 (23,6%)	20 (21,7%)		
Superdominante	G/G – C/C	49 (55,1%)	46 (50%)	0,52	254,7
	C/G	40 (44,9%)	46 (50%)		
Multiplicativo log - aditivo	---	---	---	0,92	255,1
<b><i>HLA – G exon 8 rs9380142</i></b>					
Codominante	A/A	46 (51,7%)	46 (50%)	0,63	256,2
	A/G	39 (43,8%)	39 (42,4%)		
	G/G	4 (4,5%)	7 (7,6%)		
Dominante	A/A	46 (51,7%)	46 (50%)	0,85	255,1
	A/G – G/G	43 (48,3%)	46 (50%)		
Recessivo	A/A – A/G	85 (95,5%)	85 (92,4%)	0,34	254,2

Superdominante	G/G	4 (4,5%)	7 (7,6%)	0,79	255,1
	A/A – G/G	50 (56,2%)	53 (57,6%)		
	A/G	39 (43,8%)	39 (42,4%)		
Multiplicativo log - aditivo	---	---	---	0,6	254,9
<b>HLA – G exon 8 rs1610696</b>					
Codominante	C/C	52 (58,4%)	51 (55,4%)	0,69	256,4
	C/G	31 (34,8%)	37 (40,2%)		
Dominante	G/G	6 (6,7%)	4 (4,3%)	0,6	254,9
	C/C	52 (58,4%)	52 (55,4%)		
Recessivo	C/G – G/G	37 (41,6%)	41 (44,6%)	0,61	254,9
	C/C – C/G	83 (93,3%)	88 (95,7%)		
Superdominante	G/G	6 (6,7%)	4 (4,3%)	0,44	254,5
	C/C – G/G	58 (65,2%)	55 (59,8%)		
Multiplicativo log - aditivo	---	---	---	0,8	255,1

N: tamanho da amostra

AIC: critério de informação Akaike

\*Por apresentar apenas dois genótipos o software não disponibiliza os modelos de herança genética

**Tabela 2. Possíveis blocos haplotípicos**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>rs1707</b>	T	T	T	C	T	T	T	T
<b>rs17179101</b>	C	C	C	C	C	C	A	C
<b>rs17179108</b>	C	C	C	C	T	C	T	T
<b>rs1063320</b>	C	G	G	C	G	C	G	C
<b>rs9380142</b>	G	A	A	A	A	A	A	A
<b>rs1610696</b>	C	G	C	C	C	C	C	C
<b>Frequência</b>	0,2762	0,2431	0,1575	0,1077	0,1022	0,0691	0,0331	0,011
<b>P-valor</b>	---	0,86	0,98	0,56	0,54	0,79	0,51	1

#### 4. DISCUSSÃO

Até o presente momento não há estudos publicados que associem os SNPs estudados nesta pesquisa com hanseníase. Sabe-se que variações genéticas em genes de resposta imune estão amplamente associadas com o desfecho, formas clínicas e gravidade da hanseníase. *HLA-G* é um dos genes de enfoque nessa relação de severidade e imunopatogenicidade da doença (12) e pode ter um papel importante na patogenicidade da Hanseníase, embora nossos achados não mostrem.

Como já citado nesse trabalho, *HLA-G* tem sido estudado como um gene de controle na resposta imune e conseqüentemente inflamatória por danos teciduais envolvidos nos processos de reconhecimento e ativação celular frente a um peptídeo apresentado. A proteína *HLA-G* é capaz de inibir a função citolítica e induzir a apoptose de TCD8+ e NK, evitando a proliferação de células B, TCD4+ e TCD8+, para direcionar células TCD4+ para um perfil imunossupressor e para tolerar células dendríticas. *HLA-G* também pode promover um perfil de citocinas Th2 e induzir a geração de células T regulatórias (7,8).

O presente estudo sugere a falta de associação entre variações genéticas do tipo SNP no *HLA-G* e a imunopatologia da hanseníase.

#### 5. CONCLUSÃO

Conclui-se com esse trabalho que os polimorfismos de nucleotídeo único de *HLA-G* *rs1017*, *rs17179101*, *rs17179108*, *rs1063320*, *rs9380142* e *rs1610696* não estão associados com a imunopatogenicidade da hanseníase. Foi possível determinar os blocos haplotípicos, no entanto também não tiveram significância estatística. Torna-se interessante estudar as associações desses e outros SNPs em mais indivíduos e com a gravidade da doença, e também a presença das variações genéticas nos genes ligantes de *HLA-G*: *LILRB1* e *LILRB2*, bem como a investigação das formas paucibacilar e multibacilar da doença.

#### FINANCIADORES

CAPES, CNPq e Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (nº1589/2017-CSD-UEM).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia e ao Laboratório de Imunogenética da UEM, bem como professores e colegas pesquisadores.

## REFERÊNCIAS

1. Aguiar CX, Barbosa JWP, Oliveira RC, Silva SC, Souza DA, Fernandes TRMO. Hanseníase: estudo epidemiológico no município de Juazeiro -BA (2018-2020). *Revista de Ensino, Ciência e Inovação em Saúde*. 2021 Mar; 2(1): 19.
2. Health World Organization. *Weekly Epidemiological Report* 2020 Set.
3. Araújo MG. Leprosy in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003 Maio; 36(3): 376-380.
4. Organização Mundial da Saúde. Leprosy (Hansen's disease) [acesso em 20 jun 2021]. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/leprosy#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/leprosy#tab=tab_2)
5. Fitness J, Tosh K, Hill AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. *Genes and Immunity*. 2002 Dec;3(8):441-53
6. Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends in Immunology*. 2008 Jul;29(7):313–21.
7. Arnaiz-Villena A, Juarez I, Suarez-Trujillo F, López-Nares A, Vaquero C, Palacio-Gruber J, et al. HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *International Journal of Immunogenetics*. 2021 Abril;48(2):172–92.
8. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011 Fev;68(3):369–95.
9. Silva CR, Sampaio LHF, Costa MB, Cysneiros MAPC, Sadissou IA, Castilho MLOR, et. al. Analysis of HLA-G protein expression in leprosy. *Immunogenetics*. 2020 Jul; 72:333-337.
10. Moraes AG, Ayo CM, Elpídio LNS, Souza VH, Yamanaka AHU, Nogueira ML, et.al. HLA-G, LILRB1, LILRB2 variants in zika vírus transmission from mother to child in a population of south and southeast of Brazil. *Current issues in molecular biology*. Jun 2022 27;44(7):2783-2793
11. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics applications note*. 2006 Aug 1;22(15):1928-9.
12. Silva NL, Teixeira MAG, Ramos AL, Albuquerque RS, Diniz GTN, Mendes-Junior CT, et al. The +3187 A/G polymorphic site is associated with polar forms and reactive reaction in leprosy. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2013 Sep;1(3):123-30.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*; hanseníase; imunogenética.



## **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS ALELOS HLA DE CLASSE I NA PATOGÊNESE DA ESPONDILITE ANQUILOSANTE EM UMA POPULAÇÃO DA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

**Felipe Cayres Nogueira da Rocha Loures<sup>1</sup>; Letícia Cristina de Almeida Silva<sup>2</sup>; Victor Hugo de Souza<sup>3</sup>; Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka<sup>3</sup>; Fernanda Pelisson Massi<sup>4</sup>; Jeane Eliete Laguila Visentainer<sup>5</sup>; Quirino Alves de Lima Neto<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 de Bioquímica, 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>Pós-Doutorando, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

e-mail: [feliperochaloures85@gmail.com](mailto:feliperochaloures85@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

As Espondiloartrites (EpA) compreendem um grupo de doenças reumáticas imunomediadas e com um perfil inflamatório crônico. Possuem características comuns que permitem englobá-las nesse grupo, tais como a associação com o alelo HLA-B\*27, a soronegatividade para o fator reumatóide, manifestações axiais, acometimento das vértebras, articulações sacrílicas, pelve, e manifestações periféricas, como a artrite, espondilite, entesite, dactilite e uveíte (1).

A Espondilite Anquilosante (EA) é a forma mais frequente, podendo evoluir para a rigidez e limitação funcional progressiva do esqueleto axial. Sua prevalência é de 0,1-1,4% na população e geralmente inicia na 2ª e 4ª décadas da vida, com predomínio no sexo masculino, cor branca e em indivíduos HLA-B\*27 positivos (2). Para melhor compreensão da causa e características clínicas, tem-se buscado compreender genótipos específicos para sua expressão. A EA tem etiologia genética complexa e os mecanismos não foram totalmente elucidados. Recentes avanços técnicos em genotipagem e colaborações internacionais montando grandes grupos de pacientes têm levado a uma riqueza de novos dados (3,4).

Grande parte da variação genética humana é representada por Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e acredita-se que muitos deles causam diferenças fenotípicas entre os indivíduos (5). No caso da EA, há associação com o alelo HLA-B\*27, o qual pertence ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), os genes mais polimórficos no genoma humano. As proteínas do MHC também são conhecidas como Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), e são divididas em dois grupos: HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) e HLA de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP). O alelo HLA-B\*27 é encontrado em 80 a 90% da população com EA, em comparação com 6 a 9% da população em geral. Entretanto, apenas uma minoria portadora do alelo (1-5%) desenvolve a doença. O mecanismo molecular pelo qual a proteína HLA-B\*27 atua causando a associação deste alelo com a EA, ainda não foi completamente compreendido (6).

As moléculas do MHC são proteínas de superfície celular que desempenham um papel essencial na defesa imunológica, principalmente na apresentação de antígenos para os linfócitos T por meio das células apresentadoras de antígenos. No entanto, essa não é a única função. Elas também desempenham uma função importante na regulação da resposta imune gerada pelas células *Natural Killer* (NK) (7, 8). Sua contribuição nas doenças autoimunes vem sendo estudada e muitos trabalhos têm proposto um papel importante, no surgimento, progressão e resolução destas doenças. Elas podem atuar nas doenças através da citotoxicidade dependente de células NK, assim como por meio da secreção de citocinas inflamatórias que regulam a resposta imune (9-11). Algumas destas patologias estão associadas a certos genes que codificam proteínas que agem como ligantes para receptores de células NK, esse é o caso das moléculas HLA, que podem assim alterar e afetar a função dessas células. Por exemplo, uma disfunção na propriedade

regulatórias poderiam terminar com a falha no controle da resposta de células T autorreativas e, deste modo, contribuir com a patogênese dessas doenças (12).

As células NK são condicionadas e reguladas para tolerar e não responder as células normais, e atacar as células infectadas ou com alterações tumorais. Para responder de maneira adequada a todo esse controle, elas contam com uma série de receptores celulares ativadores e inibitórios. Dentre esses receptores, podemos citar como principais: Receptores de Lectina do tipo C e os receptores KIR (*Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors*) (8,13). Em humanos foram identificados até agora 17 genes *KIR*, que são altamente homólogos (14). Os principais ligantes dos receptores KIR são as proteínas HLA de classe I. Alguns deles parecem ter uma afinidade de ligação as moléculas de HLA-C dos grupos C1 e C2, dentre eles podemos citar: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DS1 e KIR2DS2 (15). Embora não esteja muito claro qual o papel dos receptores KIR e das células NK no desenvolvimento das doenças autoimunes, sabe-se que em pacientes portadores dessas doenças, há uma baixa concentração de células NK no sangue periférico, assim como um acúmulo delas nos tecidos afetados pela doença (10,16)

Assim, este trabalho teve objetivo de investigar a influência dos alelos HLA pela metodologia PCR-SSOR (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide Reverse*) de Classe I HLA-A, -B e -C na patogênese da EA, visto que o conhecimento de novos marcadores genéticos na patogênese desta condição, pode definir novas implicações diagnósticas e terapêuticas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Casuística

Neste estudo caso-controle foram incluídos 46 pacientes com EA adultos não aparentados, classificados pelos critérios ASAS 2009 (17) e residentes da região norte do estado do Paraná. Os pacientes que participaram do estudo foram triados de clínica de reumatologia localizada na cidade de Maringá/PR. O grupo controle foi constituído por 48 indivíduos sem a doença. Pacientes e controles foram esclarecidos sobre o propósito da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi executado conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Parecer COPEP no 687.222/14, CAAE 27723114.0.0000.0104).

### 2.2. Extração de DNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA. O DNA foi extraído a partir do sangue total por kit comercial BioPur Kit Extração Mini Spin Plus (BioPur, BR) conforme recomendações do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram analisadas pela medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (NanoDrop 2000R, Thermo Scientific).

### 2.3. Tipificação dos genes HLA-A, HLA-B e HLA-C

HLA-A, -B, -C foram tipificados pela metodologia PCR-SSOR (*Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Reverse*) com tecnologia Luminex™ usando o kit LABType™ CWD (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA) com baixa /média resolução de acordo com as instruções do fabricante. Nesta técnica, o DNA foi primeiro amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando *primers* biotinilados específicos. Subsequentemente, o DNA amplificado foi hibridizado com sondas que estão conectadas a microesferas fluorescentes marcadas com estreptavidina conjugada com R-Ficoeritrina (SAPE). A hibridização foi verificada pela intensidade de fluorescência usando citometria de fluxo (FLEXMAP 3DTM Instrument Systems). Os resultados foram interpretados por meio do *software* HLA FUSION, versão 4.6 (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, EUA).

### 2.4. Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta através do pacote de programas ALERQUIN. A contagem direta e o teste do Qui-Quadrado correção de Yates foram utilizados para verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas de cada grupo das amostras pacientes e controle. As diferenças foram estatisticamente significativas nos casos em que  $P \leq 0,05$ . Nos casos em que a diferença entre as frequências alélicas ou genotípicas de pacientes e controles apresentarem significância estatística, foi calculado Odds Ratio (OR ou razão de probabilidade).

## 3. RESULTADOS

A média de idade foi  $43,04 \pm 13,45$  e  $41,33 \pm 13,53$  para pacientes e controles, respectivamente. Não foram observadas diferenças na distribuição de sexo dentro de pacientes e controles ( $P > 0,05$ ), sugerindo o adequado pareamento. Na população estudada houve uma significância estatística (P-Valor  $<0,001$ ) para doença ocorrer em mulheres em relação aos homens, diferindo da literatura. As características gerais da população de estudo estão compiladas na tabela 1.

**Tabela 1: Características gerais de controles e pacientes com espondilite anquilosante**

Pacientes N = 46	Controles N = 48	P-valor	OR (IC)
n (%)	n (%)		

Idade (anos ± DP)		43,04 ± 13,45	41,33 ± 13,53		<0,05
Sexo	Feminino	32 (65,56)	30 (62,5)	<b>&lt;0,001</b>	0,25 (0,13-0,48)
	Masculino	14 (30,44)	18 (37,5)		
Etnia	Branco	42 (91,30)	43 (89,58)		
	Mulato	3 (6,52)	5 (10,42)		<0,05
	Negro	1 (2,17)	0 (0,0)		

N= número total da população, n = número de indivíduos, OR= Odds Ratio, IC = intervalo de confiança, DP= desvio padrão

As frequências dos alelos de HLA-A, -B, -C estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de pacientes e controles ( $P > 0,05$ ). O alelo A\*02 foi o mais frequente em pacientes e controles, 0,30% e 0,22% respectivamente, seguido do alelo A\*01 para pacientes (0,12%) e A\*24 para controles (0,17%) (tabela 2). Porém, após realizada análise multivariada por regressão logística não foi possível observar diferença estatística para o gene de *HLA-A* em controles e pacientes com EA.

Em relação as frequências do HLA-B, dentro do grupo de controles o alelo mais frequente foi B\*35 (0,18%), diferentemente do grupo de pacientes no qual o alelo mais frequente foi o B\*27 (0,16%) (Tabela 2). Mesmo com a alta incidência do alelo B\*27 nos pacientes, não foi possível realizar a análise multivariada por regressão logística, uma vez que dentro do grupo de controles não foi observado o alelo B\*27, impossibilitando a análise do risco para EA.

**Tabela 2: Distribuição da frequência dos alelos para os genes HLA-A, -B e -C em pacientes com espondilite anquilosante e controles**

Alelos	HLA-A				HLA-B				HLA-C					
	Paciente		Controle		Paciente		Controle		Paciente		Controle			
	N = 46	N = 46	N = 46	N = 46	N = 46	N = 48	N = 46	N = 48	N = 46	N = 48				
	n	(%)	n	(%)	Alelos	n	(%)	n	(%)	Alelos	n	(%)	n	(%)
A*02	28	0,30	20	0,22	B*27	15	0,16	0	0,00	C*07	22	0,24	25	0,26
A*01	11	0,12	7	0,08	B*51	11	0,12	9	0,09	C*04	16	0,17	20	0,21
A*24	10	0,11	16	0,17	B*35	10	0,11	17	0,18	C*02	11 <sup>a</sup>	0,12	4	0,04
A*68	10	0,11	7	0,08	B*44	8	0,09	14	0,15	C*03	8	0,09	4	0,04
A*03	7	0,08	11	0,12	B*15	7	0,08	7	0,07	C*01	7	0,08	2	0,02
A*32	5	0,05	4	0,04	B*40	6	0,07	6	0,06	C*06	5	0,05	7	0,07
A*11	4	0,04	5	0,05	B*08	5	0,05	7	0,07	C*15	5	0,05	7	0,07
A*29	4	0,04	6	0,07	B*18	5	0,05	2	0,02	C*14	4	0,04	1	0,01
A*31	4	0,04	3	0,03	B*39	4	0,04	4	0,04	C*16	4	0,04	9	0,09
A*23	2	0,02	4	0,04	B*07	3	0,03	7	0,07	C*05	3	0,03	6	0,06
A*26	2	0,02	2	0,02	B*37	3	0,03	0	0,00	C*12	3	0,03	5	0,05
A*33	2	0,02	2	0,02	B*49	3	0,03	5	0,05	C*17	3	0,03	2	0,02
A*25	1	0,01	3	0,03	B*42	2	0,02	0	0,00	C*08	1	0,01	4	0,04
A*30	1	0,01	2	0,02	B*55	2	0,02	0	0,00					
A*34	1	0,01	0	0,00	B*57	2	0,02	2	0,02					
					B*14	1	0,01	4	0,04					
					B*38	1	0,01	1	0,01					
					B*41	1	0,01	2	0,02					
					B*47	1	0,01	0	0,00					
					B*48	1	0,01	0	0,00					
					B*52	1	0,01	1	0,01					
					B*13	0	0,00	2	0,02					
					B*45	0	0,00	2	0,02					

B*53	0	0,00	3	0,03
B*56	0	0,00	1	0,01

N = número total da população, n = número de indivíduos

\* OR = 4,38; 95% CI (1,30–17,8); P = 0.024, Pc = 0.192.

O alelo C\*07 foi o mais frequente em pacientes e controles, 0,24% e 0,26%, respectivamente. O alelo C\*02 foi mais presente em pacientes quando comparado a controles (0,12% vs. 0,04%), respectivamente (tabela 2). A análise multivariada por regressão logística mostrou risco aumentado em 3X para o desenvolvimento da EA quando comparado com controles sem a doença (OR= 4,38; IC= 1.30 - 17.8; P= 0,02). Porém, após a correção por Bonferroni, essa associação foi perdida (Pc= 0,19).

#### 4. DISCUSSÃO

As frequências dos alelos de HLA-A, -B, -C foram obtidas a partir da genotipagem dos indivíduos portadores de EA e dos indivíduos controle. O alelo A\*02 foi o mais frequente em pacientes e controles, 0,30% e 0,22% respectivamente. Na base de dados para frequência dos alelos HLA na população é possível observar uma frequência em torno de 28% para o alelo A\*02 na população paranaense de doadores voluntários de medula óssea escritos no REDOME, o que demonstra que nossa análise está de acordo com o esperado na literatura (18). No entanto, apesar do alelo A\*02 possuir uma *Odds Ratio* de 1,87 para o desenvolvimento de EA, como demonstrado na tabela 3, esta associação não possui um valor estatisticamente significativo (P=0,09).

Com relação ao *locus* B, o alelo HLA-B\*27 foi encontrado como mais frequente nos pacientes portadores de EA. Este resultado já era esperado uma vez que há uma alta incidência deste alelo nestes pacientes, sendo o mesmo considerado um fator de predisposição para EA em indivíduos portadores (2). Não foi observado nenhum indivíduo com a genotipagem B\*27 no grupo controle, o que pode ser devido ao fato de termos analisado apenas 48 indivíduos nesse grupo e poderíamos não encontrar um portador desse alelo uma vez que sua frequência na população paranaense é em torno de 2,7% (19). O alelo B\*35, que apresentou uma frequência menor nos pacientes, quando comparado ao grupo controle (11% e 18%, respectivamente), também está de acordo com a base de dados para a frequência dos alelos HLA na população brasileira, visto que já foi observado uma frequência de 12% na população paranaense e uma frequência de 17,5% quando analisado uma população em Belém/PA (20, 21).

Já para os alelos do gene HLA-C, o alelo mais frequente foi o C\*07, tanto para os pacientes portadores de EA quanto para os indivíduos do grupo controle 22% e 25%, respectivamente. Este valor está de acordo com o valor de 27% observado em uma população de Curitiba (22). No entanto nenhuma associação significativa foi encontrada para esse alelo. Nós observamos uma associação significativa para o alelo C\*02 (OR = 4.38, 95% CI = 1.30–17.8; p = 0.024), que demonstra um maior risco no desenvolvimento de EA nos indivíduos que possuem este alelo. O alelo C\*02 foi encontrado em uma frequência de 5,5% em uma população de Curitiba (21), próximo ao que observamos para o grupo controle (4%), mas bem inferior ao valor de 11% que encontramos para os pacientes com EA. O alelo C\*02 demonstrou ser um fator de risco (OR = 5.40, 95% CI = 2.17–14.40, P < 0.0005) para o desenvolvimento de artrite psoriática em um grupo de pacientes tratados em um hospital universitário na Polônia (23). Um estudo chinês que avaliou 119 pacientes com EA e 128 indivíduos sem a doença, encontrou uma associação significativa entre o alelo C\*02 e o desenvolvimento da doença, sendo que a frequência deste alelo foi de 6,25% no grupo controle e 37,82% nos pacientes com EA (24).

#### 5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que indivíduos portadores do alelo C\*07 conferem maior risco para o desenvolvimento da EA, enquanto aqueles que possuem o alelo B\*35 parecem ter um menor risco. Em relação ao alelo B\*27, não foi possível realizar sua avaliação multivariada, visto que dentro do grupo controle não foi observado sua presença.

#### FINANCIADORES

Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá – LIG/UEM, CAPES e CNPq.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do LIG/UEM e o Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá.

#### REFERÊNCIAS

1. Garg N, van den Bosch F, Deodhar A. The concept of spondyloarthritis: where are we now? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014 Oct;28(5):663-72



2. Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet*. 2007 Apr 21;369(9570):1379-1390
3. Clark A, Vys TJ. Genetics of Rheumatic Disease Arthritis. *Research & Therapy*. 2009, 11(5):248-17
4. Takakubo Y, Konttinen YT. Immune-regulatory mechanisms in systemic autoimmune and rheumatic diseases. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011, 2012.
5. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*. 2002 30(17):3894-900.
6. Cortes, A.; Hadler, J.; Pointon, J.P.; Robinson, P.C.; Karaderi, T.; Leo, P.; Cremin, K.; Pryce, K.; Harris, J.; Lee, S.; et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat. Genet.* 2013, 45, 730–738.
7. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):461-9
8. Carrillo-Bustamante P, Keşmir C, de Boer RJ. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics*. 2016 Jan;68(1):3-18
9. Cauli A, Piga M, Dessole G, Porru G, Floris A, Vacca A, Desogus E, La Nasa G, Mathieu A. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA-class I heavy chains in ankylosing spondylitis. *Drug Dev Res*. 2014 Nov;75 Suppl 1:S15-9
10. Kucuksezer UC, Aktas Cetin E, Esen F, Tahrali I, Akdeniz N, Gelmez MY, Deniz G. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2021 Feb 25;12:622306
11. Gardner G, Fraker CA. Natural Killer Cells as Key Mediators in Type I Diabetes Immunopathology. *Front Immunol*. 2021 Aug 20;12:722979
12. Liu M, Liang S, Zhang C. NK Cells in Autoimmune Diseases: Protective or Pathogenic? *Front Immunol*. 2021 Mar 12;12:624687
13. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol*. 2008 Dec;20(6):343-52
14. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev*. 2001 Jun;181:20- 38
15. Akhtari M, Farazmand A, Mahmoudi M, Akbarian M, Ahmadzadeh N, Mirkazemi Z, Mostafaei S, Jamshidi AR. Analysis of killer cell immunoglobulin-like receptors and their human leukocyte antigen-ligands gene polymorphisms in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2016 Oct;25(11):1244-53
16. Fogel LA, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther*. 2013 Jul 11;15(4):216
17. Rudwaleit M et. al *Ann Rheum Dis* 2009;68: 777-783
18. Rede Brasil de Imunogenética : <http://imunogenetica.org/>
19. M. da Graça Bicalho, *Transplantation Proceedings* 2005: 37: 2293
20. Rede Brasil de Imunogenética, <http://imunogenetica.org>
21. Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues FM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, Oliveira LF, Henderson BL, Castro AP, Maia MH, Barbosa FB, Santos SE, Guerreiro JF, Sena L, Santos EJ. *Human Immunology* 70 (2009) 179-183
22. Probst CM, Bompeixe EP, Pereira NF, de O Dalalio MM, Visentainer JE, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contributions to the white and mulatto.
23. Sokolik R, Gębura K, Iwaszko M, Świerkot J, Korman L, Wiland P, Bogunia-Kubik K. Significance of association of HLA-C and HLA-E with psoriatic arthritis. *Hum Immunol*. 2014 Dec;75(12):1188-91
24. Jiao YL, Ma CY, Wang LC, Cui B, Zhang J, You L, Chen ZJ, Li JF, Zhao YR. Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin Immunol*. 2008 Jul;28(4):343-9

**Palavras-chave:** Doenças Autoimunes, Espondilite Anquilosante, Antígenos HLA.



## AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS $FY^*A$ E $FY^*B$ DO ANTÍGENO ERITROCITÁRIO DUFFY EM PACIENTES COM DIFERENTES QUADROS CLÍNICOS DE COVID-19

**Kelly Silvério Góis<sup>1</sup>; Victor Hugo de Souza<sup>2</sup>; Quirino Alves de Lima Neto<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>3</sup>Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR  
e-mail: gois.ks@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) foi detectada pela primeira vez na China em dezembro de 2019 afetando o mundo todo em pouco tempo, sendo que em março de 2020 foi declarada como pandemia. O agente responsável pela COVID-19 é um vírus encapsulado de RNA de fita simples pertencente à família *Coronaviridae* denominado como SARS-CoV-2 (1).

A principal forma de transmissão do SARS-CoV-2 é de pessoa para pessoa por meio de gotículas de secreção muco respiratórios expelidas através da fala, espirros e tosse (2). As manifestações clínicas do COVID-19 são variadas e apresentam-se de forma assintomática e sintomática. Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os casos sintomáticos como leves, moderados, graves e críticos, de acordo com os sintomas clínicos, associados aos achados laboratoriais e radiográficos do paciente. De forma geral, os sintomas associados a COVID-19 leve são: febre, tosse, mialgia, anosmia e disgeusia. Os casos moderados são caracterizados por sintomas associados a pneumonia aguda; e os casos graves e críticos estão associados aos quadros de pneumonia grave, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e sepse (3, 4).

Sabe-se que fatores genéticos e algumas comorbidades estão associados aos diferentes quadros clínicos apresentados pela COVID-19, porém a resposta imune contra o vírus não é completamente compreendida. Os pesquisadores identificaram características comuns em pacientes graves, como baixos níveis de linfócitos na corrente sanguínea, aumento de proteína C reativa e de citocinas pró-inflamatórias, padrões inflamatórios exacerbados, hipercoagulação e lesão de múltiplos órgãos. A pneumonia após a infecção do SARS-CoV-2 é o resultado de múltiplas infiltrações de células inflamatórias e grande quantidade de citocinas que levam a lesão pulmonar aguda seguida de SDRA (5, 6).

O antígeno eritrocitário Duffy (FY) é uma glicoproteína transmembrana de múltipla passagem que é expressa nos eritrócitos e em diferentes tecidos, tais como pulmonar, esofágico e adiposo (7). Possui dois epítomos de maior importância o  $Fy^a$  e  $Fy^b$ , que se comportam como antígenos de membrana e são produtos dos alelos codominantes  $FY^*01$  e  $FY^*02$  do gene *ACKR1* (receptor de quimiocina atípico 1). Eles são caracterizados pelo polimorfismo rs12075 (125G>A) (8-10). A ocorrência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região promotora GATA-1 (-67T>C - rs2814778) do alelo  $FY^*02$  leva a supressão da expressão eritróide do antígeno  $Fy^b$ , mutação essa detectada em grande percentual de indivíduos negros e descendentes, levando ao fenótipo "*Duffy null*"  $Fy(a-b)$  (11, 12).

O antígeno Duffy também denominado como proteína DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*), desempenha um importante papel na resposta imune, atuando como receptor de quimiocinas das famílias CC e CXC, como a MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócito), CCL5 (RANTES) e especialmente a IL-8 (Interleucina-8), relacionadas a resposta imune exacerbada em pacientes graves e críticos da COVID-19 (5, 9). Desta forma, a proteína DARC mantém os níveis homeostáticos de quimiocinas circulantes e modula o gradiente celular entre os tecidos e o sangue para mediar o influxo de neutrófilos e monócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos durante as respostas imunes (13).

Neste contexto, o intuito deste trabalho é analisar a influência dos alelos *FY\*A* e *FY\*B* do antígeno eritrocitário Duffy em uma amostragem de pacientes com quadros clínicos moderado e grave de COVID-19.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Pacientes e seleção de amostras

O estudo foi realizado com 107 pacientes hospitalizados por COVID-19, no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HU-UEL), que apresentaram as formas moderadas, graves e críticas da doença de acordo com a classificação da OMS. Neste estudo os pacientes graves e críticos foram agrupados em um mesmo grupo, denominados como graves. O trabalho foi executado seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (Parecer COPEP nº 4.053.033). Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes em tubo de EDTA, posteriormente processadas, separado o *buffy-coat* e encaminhados para análise.

### 2.2. Extração do DNA

O DNA das amostras selecionadas foi extraído a partir de *buffy-coat* através do kit QIAamp® DNA blood mini kit (Qiagen, Valencia, CA). A concentração e a qualidade do DNA extraído foram determinadas em equipamento Nanodrop 2000® (Wilmington, USA).

### 2.3. Genotipagens

A genotipagem dos antígenos *Duffy* para os alelos *FY\*01* e *FY\*02* foram realizadas através da técnica de reação em cadeia polimerase *primers* sequência específicos (PCR-SSP). Para amplificação do DNA foi utilizado *primers* específicos combinado com *primer* complementar comum. Como controle interno da reação foi utilizado o gene do hormônio do crescimento humano (*hGH*). As condições da reação para amplificação dos dois alelos foram: Volume final da reação foi de 10 µL contendo tampão 0,5X Buffer Green; 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 2,0 ng/ul de cada *primer*; 0,4U de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY). A visualização dos amplicons foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2% contendo *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY) em gradiente de 150V-300mA por 20 minutos. As bandas formadas após a amplificação foram reveladas em fotodocumentador.

### 2.4. Análise estatística

Os testes de associação e análise descritiva das variáveis foram obtidos utilizando o *software* SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>). Os testes utilizados foram baseados em regressão logística considerando como desfecho casos e controles. A análise dos SNPs foi feita em diferentes modelos de herança genética (codominante, dominante, recessivo, sobredominante e log-aditivo) escolhidos conforme o critério de Akaike (determinado pelo índice AIC). Os ajustes dessa análise foram feitos para possíveis interações com as covariáveis descritas. Os resultados foram expressos em *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%. Para análise de múltiplos alelos, o SNPStats utiliza-se de um algoritmo de máxima verossimilhança, indicando frequências estimadas de haplótipos, bem como sua associação com a doença. A distribuição da frequência dos genótipos foi avaliada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Um P-valor <0,05 foi considerado como significativo para todos os testes. A análise do poder estatístico foi feita utilizando o *software* QUANTO.

## 3. RESULTADOS

O estudo foi realizado com 107 pacientes diagnosticados com COVID-19, no qual 45 foram classificados como moderado e 62 classificados como graves. As características dos pacientes estudados estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1. Características de pacientes com quadros clínicos moderado e grave de COVID-19.**

Características	Moderado		Grave		Total	
	N=45	%	N=62	%	N=107	%
Idade (D.P)	60,9 (±16,6)	-	69,4 (±16,7)	-	65,8 (±16,9)	-
Sexo	Feminino	18 40	28 45	45	46 61	43 61
	Masculino	27 60	34 55	55	61 77	61 77
Etnia	Branco	34 76	48 77	77	82 77	77
	Outros (não brancos)	11 24	14 23	23	25 23	23

<b>Diabetes</b>	Sim	13	29	20	32	33	31
	Não	32	71	42	68	74	69
<b>Doenças cardiovasculares</b>	Sim	23	51	40	65	63	59
	Não	22	49	22	35	44	41
<b>Fumantes</b>	Sim	10	22	8	13	19	17
	Não	35	78	54	87	89	83

A média de idade dos pacientes com COVID-19 moderada foi  $60,9 \pm 16,6$  anos; para os pacientes graves  $69,4 \pm 16,7$  anos. A maioria dos pacientes estudados foi do sexo masculino (61%), autodeclarados brancos (77%), não diabéticos (69%) e não eram fumantes (83%). Quanto a doenças cardiovasculares observou-se um maior número de pacientes (59%) com esta comorbidade. Apesar disso, não foram observadas diferenças destas covariáveis entre os pacientes com COVID-19 ( $P > 0,05$ ).

Os valores obtidos nas análises de frequência dos alelos estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2. Frequência dos alelos dos antígenos Duffy em pacientes com COVID-19.**

Alelos Duffy	Moderado N=45		Grave N=62	
	N	%	N	%
<i>FY*A</i>	26	29	49	40
<i>FY*B</i>	64	71	75	60

A análise das frequências mostrou que o alelo *FY\*B* foi mais frequente dentre os pacientes com COVID-19 moderados e grave. Apesar disso, não houveram diferenças significativas na comparação entre os grupos de COVID-19 ( $P > 0,05$ ), porém foi possível notar a tendência de maior frequência do alelo *FY\*A* em pacientes do grupo grave quando comparado como grupo moderado.

A análise dos SNPs e seus genótipos nos diferentes modelos de herança genética, os valores da OR e Intervalo de Confiança (IC) estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Frequência dos genótipos dos antígenos de Duffy com as diferentes formas clínicas da COVID-19\*.**

Modelos	Genótipos	Moderado		Grave		OR (95% IC)	P-valor	AIC	BIC	
		N	%	N	%					
Codominante	B/B	24	53,3	28	45,2	1,0	-	0,32	151,3	178
	A/B	16	35,6	19	30,6	1,12	(0,44 – 2,82)			
	A/A	5	11,1	15	24,2	2,49	(0,72 – 8,67)			
Dominante	B/B	24	53,3	28	45,2	1,00	-	0,38	150,8	174,8
	A/B – A/A	21	46,7	34	54,8	1,45	(0,63 – 3,33)			
Recessivo	B/B – A/A	40	88,9	47	75,8	1,00	-	0,14	149,3	173,4
	A/A	5	11,1	15	24,2	2,38	(0,73 – 7,78)			
Sobredominante	B/B – A/A	29	64,4	43	69,3	1,00	-	0,79	151,5	175,5
	A/B	16	35,6	19	30,6	0,89	(0,37 – 2,13)			
Log-aditivo	-	-	-	-	-	1,46	(0,83 – 2,58)	0,18	149,8	173,8

\* Considerando n =107 ajustado pelas covariáveis sexo, etnia, idade, diabetes, doenças cardiovasculares e fumantes. A distribuição da frequência dos genótipos apresentou diferença entre os grupos quando avaliadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo o P-valor para o grupo moderado foi 0,46 e para o grupo grave 0,007, respectivamente.

Nesta análise observa-se que o genótipo *FY\*A/FY\*A* encontrasse em maior frequência no grupo de pacientes graves (24,2%) quando comparado com a sua frequência no grupo de pacientes moderados (11,1%). O p-valor desta associação foi de 0,14, que nesta análise não apresentou associação significativa entre genótipos e as diferentes formas da doença em qualquer modelo de herança analisado.

A análise do poder estatístico foi maior que 80% somente a partir de uma OR de 3,5; indicando um baixo poder estatístico para qualquer efeito menor que isso.

#### 4. DISCUSSÃO

Na população Latino Americana a frequência do alelo *FY\*A* é de 31% (14), podemos observar que apresentou uma tendência do que é previsto na frequência deste alelo no grupo de pacientes graves (40%).

Quanto a frequência dos genótipos dos antígenos Duffy levou-se em consideração o modelo de herança genética recessivo, pois este apresentou um menor valor de AIC (149,3), o genótipo *FY\*A/FY\*A* embora em maior frequência no grupo de pacientes graves não mostrou associação com a COVID-19. Uma das possíveis causas deste resultado pode estar relacionada com o pequeno número de amostras analisadas (45 moderados e 62 graves), que apresentou um baixo poder estatístico, porém parece que a presença do alelo *FY\*A* pode ter uma propensão as formas graves da doença.

Alguns trabalhos evidenciam que o antígeno Duffy na superfície dos eritrócitos tem o papel de “neutralizar quimiocinas” removendo-as dos locais onde são produzidas em excesso, e o Duffy endotelial reduz a concentração de quimiocinas solúveis nos espaços aéreos pulmonares inflamados (15, 16). Isso pode ter relação com o desenvolvimento da COVID-19, uma vez que o Duffy é receptor de IL-8 e está diretamente associado a reação imunológica exacerbada em pacientes graves e críticos da doença (5,9).

Outros estudos também demonstram que os antígenos Duffy modulam os efeitos de quimiocinas pró-inflamatórias em células endoteliais que revestem vênulas pós-capilares e a migração de leucócitos para locais de inflamação por meio de transcitose mediado por quimiocinas. Além disso, a proteína DARC foi descrito como um facilitador na passagem de quimiocinas através do endotélio aumentando o recrutamento de neutrófilos impulsionado pela IL-8 para os pulmões (17).

Indivíduos que apresentam o SNP na região promotora (-67T>C rs2814778) do alelo *FY\*02* em homozigose apresentam comprometimento do controle da resposta inflamatória (18-19). Um estudo recente mostrou que pacientes portadores do alelo variante do *FY\*B* teve associação com pacientes que desenvolveram formas mais graves da COVID-19 e necessitaram de internação. Levando à percepção do desempenho dos antígenos Duffy na remoção de quimiocinas do processo inflamatório da doença (20).

#### 5. CONCLUSÃO

Através dos resultados preliminares foi possível analisar as frequências dos alelos *FY\*A* e *FY\*B*, sendo o alelo *FY\*A* o mais frequente em pacientes do grupo grave, desta forma, este pode ter uma influência no desenvolvimento das formas graves da COVID-19. Entretanto é estritamente necessário aumentar o número de indivíduos analisados e realizar um estudo de associação, entre o gene do antígeno eritrocitário Duffy e o gene *CXCL8* (*IL-8*) bem como seus alelos variantes, nas diferentes formas clínicas da COVID-19.

#### FINANCIADORES

Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG/UEM).

#### REFERÊNCIAS

1. Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, Xiang ZC, Guo L, Xu T, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(9):1015-24.
2. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*. 2020;41(12):1100-15.
3. World Health Organization. Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020. No. WHO/2019-nCoV/clinical/2020.5. World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332196/WHO-2019-nCoV-clinical-2020.5-ara.pdf>
4. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
5. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;53:25-32.

6. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Frydas I, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34(2):327-31.
7. National Library of Medicine [Internet]. Gene: ACKR1 atypical chemokine receptor 1-Duffy blood group-*Homo sapiens* (human) [acesso em 01 ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2532>
8. Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid M. Fundamentos de imuno-hematologia. São Paulo: Atheneu. 2015:1-24.
9. Novitzky-Basso I, Rot A. Duffy antigen receptor for chemokines and its involvement in patterning and control of inflammatory chemokines. *Front Immunol*. 2012;3:266.
10. Łukasik E, Waśniowska K. Duffy blood group antigens: structure, serological properties and function. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2016;70:143-61.
11. Castilho L, Rios M, Pellegrino J, Jr., Saad ST, Costa FF, Reid ME. A novel FY allele in Brazilians. *Vox Sang*. 2004;87(3):190-5.
12. Jens E, Pagliarini T, Novaretti MC. Duffy blood group system: biology and transfusion practice. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2005;27:110-9.
13. Höher G, Fiegenbaum M, Almeida S. Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood Transfus*. 2018;16(1):93-100.
14. National Library of Medicine [Internet]. dbSNP Short Genetic Variation - rs12075 [acesso em 01 ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12075>.
15. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(6):687-94.
16. Lee JS, Wurfel MM, Matute-Bello G, Frevert CW, Rosengart MR, Ranganathan M, et al. The Duffy antigen modifies systemic and local tissue chemokine responses following lipopolysaccharide stimulation. *J Immunol*. 2006;177(11):8086-94.
17. Lee JS, Frevert CW, Wurfel MM, Peiper SC, Wong VA, Ballman KK, et al. Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2003;170(10):5244-51.
18. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hébert CA, Valente AJ, et al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1362-9.
19. Mangalmurti NS, Xiong Z, Hulver M, Ranganathan M, Liu XH, Oriss T, et al. Loss of red cell chemokine scavenging promotes transfusion-related lung inflammation. *Blood*. 2009;113(5):1158-66.
20. Conrado M, Dezan MR, Oliveira VB, Ziza KC, Fanciscani T, Rocha V, et al. Association between FY\*02N.01 and the severity of COVID-19: initial observations. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2022;44(2):213-7.

**Palavras-chave:** *ACKR1*; *CXCL8*; COVID-19.



## ***In vitro* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CURCUMIN-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY ON *Sporothrix brasiliensis***

**Bárbara Cipulo Legabão<sup>1</sup>; Camila Barros Galinari<sup>2</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>3</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup>Postgraduate Student (PhD), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>3</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR  
e-mail: [b.cipulo02@gmail.com](mailto:b.cipulo02@gmail.com)

### **1. INTRODUCTION**

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by a dimorphic fungus of the genus *Sporothrix*, which can be inoculated in humans and animals through trauma to the skin and subcutaneous tissues (1). Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* is a zoonosis transmitted to humans through the bites and scratches of infected cats (2).

Human sporotrichosis can present different clinical manifestations including cutaneous, lymphocutaneous, disseminated, and systemic forms (1). This spectrum justifies the importance of an adequate strategy to treat localized forms and prevent the spread of severe cases of sporotrichosis. Itraconazole, potassium iodide, terbinafine, and amphotericin B are some recommended drugs for the treatment of sporotrichosis (3). However, these drugs can vary in therapeutic efficacy and their prolonged use culminates in important side effects. In addition, resistance to these antifungals has been reported. In this sense, there is a demand for less toxic alternatives that result in faster clinical cure and can be provided at a low cost (4).

Photodynamic therapy (PDT) stands out for being a modern and non-invasive method that has been used in various fields of medicine as a complementary treatment for various diseases. PDT involves a photosensitizing agent (PS) and complementary light, which in combination is capable of causing target cell death through the release of reactive oxygen species (ROS) (5).

The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of PDT *in vitro* using pure curcumin (CUR) and CUR incorporated into a pharmaceutical gel formulation, on filamentous and yeast forms of *S. brasiliensis*.

### **2. MATERIALS AND METHODS**

#### **2.1 Microorganism and growth conditions**

*S. brasiliensis* strain 8902/1 was used in the filamentous form and the transformation to the yeast-like state was carried out. The isolate was kept in tubes containing Sabouraud dextrose agar (SDA) incubated at 25°C for seven days. Transformation to yeast took place on brain heart infusion agar (BHI) incubated at 37°C for five days.

#### **2.2 Preparation of filamentous and yeast-like inoculum**

Sterile suspensions of both forms of *S. brasiliensis*, containing 10<sup>6</sup> colony forming units (CFU/mL) were obtained in saline solution (0.85%) and adjusted in a Neubauer chamber. Conidia were separated from the hyphae by aseptic filtration through a syringe with a layer of compressed cotton. Yeasts were removed directly from the colonies.

#### **2.3 Photodynamic therapy (PDT)**

100 µL aliquots of each inoculum were incubated with different concentrations of pure CUR (50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.56; 0.78; 0.39; 0.19 and 0.09 µM) in 96-well plates, for 15 minutes in a humid chamber at 25°C in the dark. Then, they were irradiated with blue LED (450 nm) at 10, 15, and 20 J/cm<sup>2</sup> (17 mW/s irradiance) for 15 minutes. Dark (inoculum with CUR without irradiation) and light (inoculum irradiated but without CUR) controls were evaluated. Next, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined: the qualitative evaluation was performed by transferring the contents of the wells of each concentration of CUR to petri dishes containing SDA and BHI, which were incubated for 5 days at 25°C and 35°C, respectively. Aliquots from all wells were also cultured to count the number of colonies. MFC as defined as the lowest

concentration of CUR capable of reducing  $\geq 3 \log_{10}$  CFU in relation to the growth of the irradiated control group without CUR (C).

Three grams of the gel containing  $0.78 \mu\text{M}$  CUR were transferred to a 6-well plate and 1 mL of each inoculum was added, incubated for 15 minutes, and then irradiated with blue LED  $15 \text{ J/cm}^2$ . The MFC of the gel was determined according to the above criteria, the base of the gel was also tested under the same conditions.

#### 2.4 Analysis of ROS generation by flow cytometry

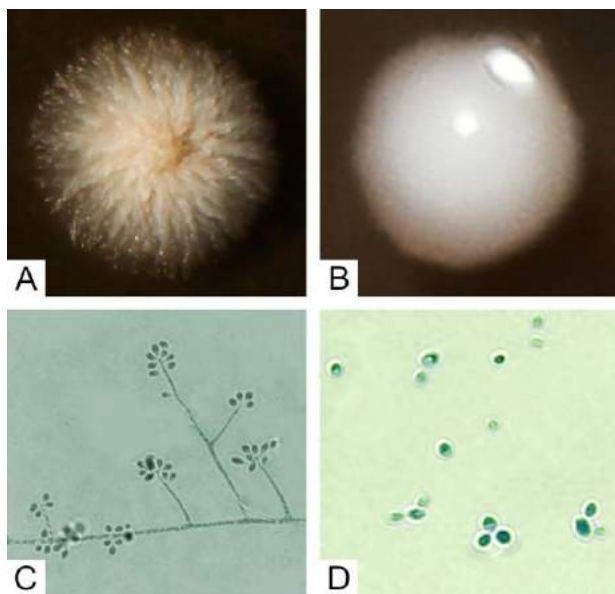
After PDT, pellets of each condition tested were obtained by centrifugation (5 minutes/4000 rpm) and washed once with PBS and resuspended with  $600 \mu\text{L}$  of PBS. 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) ( $5 \mu\text{M}$ ;  $3 \mu\text{L}$ ) was added to the pellet for 1 hour in the dark at  $28^\circ\text{C}$ . After staining the pellet, the tubes were evaluated in a FACSCalibur flow cytometer using filters FL1-H and FL2-H. This parameter was tested in four groups: negative control, positive control using hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $0.78$  treatment and  $1.56 \mu\text{M}$  CUR.

#### 2.5 Statistical analysis

For the analysis of the PDT-CUR results, the ANOVA one way test was performed followed by the Tukey test for comparison between the groups. Statistical analysis of PDT-CUR-gel was performed using the Unpaired T Test. For the analysis of ROS generation, the ANOVA one way test was performed followed by the Bonferroni test. All analyzes were performed using the Graphpad Prism 5 software.

### 3. RESULTS

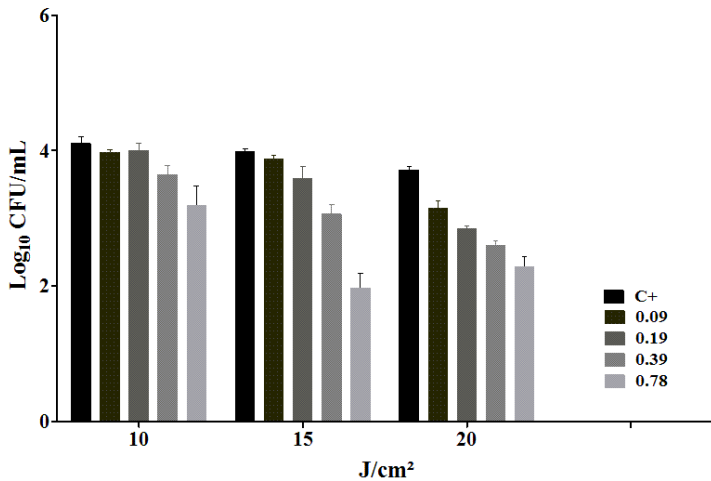
It was possible to prove the thermoconversion of *S. brasiliensis* 8902/1 (Figure 1). The filamentous colonies are white and membranous in appearance, while the yeast-like colonies are yellowish beige and have a shiny creamy appearance. Microscopically, the mycelia have thin, branched hyaline hyphae with clusters of conidia, which are small and ovoid arranged at the ends of a simple conidiophore. Yeasts are unicellular, oval, globose and cigar-shaped, and may have one or more sprouts.



**Figure 1.** Macro and micromorphological characteristics of *S. brasiliensis*. A) Aspect of the mycelial colony grown at  $25^\circ\text{C}$ . B) Appearance of yeast colony grown at  $37^\circ\text{C}$ . C) Filamentous form at  $25^\circ\text{C}$ , showing septate, hyaline hyphae and oval "daisy"-shaped conidia. D) Yeast form at  $37^\circ\text{C}$ , with the presence of simple rounded cells with budding.

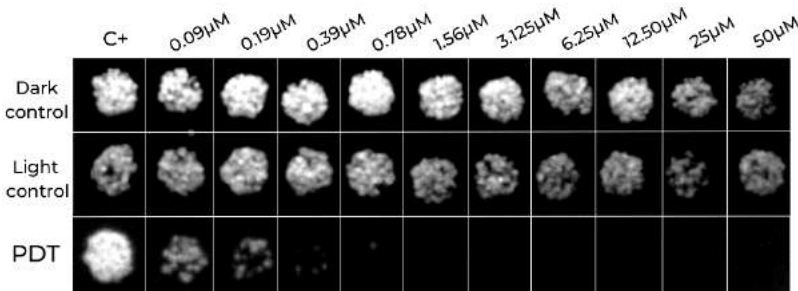
Adjusted inoculum was used to choose the light fluency to be used in experiments involving PDT-CUR. Fig. 2 shows the results obtained from the three fluences tested to define the lowest MFC of CUR and the chosen fluency was  $15 \text{ J/cm}^2$ .



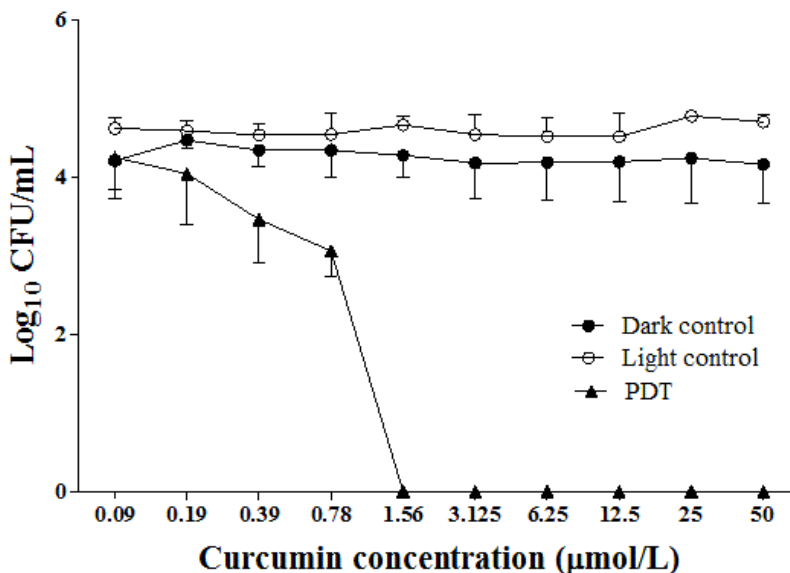


**Figure 2.** Reduction of CFU/mL of *S. brasiliensis* after treatment with different concentrations of CUR and doses of light. Conidia were incubated with CUR at various concentrations for 15 minutes, followed by blue LED irradiation (0, 10, 15 and 20 J/cm<sup>2</sup>) for 15 minutes. Each column represents the mean  $\pm$  standard deviation.

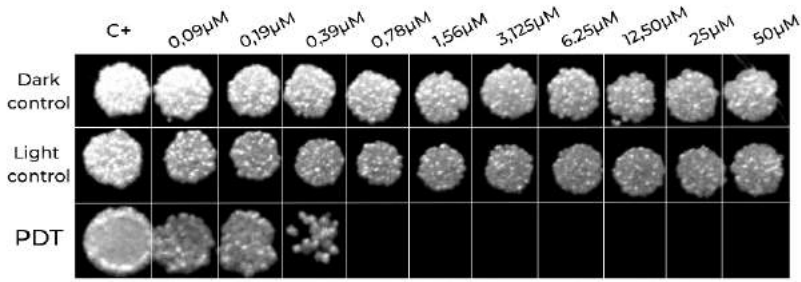
Thus, the qualitative analysis of PDT with pure CUR in filamentous and yeast form was determined in the same MFC of 0.78  $\mu$ M (Figures 3 and 5), which corroborates the quantitative result (Figures 4 and 6). For the filamentous form, the concentration of 0.78  $\mu$ M obtained a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of 1.38 log<sub>10</sub> (4.44 log<sub>10</sub> to 3.06 log<sub>10</sub>) under the conditions chosen above (Figure 4) and for the yeast form, there was a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of 1.18 log<sub>10</sub> (4.64 log<sub>10</sub> to 3.46 log<sub>10</sub>) at the 0.78  $\mu$ M concentration compared to the control (Figure 6). This is considered a fungistatic action, that is, the CUR provided a reduction in the number of CFUs not exceeding 99.99% (6). However, from the concentration of 1.56  $\mu$ M, in both morphologies of the fungus, there was a fungicidal action ( $\geq 3$  log<sub>10</sub> CFU), that is, a reduction of more than 99.99% of CFU/mL (6). PDT-CUR-gel, in relation to its base without CUR, showed significant reduction ( $p < 0.05$ ) of 0.83 log<sub>10</sub> (5.25 log<sub>10</sub> to 4.42 log<sub>10</sub>), as shown in Figure 7. In this same experiment, the action of pure CUR in relation to its positive control was reduced by 2.16 log<sub>10</sub> (5.45 log<sub>10</sub> to 3.29 log<sub>10</sub>). With this, we can say that the CUR-gel showed fungistatic activity in relation to the control.



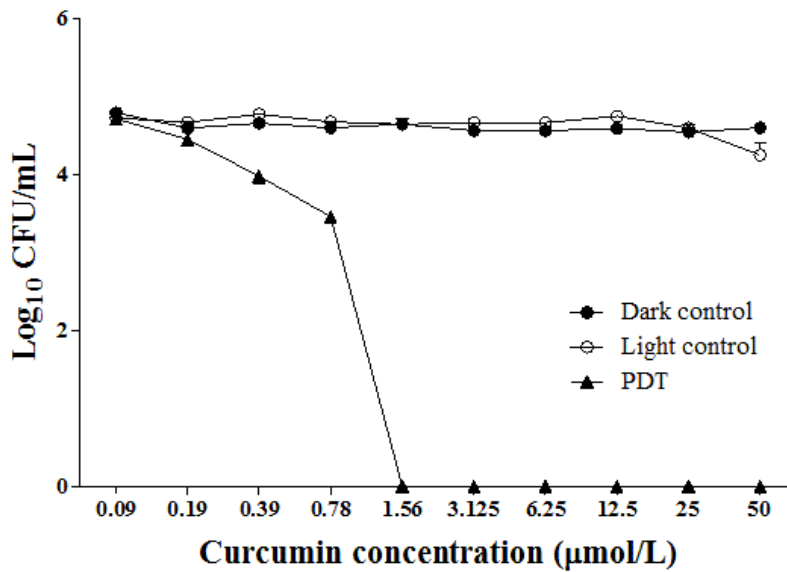
**Figure 3.** Antifungal activity of PDT-CUR and qualitative MFC determination for the filamentous form of *S. brasiliensis*.



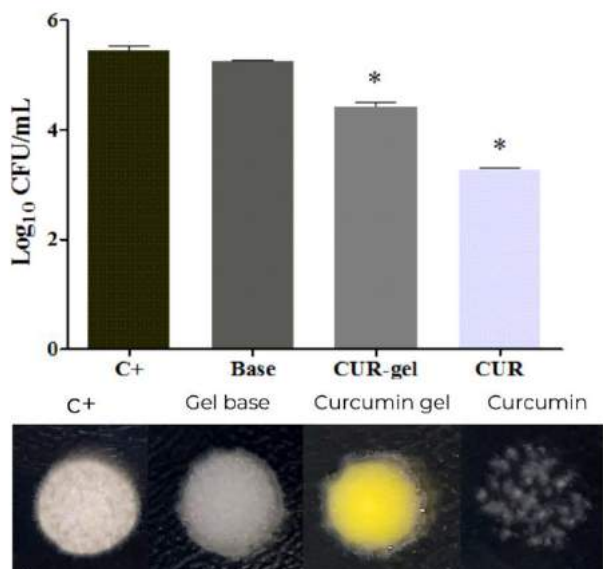
**Figure 4.** Determination of the fungicidal activity of TFD-CUR *in vitro* of *S. brasiliensis* in the filamentous form. The number of colonies grown on the SDA plates was counted. Various concentrations of CUR were tested and irradiated with LED (450 nm and irradiance of 17.0 mW/cm<sup>2</sup>) using a fluence of 15 J/cm<sup>2</sup>.



**Figure 5.** Antifungal activity of PDT-CUR and MFC determination for the yeast form of *S. brasiliensis*.

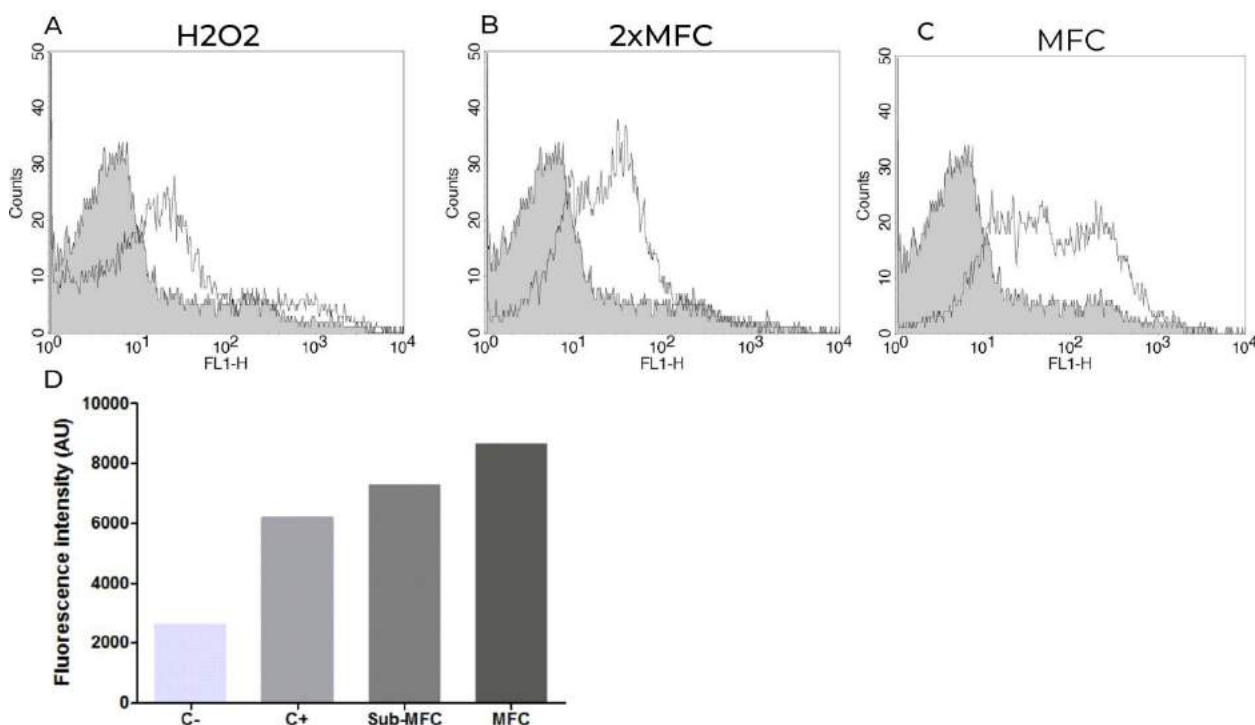


**Figure 6.** Determination of the fungicidal activity of TFD-CUR *in vitro* of *S. brasiliensis* in the yeast form. The number of colonies grown on the SDA plates was counted. Various concentrations of CUR were tested and irradiated with LED (450 nm and irradiance of 17.0 mW/cm<sup>2</sup>) using a fluence of 15 J/cm<sup>2</sup>.



**Figure 7.** PDT using CUR-gel for comparison with pure CUR. Both at a concentration of 0.78 µM, incubation for 15 minutes and irradiation with a blue LED of 15 J/cm<sup>2</sup>.

Confirmation of the antifungal action of PDT-CUR was determined by PDT-induced ROS production (Figure 8). The generation of ROS in the concentration of 0.78  $\mu\text{M}$  of CUR (MFC) was significantly higher than in the control group ( $p < 0.05$ ). The same happened for those treated with 1.56  $\mu\text{M}$  of CUR. These results indicate that the process of fungal death occurred due to the production of ROS.



**Figure 8.** ROS generation by TFD-CUR. Representative plots of ROS generation detected with DCFH-DA. Three groups are shown: negative control, positive control with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , treated with 1.56  $\mu\text{M}$  (2xMFC) and treated with 0.78  $\mu\text{M}$  CUR (MFC). Histograms A to C show the fluorescence intensity of FL1 and the displacement of treated relative to controls. D- Shows the fluorescence intensity (AU) that was emitted in each group.

#### 4. DISCUSSION

In the present study, the action of PDT-CUR on a filamentous and yeast-like strain of *S. brasiliensis* was evaluated. MFC in both fungal morphotypes was determined at 0.78  $\mu\text{M}$  for incubation and irradiation for 15 minutes with blue LED (450nm). At this concentration, there was a significant reduction of 1.38  $\log_{10}$  in the filamentous form (Figures 3 and 4) and in the yeast form of 1.18  $\log_{10}$  (Figures 5 and 6). This showed that PDT-CUR had an important fungistatic action against *S. brasiliensis*. However, from the concentration of 1.56  $\mu\text{M}$ , curcumin showed fungicidal action against the fungus, as there was a reduction  $\geq 3 \log_{10}$ . This is the first study that investigates the action of PDT-CUR in fungi of the *Sporothrix* genus. In contrast, the action of TFD on *Sporothrix* spp. has already been tested using other PS such as methylene blue and 5-aminolevulinic acid, and in all situations, this combination proved to be a potential alternative treatment for sporotrichosis. Both situations showed promising results (8). It had been reported that pure and non-irradiated CUR exerted an important antifungal action, with reduced virulence in *Sporothrix schenckii*-infected mice (7). Interestingly, in the present study, the *in vitro* evaluation does not confirm the action of CUR, without irradiation, only PDT-CUR was able to reduce the viability of the fungi (Figure 2).

However, the application of CUR has some limitations such as low solubility and low permeability (9), which makes it very challenging to use the maximum therapeutic potential of this PS. Therefore, we tested, *in vitro*, CUR incorporated into a pharmaceutical formulation in gel, in order to simulate a better response in wound healing. However, the action using gel was less efficient than pure CUR.

It was also proven that the mechanism of death of *S. brasiliensis* cells sensitized by PDT-CUR occurred through the formation of ROS (11). Treatment leads to oxidative stress resulting in fungal inactivation and death. Figure 8 represents the result of this test. Four groups were tested: positive control of pure CUR, Base of gel without incorporated CUR, CUR-gel and pure CUR (0.78  $\mu\text{M}$ ). In fact, there was a significant ( $p < 0.05$ ) reduction of 0.83  $\log_{10}$  of the CUR-gel compared to its base. However, pure CUR exhibited a better result. This probably occurred because it refers to an *in vitro* test, where the CUR incorporated into the gel has

difficulty in being released into the culture medium. In contrast, *in vivo* studies involving CUR-gel for the treatment of vulvovaginal candidiasis in mice had promising results (10).

## 5. CONCLUSÃO

Our results showed that PDT-CUR has an important *in vitro* fungicidal action against a strain of *S. brasiliensis*, and could be a promising candidate for the topical treatment of drug-resistant fungal infections. Additional studies are needed to investigate the efficacy and safety of PDT-CUR for the treatment of sporotrichosis.

## FUNDING

CAPES and CNPq.

## REFERENCES

1. Tellez-Martínez D, Batista-Duharte A, Portuondo DL, Carlos IZ. Prophylactic and therapeutic vaccines against sporotrichosis. Feasibility and prospects. *Microbes Infect.* 2019 Dec; 21(10): 432-40.
2. Rodrigues AM, Hoog GS, Pires CD, Brihante RS, Sidrim JJ, Gadelha MF, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis.* 2014 Apr; 23 (14): 219.
3. Almeida-Paes R, de Oliveira LC, Oliveira MM, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *Biomed Res Int.* 2015 Apr; 19: 21230.
4. Mahajan VK. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pratt.* 2014 Dec; 29, 272376.
5. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother.* 2018 Oct; 106: 1098–107.
6. Faria RD, Melo RC, Arita GS, Sakita KM, Rodrigues-Vendramini FAV, Capoci IRG, et al. Fungicidal Activity of a Safe 1,3,4-Oxadiazole Derivative Against *Candida albicans*. *Pathogens.* 2021 Mar; 7;10(3):314.
7. Huang L, Zhang J, Song T, Yuan L, Zhou J, Yin H Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of *Sporothrix schenckii*. *Int Immunopharmacol.* 2016 May; 34:263-70.
8. Legabão BC, Fernandes JA, Barbosa GFO, Bonfim-Mendonça PS, Svidzinski TIE. The zoonosis sporotrichosis can be successfully treated by photodynamic therapy: A scoping review. *Acta Trop.* 2022 Apr; 228:106341.
9. Santezi C, Reina BD, Annunzio SR, Calixto G, Chorilli M, Dovigo LN. Photodynamic potential of curcumin in bioadhesive formulations: optical characteristics and antimicrobial effect against biofilms. *Photodiagnosis Photodyn.* 2021 Sep; 29 (35): 02416.
10. Abouali N, Moghimipour E, Mahmoudabadi AZ, Namjouyan F, Abbaspoor Z. The effect of curcumin-based and clotrimazole vaginal cream in the treatment of vulvovaginal candidiasis. *J Family Med Prim Care.* 2019 Dec; 10;8(12):3920-3924.
11. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992 Jan; 55 (1): 145–57.

**Keywords:** *Sporothrix brasiliensis*; photodynamic therapy; curcumin.



## ***Trichophyton rubrum* complex AZOLE RESISTANT IS PHOTOINACTIVATED BY NANOENCAPSULATED HYPERICIN**

**Juliana Aparecida Fernandes<sup>1</sup>; Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado<sup>2</sup>; Brenda Serenini Pereira<sup>3</sup>; Ana Carolina Vieira de Oliveira<sup>4</sup>; Wilker Caetano<sup>5</sup>; Isis Regina Capoci<sup>6</sup>; Érika Seki Kioshima Cotica<sup>6</sup> Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>6</sup>**

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

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

<sup>3</sup>Undergraduate student in Biomedicine, Laboratory of Medical Mycology, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>4</sup>Undergraduate student in Chemistry, Center for Research in Photodynamic Systems - NUPESF, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>5</sup>Professor, Department of Chemistry, Center for Research in Photodynamic Systems - NUPESF, State University of Maringa, Maringa, PR

<sup>6</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, Maringa, PR  
e-mail: julianaapfernandes97@gmail.com

### **1. INTRODUCTION**

*Trichophyton rubrum* complex is the most common dermatophyte responsible for chronic cases of dermatophytosis, especially onychomycosis. Dermatophytosis are considered the most frequent mycoses, affecting 20 to 25% of the population worldwide (1, 2).

The onychomycosis can be divided into five clinical subtypes, with modifications in the regions nail plate and/or nail bed. This type of infection impacts the quality of life, resulting in walking difficulties and bad appearance of nails, and in addition to being an opportunity for secondary infections (3). The infection can affect healthy individuals, independent of sex and age, who are subjected to exposure or habits that favor the entry of the fungus into the nail. People with a fragile immune system as elderly individuals, in use of immunosuppressive, people with chronic diseases and underlying diseases such as diabetes mellitus, or vascular diseases are favored for the spread of infection to other areas of the body (4).

Current treatment is based on oral or topical antifungals, but resistance is frequent (5), and some factors also imply in therapeutic inefficiency, such as delay in treatment and therapeutic failure, ability of fungus to form biofilm, presence of dormant fungal spores on the nail and low bioavailability of the drug on the nail (4).

The limiting context of treatments for onychomycosis encourages alternative therapies such as photodynamic therapy (PDT), or also known as photoinactivation (PDI) when referring to *in vitro* assays. (6). PDT requires a compound photosensitizer (PS) that is activated by exposure to visible light at a particular wavelength to enter a long-lived triplet state. This particular state of the PS can then interact with molecular oxygen by electron transfer (Type I) or energy transfer (Type II) processes. The Type I mechanism will form a superoxide anion that can form reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl radicals, while Type II will lead to the production of singlet oxygen (7, 8). Hypericin is a photosensitizer with chemical structure of polycyclic aromatic naphthodianthrone, which has as natural origin plant species of the genus *Hypericum* sp. (9). It demonstrates great clinical relevance with PDT, because it has lipophilic characteristics that allow it to penetrate the cell membrane of fungi more easily, affecting structures of microconidia and hyphae (10). The success of PDT has been demonstrated by the efficient antimicrobial action demonstrated against bacteria, parasites, and fungi (11, 12, 13). Associated with therapeutic success, *in vitro* activity allows for a lower probability of toxicity, making the use of PDT attractive in different contexts (6).

Based on this context, this study aimed to investigate the frequency of *T. rubrum* complex in nail samples from patients of the northwest region of Paraná and evaluate the effectiveness of PDI associated with hypericin, in the search for insights for a new onychomycosis treatment.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Epidemiological survey

This is a descriptive, retrospective, cross-sectional study, approved by the Human Research Ethics Committee from State University of Maringa (process number 2.748.843). Onychomycosis by *T. rubrum* complex were investigated in clinical isolates of patients attended in the last 5 years in the Teaching and Research Laboratory in Clinical Analysis (LEPAC-UEM) and processed in the Medical Mycology Laboratory, located at State University of Maringa (UEM), Brazil. The samples followed the inclusion criteria: nail scraping samples (hand or foot) with medical request for fungal culture and positive result for dermatophytes.

### 2.2 *In vitro* antifungal susceptibility tests

#### 2.2.1 Clinical isolates

Sixteen clinical nail isolates of *Trichophyton rubrum* complex were used, randomly chosen and previously identified by classical methods (14) in the Medical Mycology Laboratory. Reference strain *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) was used as quality control in conventional drug susceptibility test.

#### 2.2.2 Culture and inoculum concentration

The clinical isolates were grown on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 12 days. Subsequently, the fungal structures (hyphae, macroconidia and microconidia) were dispersed in sterile saline solution (NaCl 0.85%) and the fluid was filtered to obtain only microconidia structures. These structures were counted in the Neubauer chamber and for the tests, the inoculum was adjusted in the concentration specific to each assay.

#### 2.2.3 Photosensitizer and light source

Hypericin (1,3,4,6,8,13-hexahydroxi-10,11-dimetilfenantro[1,10,9,8-opqra]perileno-7,14-diona, C30H16O8, 98% purity) was synthesized and encapsulated into 0.025% copolymeric micelle Pluronic™ (P123) by the Nucleus of Research in Photodynamic Systems (NUPESF) from the State University of Maringa, as described by Goncalves et al (2017) (15). Quality control of hypericin formulated in P123 was evaluated by spectrophotometer DU-800, Beckman Coulter at 37°C. The hypericin and P123 concentrations were adjusted to  $1 \times 10^4$   $\mu\text{mol/L}$  and 0.025 (%m/V), respectively (16). Photoinactivation was performed using a light emitting diode (LED) emitting warm white light, with a wavelength of 600 nm and fluency of 37.8 J/cm<sup>2</sup>.

#### 2.2.4 Broth microdilution assay of conventional antifungals

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of three conventional drugs was tested according to the document M38-A2 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (17). Itraconazole (ITZ 0.3 - 16  $\mu\text{g/mL}$ ), Terbinafine (TER 0.01 - 8  $\mu\text{g/mL}$ ) and Fluconazole (FCZ 0.12 - 64  $\mu\text{g/mL}$ ) were tested in planktonic cells of *T. rubrum* complex. For this, the inoculum was adjusted to a final concentration of  $5 \times 10^4$  conidia/mL in RPMI 1640 and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) was used as a control strain. Plates were incubated for 120 hours at 25°C for *T. rubrum* complex, or 48h at 35°C for *C. parapsilosis*. The results were evaluated visually and by spectrophotometer. MIC values were defined as the concentration able to inhibit 80% of growth in relation to the drug-free control (*T. rubrum* complex without antifungal) and the interpretation of resistance to conventional antifungals was performed according to Hryniewicz (2013) (21). Test performed in biological and experimental duplicates.

#### 2.2.5 Photodynamic inactivation assay

To determine the effect of photoinactivation in planktonic cells of *T. rubrum* complex, the inoculum was adjusted to the final concentration of  $1 \times 10^5$  microconidia/mL and hypericin adjusted to concentration of 100  $\mu\text{M}$ . In 96-well plate, serial dilutions were performed and tested the concentrations (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 and 0.09  $\mu\text{mol/L}$ ) of the hypericin. Before the photoinactivation assay, hypericin and inoculum were incubated for 2h in the dark. Next, the plate was irradiated for 20 minutes. For quantitative evaluation, the reduction in the number of cells ( $\log_{10}$  CFU/mL) was evaluated. For this, 20  $\mu\text{l}$  of each concentration was inoculated in PDA medium and incubated for 5 days at 25°C. The antifungal activity of PDI+Hyp was evaluated by fungicidal and fungistatic action. For this, the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was evaluated as the 100% reduction in fungal growth in relation to the control (*T. rubrum* complex without PDI+Hyp) and the fungistatic activity (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) was evaluated by the reduction of fungal growth of at least 1  $\log_{10}$  CFU/mL. The test performed in biological and experimental duplicates (19).

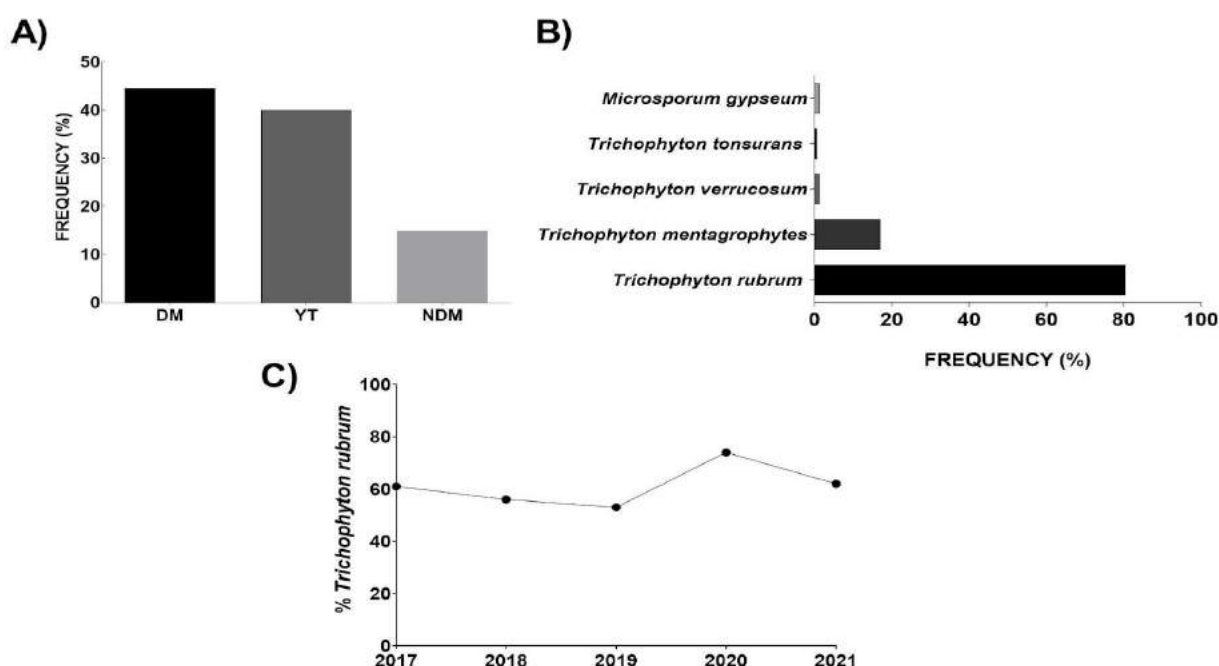
#### 2.2.6 Statistical analysis

The results of the inhibitory activity of PDI-Hy-P123 were analyzed using software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) and unpaired *t*-test. The values were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS

In a period of five years, there were a total of 355 nail samples with positive cultures for fungal infections. As shown in Figure 1A, Dermatophytic Filamentous Fungi (DM) were the group of fungi most

frequently isolated from the nail (44.50%), followed by Yeasts (YT) with 40.60% and the non-dermatophytic fungi (NDM) that were isolated in 14.90%.



**Figure 1. Highlights about *Trichophyton rubrum* complex as an important dermatophyte in onychomycosis cases.** Data for the last 5 years. Patients attended by the Medical Mycology Laboratory of the State University of Maringá. **(A)** Frequency of the three main groups of fungi in onychomycosis patients (n = 355). Dermatophytic Filamentous Fungi (DM), Yeasts (YT) and non-dermatophytic filamentous fungi (ND). **(B)** Species distribution (%) in relation to dermatophytes nail isolates. **(C)** Timeline in relation to the frequency of *Trichophyton rubrum* among the dermatophytes isolated from the nail.

Figure 1 highlights some relevant points about the frequency of the *T. rubrum* complex among clinical isolates of onychomycosis. Figure 1B shows that *T. rubrum* complex was the most frequent (80.4%) DM among the species belonging to this group. *Trichophyton mentagrophytes* (17.1%), *Trichophyton verrucosum* (1.3%), both *Trichophyton tonsurans* and *Microsporium gypseum* with (0.6%), were the other species of the DM group identified in nail samples. *T. rubrum* complex was involved in most onychomycosis cases, and in the last 5 years, it has been constant with rates often higher than 60% among DM identified in onychomycosis cases (Figure 1C).

**Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of conventional antifungal agents on planktonic cells of *Trichophyton rubrum* complex**

CLINICAL ISOLATES	MIC µg/MI		
	ITZ	TER	FCZ
TR0022	>16	≤0.1	>32
TR8275	>16	≤0.1	>32
TR2191	>16	≤0.1	>32
TR2150	>16	≤0.1	>32
TR2900	>16	≤0.1	>32
TR6236	>16	≤0.1	>16
TR0870	>16	≤0.1	>64
TR1423	>16	≤0.1	>16
TR8072	>16	≤0.1	>32
TR6660	>16	≤0.1	>32
TR1468	>16	≤0.1	>64
TR7629	>16	≤0.1	>32
TR3300	>16	≤0.1	>32
TR0230	>16	≤0.1	>32
TR3884	>16	≤0.1	>64
TR3404	>16	≤0.1	>64

The MIC was defined as the minimal concentration required to inhibit 80% of the growth compared the drugs-free control well. Abbreviation: ITZ – Itraconazole; TER – Terbinafine and FCZ – Fluconazole.

Table 1 shows susceptibility profile to antifungal drugs used in onychomycosis treatment. All clinical isolates of *T. rubrum* complex were resistant to the azoles tested. For ITZ, all strains showed MICs values

higher or equal to 16 µg/mL and for FCZ the MIC ranged between 16 and 64 µg/mL, highlighting that the majority (62.5%) had MIC greater than 32 µg/mL. All isolates were sensitive to terbinafine (0.1 µg/mL).

The antifungal activity of PDI-Hy-P123 was efficient for most of the clinical isolates tested (Table 2). Among them, 75% had a significant reduction in fungal growth from 3.12 µg/mL Hyp onwards, and 25% were resistant to PDI-Hy-P123. Furthermore, complete inhibition of fungal growth was observed in most clinical isolates, including the isolates of the *T. rubrum* complex azole-resistant, except (TR2150, TR2900, TR6236, TR7629).

**Table 2. Antifungal effect of PDI-Hy-P123 against sixteen clinical isolates of *Trichophyton rubrum* complex**

CLINICAL ISOLATES	MFC µmol/L	MIC µmol/L
TR0022	3.12	0.78
TR8275	12.5	0.19
TR2191	6.25	0.78
TR2150	>50	-
TR2900	>50	-
TR6236	>50	-
TR0870	>50	1.56
TR1423	>50	0.78
TR8072	3.12	1.56
TR6660	25	1.56
TR1468	12.5	1.56
TR7629	>50	-
TR3300	>50	3.12
TR0230	3.12	0.39
TR3884	50	1.56
TR3404	12.5	3.12

The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the concentration that led to  $\geq 1 \log_{10}$  colony-forming units (CFU)/mL reduction. The minimum fungicidal concentration (MFC) was defined complete death of the cells relative to the fungal control.

#### 4. DISCUSSION

Onychomycosis is a common chronic fungal infection and responsible for approximately 50% of all nail diseases and *T. rubrum* complex is the main agent of this type of mycosis (18). In our study, the epidemiological investigation showed that *T. rubrum* complex is the most frequent species among the isolated dermatophytes in cases of onychomycosis. Our investigation went further by evaluating the exclusive frequency of this dermatophyte over the last 5 years, and once again it was confirmed that year after year, it was the most frequent dermatophyte at this site of infection. The high frequency of *T. rubrum* complex has encouraged the search for new antifungal therapies in cases of onychomycosis since the chronicity of this pathology involves a complex system of antifungal resistance and fungal organization in a biofilm format on the nail (19). In this sense, this study presents a promising alternative for the treatment of onychomycosis by *T. rubrum* complex through the strategic use of photodynamic inactivation.

Our first step was to randomly select clinical isolates of *T. rubrum* complex for evaluation of the sensitivity profile to the main antifungal agents used in clinical practice. The clinical isolates tested showed a profile of resistance to azoles (FCZ and ITZ) and susceptibility to TER. Other studies demonstrated high MIC values with ITZ and low resistance with TER in clinical isolates (20, 21). TER is the treatment of choice for cases of onychomycosis caused by filamentous fungus; however, it is known that in clinical practice the request for laboratory diagnosis is not frequent, and empirical treatment with azoles is often performed (22, 23). In addition, recent studies show increasing resistance of dermatophytes to TER, associating mutations in key enzymes for ergosterol biosynthesis (24, 25). In this sense, it is relevant to study other therapeutic alternatives for these isolates, aiming at more assertive and less toxic possibilities.

To overcome the failures of antifungals used for onychomycosis cases, the use of photodynamic therapy or photoinactivation has been used as an alternative for the treatment of different infections, including those caused by dermatophytes (7). Our research group has expertise in this area with effective results for *Candida albicans*, *Fusarium* spp., and *Microsporum canis*, important fungal agents that cause different infections (16, 19, 26). In this work, photoinactivation assays using nanocarried hypericin showed efficient antifungal activity on the isolates of *T. rubrum* complex. Copolymeric micelles P123 are important nanocarrier



systems, because hypericin has the ability to aggregate in the biological medium hindering photodynamic activity. In this case, the micelle facilitates this delivery and permeabilization of the compound to the cells (27). Similarly, the interaction between photosensitizer and light is essential for photodamage occur in proteins, fats, and molecules, causing an increase in reactive oxygen species and leading to cellular stress and death of the microorganism (28). Our study showed that PDI-Hyp-P123 had fungistatic action for more than 70% of the isolates and fungicidal action for more than 50%. Conrado et al. (2021) (19) showed efficient activity of PDT-Hyp-P123 with complete reduction in fungal growth of *Fusarium* species. Furthermore, Hollander et al. (2015) (29) showed antifungal activity of PDT-porphyrins for 80% of *Trichophyton* spp. tested. It should be highlighted that the antifungal action of PDI-Hyp-123 was able to eliminate the fungal growth of isolates azole resistant. These results show that the photoinactivation can be similar to the antifungal activity of TER, with the advantage of possible lower toxicity, since most of them do not have a systemic effect.

The study with photoinactivation becomes promising as it brings the advantage of local treatment and absence of systemic toxicity. Clinical care for patients with onychomycosis is important for different points. Among them, failure in treatment with oral/topical antifungals, hepatic toxicity, allowing the infection to have the characteristic of chronicity in most cases. In addition, many patients develop onychomycosis in several fingernails or toenails, or even superficial or cutaneous dermatomycoses due to the characteristic of easy sporulation conferred on filamentous fungi (7).

## 5. CONCLUSION

PDI-Hyp-P123 showed effective *in vitro* inactivation of *T. rubrum* complex, including azole resistant clinical isolates. These results encourage further research to better understand this therapy in nail infection models and *in vivo* assays.

## FUNDING

The authors thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) - process number: 424262/ 2018–5, and Coordination of improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the support received.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Medical Mycology Laboratory of the State University of Maringa.

## REFERENCES

1. Brilhante RSN, Correia EEM, Guedes GMM, de Oliveira JS, Castelo-Branco DSCM, Cordeiro RA, et al. *In vitro* activity of azole derivatives and griseofulvin against planktonic and biofilm growth of clinical isolates of dermatophytes. *Mycoses*, 2018; 61 (7), 449. doi: 10.1111/myc.12763.
2. Bontems O, Fratti M, Salamin K, Guenova E, Monod M. Epidemiology of Dermatophytoses in Switzerland According to a Survey of Dermatophytes Isolated in Lausanne between 2001 and 2018. *J Fungi*. 2020; (6);95. doi.org/10.3390/jof6020095
3. Sugiura K, Masumoto A, Tachibana H, Tatsumi Y. *In Vitro* Combination Effect of Topical and Oral Anti-Onychomycosis Drugs on *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Fungi (Basel)*. 2021 Mar 12;7(3):208. doi: 10.3390/jof7030208.
4. Leung AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, et al. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2020; 14(1):32-45. doi: 10.2174/1872213X13666191026090713.
5. Monod M, Feuermann M, Salamin K, Fratti M, Makino M, Alshahni MM, et al. *Trichophyton rubrum* Azole Resistance Mediated by a New ABC Transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Oct 22;63(11): e00863-19. doi: 10.1128/AAC.00863-19.
6. Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jul 8;67(4):326. doi: 10.3322/caac.21398.
7. Wijesiri N, Yu Z, Tang H, Zhang P. Antifungal Photodynamic Inactivation against Dermatophyte *Trichophyton rubrum* Using Nanoparticle-Based Hybrid Photosensitizers, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018 Sep;23:202-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.06.019.
8. Mehraban N, Freeman HS. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production. *Materials (Basel)* 2015;8(7):4421-56. doi:10.3390/ma8074421.
9. 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 Dec;54(12):3121-5. doi: 10.1080/13880209.2016.1211716. Epub 2016 Aug 26.
10. 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.
11. Javed F, Samaranyake LP, Romanos GE. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sci*. 2014 May;13(5):726-34. doi: 10.1039/c3pp50426c.

12. Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Dec;10(4):632-43. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.07.006.
13. Zhang W, Zhang A, Sun W, Yue Y, Li H. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine (Baltimore).* 2018 May. doi: 10.1097/MD.00000000000010864.
14. Hoog GS, Guarro J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi.* 2th. CBS: Utrecht; 2000.
15. Goncalves RS, Rabello BR, Cesar GB, Pereira PC, Ribeiro MA, Meurer EC, et al. An efficient multigram synthesis of hypericin improved by a low power LED based photoreactor. *Org. Process Res. Dev.,* 2017;21(12) 2025-31.
16. 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. doi: 10.2217/fmb-2018-0304.
17. CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; (Approved Standard 2nd Edition), CLSI document M38-AA. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.
18. Gregoriou S, Mpali N, Vrioni G, Hatzidimitriou E, Chryssou SE, Rigopoulos D. Epidemiology of Onychomycosis in an Academic Nail Unit in South Greece during a Three-Year Period. *Skin Appendage Disord.* 2020 Mar;6(2):102. doi: 10.1159/000504812.
19. Conrado PCV, Sakita KM, Arita GS, Gonçalves RS, Cesar GB, Caetano W, et al. Hypericin-P123-photodynamic therapy in an ex vivo model as an alternative treatment approach for onychomycosis caused by *Fusarium* spp. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021 Sep;35:102414. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102414
20. Jiang Y, Luo W, Verweij PE, Song Y, Zhang B, Shang Z, et al. Regional Differences in Antifungal Susceptibility of the Prevalent Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia.* 2021 Mar;186(1):53-70. doi: 10.1007/s11046-020-00515-z.
21. Hryniewicz-Gwóźdź A, Kalinowska K, Plomer-Niezgoda E, Bielecki J, Jagielski T. Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages in vitro under drug pressure. *Mycopathologia.* 2013 Aug;176(1-2):49-55. doi: 10.1007/s11046-013-9655-y.
22. Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 51:333–9.
23. Sugiura K, Masumoto A, Tachibana H, Tatsumi Y. *In vitro* Combination Effect of Topical and Oral Anti-Onychomycosis Drugs on *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Fungi (Basel).* 2021 Mar 12;7(3):208. doi: 10.3390/jof7030208.
24. Saunte DML, Hare RK, Jørgensen KM, Jørgensen R, Deleuran M, Zachariae CO, et al. Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: Clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations, and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(10):1–9.
25. Shen JJ, Arendrup MC, Verma S, Saunte DML. The Emerging Terbinafine-Resistant *Trichophyton* Epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing. *Dermatology.* 2022;238(1):60-79. doi: 10.1159/000515290.
26. Galinari CB, Conrado PCV, Arita GS, Mosca VAB, Melo RC, Bianchi TP, et al. Nanoencapsulated hypericin in P-123 associated with photodynamic therapy for the treatment of dermatophytosis. *J Photochem Photobiol B.* 2021 Feb;215:112103. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112103.
27. Liu Z, Liu D, Wang L, Zhang J, Zhang N. Pharmacokinetics and biodistribution of polymeric micelles of paclitaxel with Pluronic P123. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006 27(6):747–53.
28. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. *Chem Rec.* 2017 Aug;17(8):775-802. doi: 10.1002/tcr.201600121. Epub 2017 Jan 2.
29. Hollander CD, Visser J, de Haas E, Incrocci L, Smeets T. Effective Single Photodynamic Treatment of ex Vivo Onychomycosis Using a Multifunctional Porphyrin Photosensitizer and Green Light. *J Fungi (Basel).* 2015 Jul 27;1(2):138-53. doi: 10.3390/jof1020138.

**Keywords:** photodynamic inactivation; onychomycosis; antifungal drug resistance.



## ***Candida albicans* orf19.36.1 SEEMS NOT TO BE ESSENTIAL FOR VIRULENCE**

**Glauca Sayuri Arita<sup>1</sup>; Qinx Ma<sup>2</sup>; Ian Leaves<sup>3</sup>; Arnab Pradhan<sup>2</sup>; Emer Hickey<sup>4</sup>; Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado<sup>1</sup>; Érika Seki Kioshima<sup>5</sup>; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>5</sup>; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski<sup>5</sup>; Alistair Brown<sup>6</sup>**

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

<sup>2</sup>Postdoctoral researcher, Medical Research Council Centre for Medical Mycology, University of Exeter, Exeter, UK

<sup>3</sup>Laboratory Assistant, Medical Research Council Centre for Medical Mycology, University of Exeter, Exeter, UK

<sup>4</sup>Graduate student (PhD degree), Medical Research Council Centre for Medical Mycology, University of Exeter, Exeter, UK

<sup>5</sup>Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

<sup>6</sup>Professor, Medical Research Council Centre for Medical Mycology, University of Exeter, Exeter, UK

e-mail: glauciasayuria@gmail.com

### **1. INTRODUCTION**

*Candida albicans* is an opportunistic pathogen and is the most prevalent species in episodes of candidemia (1). This yeast is present in the human microbiota and under conditions where there is an imbalance in the host's immune system and/or microbiota disturbances can cause infections that range from superficial to fatal, such as invasive and systemic candidiasis (1, 2). Invasive candidiasis affects more than 750,000 people annually, with a mortality rate of approximately 40% (3).

Several conditions contribute to this scenario, and the fragility of patients is usually related to factors frequently used in clinical and hospital practice, such as the use of antimicrobial agents, corticosteroids, immunosuppressors, medical devices, among others (1). Furthermore, intensive care unit hospitalization predisposes the cross-transmission of *Candida* species present in health professionals to patients and between patients (4).

*C. albicans* expresses several attributes named virulence factors that contribute to the infection process, such as the ability to transit from the yeast form to the hyphae form, adhesin expression, biofilm formation, phenotypic switching, and secretion of hydrolytic enzymes (1, 2). Furthermore, *C. albicans* can adapt to different pH, nutrient, and stress conditions (2).

During pathogenesis, *C. albicans* regulates and expresses several genes that encode important factors that contribute to virulence. The identification of these genes could make them the target of new antifungal therapies, vaccine candidate antigens, and diagnostic markers (5, 6). Our research group, in a murine model of serial systemic infection by *C. albicans*, evaluated changes in the proteomic and phenotypic profiles of the recovered yeast. Our results have shown an increased virulence of *C. albicans* acquired after serial passage in mice. These results were observed through important proteins that had their expression differentiated along the passages, agreeing with the results of the phenotypic assays (7, 8).

Furthermore, from our proteomic results, an uncharacterized protein of *C. albicans*, orf19.36.1, presented greater abundance after serial infection process, suggesting an important role in virulence, since there was a lower survival rate of the animals infected with colonies recovered from this model of infection (7, 8). Thus, in this study, our aim was to evaluate if orf19.36.1 would be involved in the pathogenesis of *C. albicans*.

### **2. MATERIALS AND METHODS**

#### **2.1. Strain and culture conditions**

*C. albicans* wild-type (WT) strain and homozygous null mutant strains were cultivated in YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, and 2% agar) and incubated at 30°C. Then a single colony was added in YPD broth and incubated at 30°C and 200 rpm overnight to prepare the inoculum for the assays.

## 2.2. Strain construction

The orf19.36.1 was deleted from *C. albicans* WT strain B07 using a transient clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated gene 9 (CRISPR-Cas9) system as previously described (9). Briefly, in this system, first, a *Candida*-compatible Cas9 expression cassette was amplified. Then, a synthetic guide RNA expression cassette was constructed through single-joint PCR. A repair template containing *SAT1* marker and 80 bp arms homologous to the sequences upstream or downstream from the gene of interest was constructed through polymerase chain reaction (PCR). Then, the PCR products and repair template were transformed using lithium acetate transformation method. A colony PCR was performed to confirm the deletion of the orf19.36.1 and insertion of the repair template containing *SAT1* marker.

## 2.3. Growth curve

From overnight culture, strains were diluted into fresh YPD and YNB-glu (yeast nitrogen base with 2% glucose) to an OD<sub>600</sub> of 0.2 and their OD<sub>600</sub> was read every hour for 12 h.

## 2.4. Morphology in liquid media

The cellular morphology of each strain was assayed in YPD broth media incubated at 30°C and in YPD with 10% serum incubated at 37°C for 3 h. Then, the samples were centrifuged, thimerosal fixed, and concentration was adjusted to 2.5×10<sup>6</sup> cells/mL for the staining with Calcofluor white. The samples were visualized with a DeltaVision fluorescence microscope.

## 2.5. Invasion assay in solid media

The ability of invasion into Spider and RPMI agar media was performed as previously (10).

## 2.6. Biofilm assay

The ability to form biofilm *in vitro* was evaluated by Colony Forming Unit (CFU) and biomass quantification as previously described (8).

## 2.7. Sensitivity assay

Several stressors such as thermal (42°C), osmotic (1M NaCl), oxidative (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cell wall (Calcofluor white, Congo red, Caspofungin) and membrane (SDS) were evaluated using YPD media as previously described (10). The plates were incubated at 37°C, except for thermal stress.

## 2.8. Survival assay in a *Galleria mellonella* infection model

Cells from the overnight culture of the WT and mutant strains were diluted into fresh YNB to an OD<sub>600</sub> of 0.2 and incubated for 5 h at 30°C and 200 rpm. Then, the concentration of the cultures were adjusted to 1×10<sup>7</sup> cell/mL and 10 µL was inoculated in the last proleg of 20 larvae for each strain. They were monitored for 168 h and the survival rate was calculated.

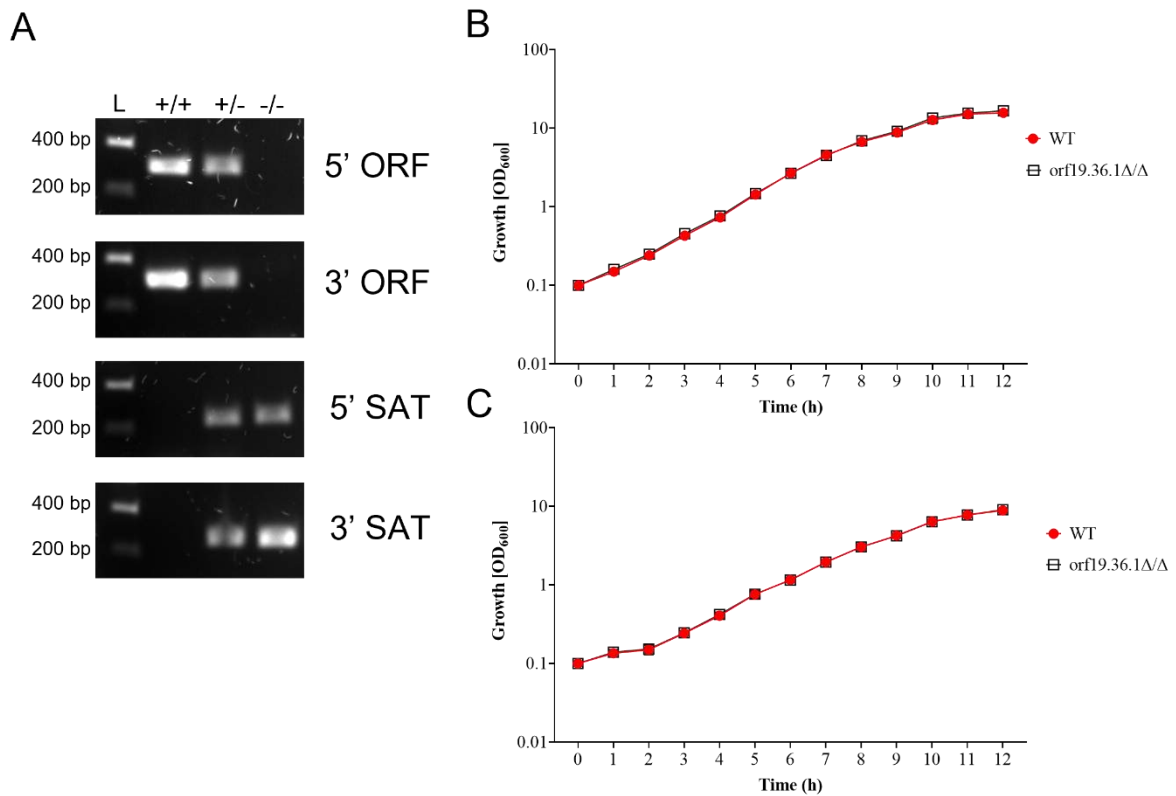
## 2.9. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test was performed using GraphPad Prism version 9.4.0 (GraphPad Software). The log-rank (Mantel-Cox) test was applied for statistical analysis from the survival curve. Values of p<0.05 were considered statistically significant.

## 3. RESULTS

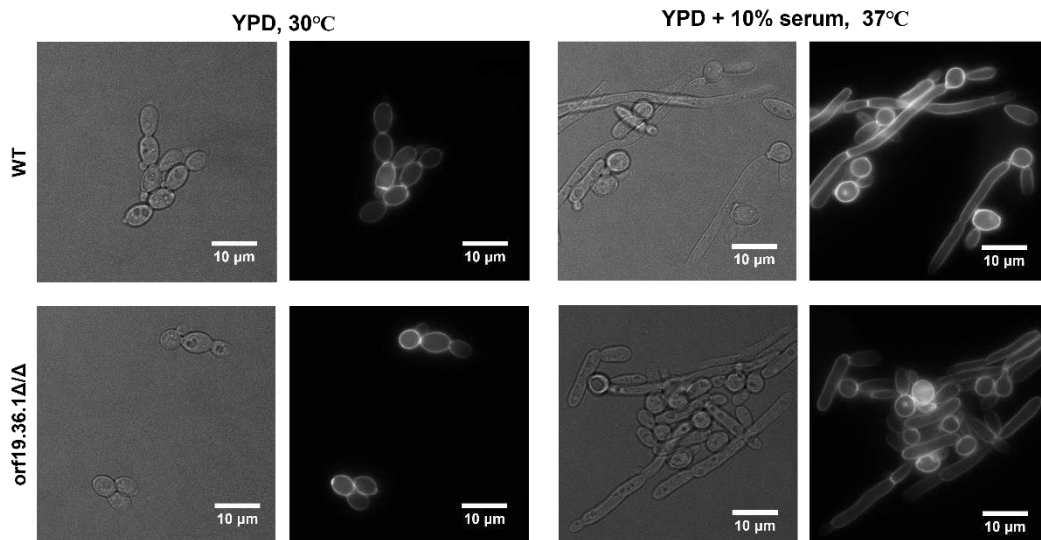
Using CRISPR-Cas9 technology, the orf19.36.1 was deleted using B07 as strain background and a repair template containing *SAT1* marker, which confers resistance to nourseothricin, was inserted through homology-directed repair. Thus, the homozygous null mutant has the presence of two copies of the *SAT1* marker, while the heterozygous mutant strain has one copy of the *orf19.36.1* gene and one copy of the *SAT1* marker (Figure 1A) from B07 strain were obtained.

First, we analyzed the growth profile of the mutant strain and its respective WT in YPD (Figure 1B) and YNB-glu (Figure 1C). No differences were detected among the strains in both media; therefore, this gene seems not to be essential to the growth of *C. albicans*.



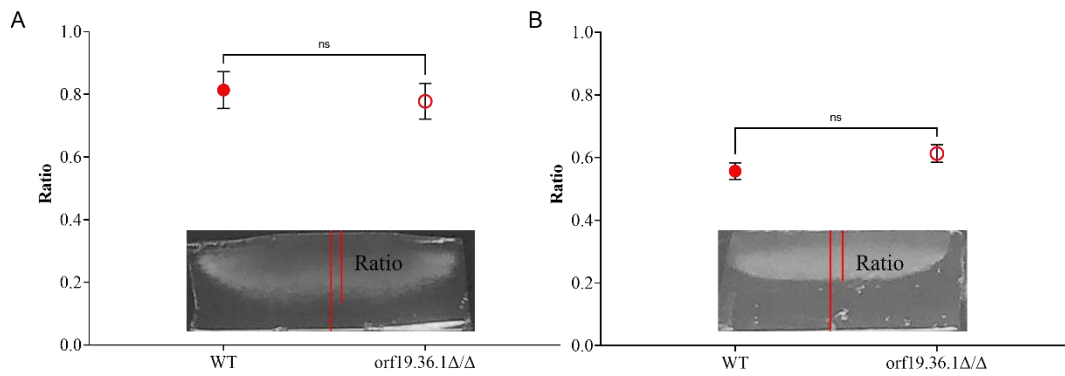
**Figure 1. Diagnosis PCR and growth curve.** A) Detection of the deletion of *orf19.36.1* in the 5' and 3' position and insertion of the repair template containing *SAT1* marker in the 5' and 3' position. B) Growth curve in YPD. C) Growth curve in YNB with 2% glucose. L: ladder; +/+ : wild-type strain; +/- : heterozygous strain; -/- : homozygous null mutant strain.

Figure 2 shows the morphology of the strains: in YPD at 30°C, cells from WT and mutant strains appeared as blastoconidia with multipolar or unipolar budding. The media with serum stimulates hyphae formation and we observed that mutant strain was able to filament as the WT.



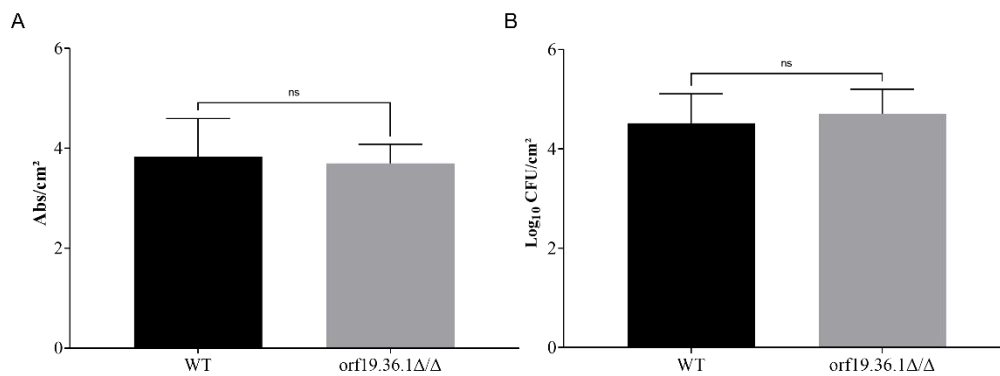
**Figure 2. Cellular morphology of wild-type and homozygous null mutant strains.** Cell suspensions from WT and *orf19.36.1Δ/Δ* were incubated in YPD at 30°C and YPD with 10% serum at 37°C for 3 h.

In addition, we evaluated the strains in their ability to invade solid media using RPMI and Spider agar. Both WT and null mutant were able to filament and invade in the two media tested without significant differences between them (Figure 3).



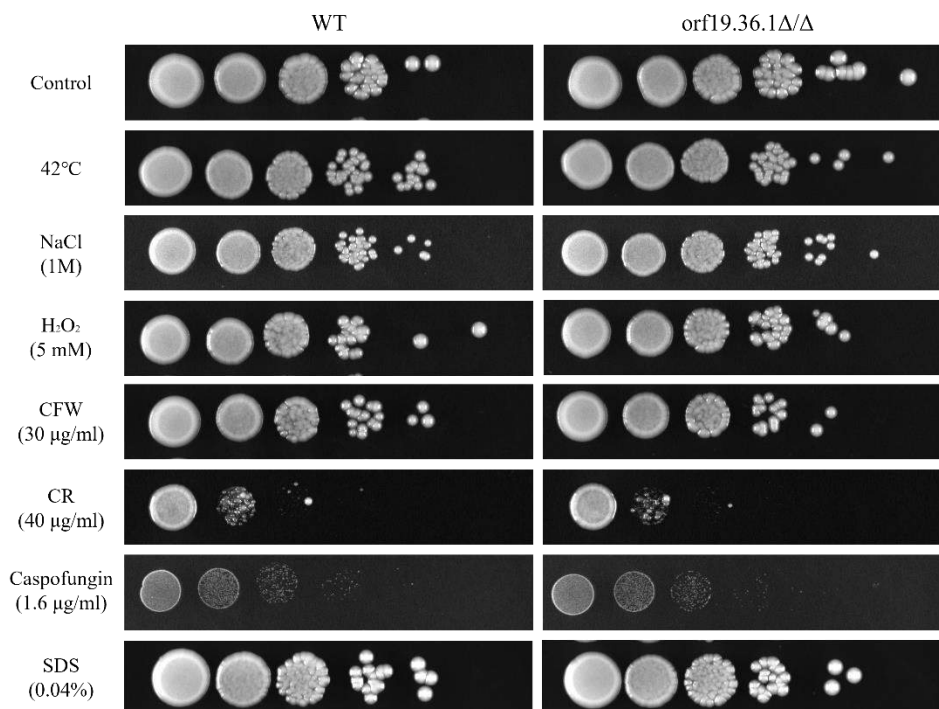
**Figure 3. Invasion *in vitro*.** Cells from wild-type and homozygous mutant strains were spotted onto RPMI agar (A) and Spider agar (B) and the colonies were cut in half and the ratio of invasion was measured using Image J software.

The ability of biofilm formation *in vitro* was evaluated. Both WT and null mutant formed biofilm in similar amounts as we can observe through biomass analysis and CFU quantification (Figure 4). Therefore, orf19.36.1 does not affect the ability to form biofilm.



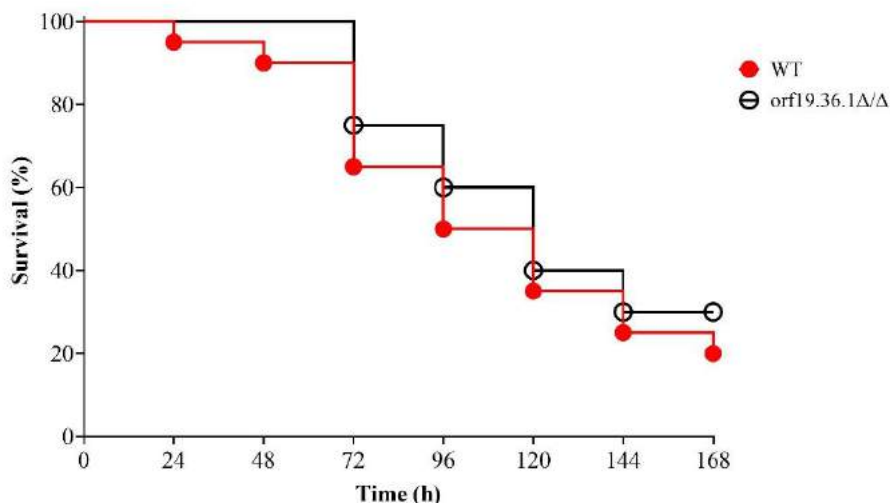
**Figure 4. Biofilm formation assay.** Cells from wild-type and homozygous mutant strains were allowed to form biofilm for 24 h at 37°C that were analyzed through biomass quantification (A) and CFU counts (B).

We also investigate the role of orf19.36.1 in the resistance to conditions of stress such as thermal, oxidative, and osmotic stress, and also in cell membrane and cell wall-perturbing agents. The growth was similar between the WT and its respective mutant strain in all tested conditions. Thus, the deletion of orf19.36.1 did not affect the ability to tolerate stress conditions (Figure 5).



**Figure 5. Resistance to different stressors.** Growth of the WT and homozygous null mutant strains under osmotic (1 M NaCl), oxidative (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), thermal (42°C), cell wall (Calcofluor white, Congo red, Caspofungin) and membrane (SDS) stress.

Lastly, to determine whether orf19.36.1 is involved in virulence, we performed a survival assay in a *Galleria mellonella* infection model. The mean survival time of larvae infected with WT was 108 h and infected with null mutant was 120 h, but no statistical difference was observed between them (Figure 6).



**Figure 6. Survival assay in a *Galleria mellonella* infection model.** Cells from wild-type and mutant strains were inoculated in the last proleg of the larvae and monitored for 168 h and the survival rate was calculated.

#### 4. DISCUSSION

Despite being widely researched, *C. albicans* has 6218 open reading frames (ORFs), but only 1686 ORFs (~27%) have been characterized, and 4380 putative ORFs have an unknown function (11). Thus, genomics and proteomics studies are needed to elucidate the importance of such proteins.

Our previous proteomics data obtained from *C. albicans* after serial passage in a murine model revealed the presence of the orf19.36.1 that had the lowest abundance in the first passage and highest abundance in the fourth passage. Furthermore, yeasts recovered from this latter passage presented higher virulence potential (7, 8). Thus, this protein was an attractive target for elucidating its possible role in the pathogenicity of *C. albicans*.

For that, we deleted the orf19.36.1 through transient CRISPR strategy. This methodology is used for gene deletion and construction of mutants aiming to uncover the role of genes in the physiology and virulence of *C. albicans* (12).

The orf19.36.1 is a protein of 68 aminoacids and transcript length of 207 nucleotide (13). This gene is ortholog of *C. parapsilosis* CDC317: CPAR2\_104640 (Uncharacterized), *C. orthopsilosis* Co 90-125: CORT\_0B05695 (NADPH-dependent methylglyoxal reductase) and *C. orthopsilosis* NEW ASSEMBLY: CORT1B05695 (13). However, its molecular function and biological process are unknown. The available transcriptomics data has demonstrated that the gene was expressed in several growth conditions such as in hyphal inducing conditions containing YPD, in media at pH 4 and 8, in conditions of nitrosative and oxidative stress, and also in cell wall damage conditions (14). In addition, this gene was upregulated in biofilm (15).

Therefore, we analyzed the behavior of the homozygous null mutants in several virulence factors assays. Our results, however, demonstrated that orf19.36.1 itself does not have a major role in the growth, filamentation, invasion, biofilm formation, resistance to several conditions of stress and virulence of *C. albicans*, since the homozygous null mutant acted similarly to WT in all assays performed. One hypothesis that it might have happened is because this protein could be auxiliary to other proteins that contribute directly to the virulence of *C. albicans*. In this sense, in our proteomics data, we observed other proteins such as Alcohol dehydrogenase 1 and Glycerol 3-phosphatase in increased abundance in the fourth passage in animal model assay as the orf19.36.1, but these proteins have important roles during pathogenesis and virulence of *C. albicans* (7, 16, 17).

#### 5. CONCLUSION

From the virulence factors assays tested in this study, it is suggested that orf19.36.1 does not play a role in growth, filamentation, invasion, biofilm formation, resistance to stress which are important attributes during *C. albicans* infection. Furthermore, the absence of this gene does not affect the *C. albicans* virulence

in a *Galleria mellonella* infection model. Therefore, more studies will still be necessary to elucidate the role of this gene in *C. albicans* pathogenesis.

#### FINANCIAL FUNDINGS

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

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Medical Research Council Centre for Medical Mycology from University of Exeter and Medical Mycology Laboratory from State University of Maringá for all the support.

#### REFERENCES

1. Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, Vigezzi C, Rodriguez E, Icely PA, et al. Invasive candidiasis: Update and current challenges in the management of this mycosis in South America. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Jun; 11(7):877. doi: 10.3390/antibiotics11070877.
2. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 May; 4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26.
3. Global Action Fundi for Fungal Infections [Internet]. Fungal disease frequency. 2022. [Accessed in 22 Jul 2022]. Available from: <https://gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan; 20(1):133-63. doi: 10.1128/CMR.00029-06.
5. Aoki W, Tatsukami Y, Kitahara N, Matsui K, Morisaka H, Kuroda K, et al. Elucidation of potentially virulent factors of *Candida albicans* during serum adaptation by using quantitative time-course proteomics. *J Proteomics*. 2013 Oct; 91:417-29. doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.031.
6. Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host-pathogen interaction: A review. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct; 17(10):1643. doi: 10.3390/ijms17101643.
7. Arita GS, Meneguello JE, Sakita KM, Faria DR, Pilau EJ, Ghiraldi-Lopes LD, et al. Serial systemic *Candida albicans* infection highlighted by proteomics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jun; 9:230. doi: 10.3389/fcimb.2019.00230.
8. Arita GS, Faria DR, Sakita KM, Rodrigues-Vendramini FA, Capoci IR, Kioshima ES, et al. Impact of serial systemic infection on *Candida albicans* virulence factors. *Future Microbiol*. 2020 Sep; 15:1249-63. doi: 10.2217/fmb-2019-0342.
9. Min K, Ichikawa Y, Woolford CA, Mitchell AP. *Candida albicans* gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 system. *mSphere*. 2016 Jun; 1(3):e00130-16. doi: 10.1128/mSphere.00130-16.
10. Arita GS, Vincenzi Conrado PC, Sakita KM, Vilugron Rodrigues-Vendramini FA, Faria DR, Kioshima ES, et al. Serial systemic candidiasis alters *Candida albicans* macromorphology associated with enhancement of virulence attributes. *Microb Pathog*. 2022 Mar; 164:105413. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105413.
11. Reyna-Beltrán E, Méndez CIB, Iranzo M, Mormeneo S, Luna-Arias JP. The cell wall of *Candida albicans*: A proteomics view. In: Sandai D, editor. *Candida Albicans* [Internet]. London: IntechOpen; 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/66105>. doi: 10.5772/intechopen.82348.
12. Wilson D, Mayer FL, Miramón P, Citiulo F, Slesiona S, Jacobsen ID, et al. Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions. *Eukaryot Cell*. 2014 Aug; 13(8):977-89. doi: 10.1128/EC.00051-14.
13. Skrzypek MS, Binkley J, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G. The *Candida* Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan; 45(D1):D592-6. doi: 10.1093/nar/gkw924.
14. Bruno VM, Wang Z, Marjani SL, Euskirchen GM, Martin J, Sherlock G, et al. Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome Res*. 2010 Oct; 20(10):1451-8. doi: 10.1101/gr.109553.110.
15. Desai JV, Bruno VM, Ganguly S, Stamper RJ, Mitchell KF, Solis N, et al. Regulatory role of glycerol in *Candida albicans* biofilm formation. *mBio*. 2013 Apr; 4(2):e00637-12. doi: 10.1128/mBio.00637-12.
16. Song Y, Li S, Zhao Y, Zhang Y, Lv Y, Jiang Y, et al. *ADH1* promotes *Candida albicans* pathogenicity by stimulating oxidative phosphorylation. *Int J Med Microbiol*. 2019 Sep; 309(6):151330. doi: 10.1016/j.ijmm.2019.151330.
17. Desai JV, Cheng S, Ying T, Nguyen MH, Clancy CJ, Lanni F, et al. Coordination of *Candida albicans* invasion and infection functions by phosphoglycerol phosphatase Rhr2. *Pathogens*. 2015 Jul; 4(3):573-89. doi: 10.3390/pathogens4030573.

**Keywords:** CRISPR; gene editing; virulence factors.





## ERADICATION OF *Fusarium* sp. BY PHOTODYNAMIC THERAPY IN ONYCHOMYCOSIS CASES

Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado<sup>1</sup>; Ana Adélia Vaine<sup>2</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>1</sup>; Karina Mayumi Sakita<sup>1</sup>; Wilker Caetano<sup>3</sup>; Monique de Souza<sup>4</sup>; Mauro Luciano Baesso<sup>5</sup>; Luis Carlos Malacarne<sup>5</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>6</sup>; Erika Seki Kioshima<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup> Professional Podologist, *Clinica de Podologia e Quirodatilogia*, Maringá-PR

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

<sup>4</sup> Graduate student (PhD degree), Program in Physics, State University of Maringá-PR, Maringá-PR

<sup>5</sup> Professor, Department of Physics, State University of Maringá-PR

<sup>6</sup> Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá-PR

e-mail: pollyconrado@gmail.com

### 1. INTRODUCTION

Onychomycosis (OM) is a nail plate fungal infection caused by dermatophyte molds (DM), yeasts (YST) and non-dermatophyte molds (NDM), that use keratin protein nail plate as energy source. Worldwide, prevalence rates of approximately 5.5% accounting for 50 % of nail diseases (1). Dyschromia, thickness, subungual hyperkeratosis and onychodystrophy are often symptoms seen in clinical diagnosis. OM can be classified into four types clinically according to the site of fungal invasion, as on distal and lateral subungual onychomycosis (DLSOM), superficial white onychomycosis (SWOM), proximal subungual onychomycosis (PSOM) and total dystrophic onychomycosis (TDOM) (2). The nail infection is mainly caused by DM. However, *Fusarium species* appears as an important NDM etiologic agent, in approximately 12-29%, OM cases (3, 4). This species is considered an opportunistic pathogen, however it affects both immunocompetent and immunosuppressed individuals, besides showing high rates of resistance to conventional antifungals (5). Although OM is a cutaneous mycosis, it is believed that nail infection can be a gateway for disseminated infections (1). In view of this, effective therapeutic approaches are extremely necessary.

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality of technology non-invasive, low toxicity, that use photosensitizer (PS), that when excited by a specific wavelength of light, in the presence of oxygen (O<sub>2</sub>), release reactive oxygen species (ROS) and singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), that causes targeted death (cells, tissues or microorganisms) by necrosis, autophagy or apoptosis (6). Hypericin (Hyp) is highlighted as PS successful photochemical activity, able to inhibit virus replication (7), potent fungicidal effect against *Candida* spp. (8), *Trichophyton* spp. (9) and *Fusarium* spp. (3), as well as excellent PDT activity in skin lesions (10). Nevertheless, the effect of Hyp-mediated PDT on clinical cases of OM is still unknown in the literature. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficacy of PDT-Hyp in the clinical OM treatment caused by *Fusarium* spp.

### 2. MATERIAL AND METHODS

#### 2.1. Cases report

Case 01 (ID 01). A 50-year-old diabetic woman with suspected OM presented dyschromia, thickness, asymmetric distribution and subungual hyperkeratosis on the right hallux toenail. In addition, reported pain and presence of paronychia, no previous treatment reported. Case 02 (ID 02). A 26-year-old woman with suspected OM, pointed to detachment and dyschromia, asymmetric distribution on left hallux toenail. The patient reported no previous treatment or underlying disease.

### 2.1.2. Ethics

The study observational, interventional, monocentric, explorative followed from OM treatment using PDT-Hyp protocol was approved by the human ethics committee (number 14107419.4.0000.0104) with collaboration of *Clínica de Podologia e Quirodatologia*, Maringá-PR, Brazil. For this, patients were selected according to the inclusion criteria, agreeing to participate in the research signing the informed consent form.

### 2.2 Photosensitizer and Light source

Hyp was synthesized by Nucleus of Research in Photodynamic Systems (NUPESF-UEM), as previously described (11). Hyp was suspended in DMSO, and for assays were diluted in sterile distilled water at final concentration at 100 µmol/L. Light-emitting diode warm White (LED, 400 and 800nm) with an irradiance of 30 mW/cm<sup>2</sup>, with dose at 37.8 J/cm<sup>2</sup> was used for *in vitro* assays and another LED with of 67 mW/cm<sup>2</sup>/dose at 66 J/cm<sup>2</sup> was used on clinical practice for OM treatment.

### 2.3. Guideline for the treatment of the patients

The biological samples of the unguis dysfunctions were collected, and sent for laboratory analysis. After positivity diagnosis for OM, the first treatment session was started. The nail analysis was performed by the podiatrist, who performed debridement to remove the affected nail plate. For treatment, Hyp (12.5 µmol/L) was applied under occlusion on the debrided region, in the dark for 30min, and irradiated for 30min. The PDT-Hyp treatment occurred once a week. After four sessions the new biological samples of nail plates were collected and analyzed. Mycological cure (absence pathogen in the nail plate sample) and clinical cure (complete healthy growth of the nail plate) were the criteria for patient discharge (12). Throughout the process the nail plates were photographed. In addition, professional follow-up to twelve months post-PDT treatment. Support material for prophylactic measures to disinfect possible fungal reservoirs, was supplied.

### 2.4.Laboratory analysis

The *Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas* (LEPAC), Division of Medical Mycology at State University of Maringa (UEM) processed the clinical sample from patients ID 01 and ID 02 at April and June 2021, respectively. The samples were analyzed according to direct mycological examination (DME) with potassium hydroxide (20%) and culture (CULT) performed following classical methodology, using Mycosel agar (MY) and Sabouraud agar (SDA) (13).

### 2.5. *In vitro* susceptibility assays

#### 2.5.1. Microorganism and culture conditions

Clinical isolates was inoculated in Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at 25°C for 7 days. Subsequently, *Fusarium* conidia were harvested in sterile saline (0.85%) and hyphae were removed by filtration with a layer of sterile compressed cotton. Then, inoculum was adjusted to a final concentration of 1–5×10<sup>5</sup> conidia/mL in a Neubauer chamber for *in vitro* assays.

#### 2.5.2. Broth microdilution assay of conventional antifungals

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of antifungals drugs from broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 were performed (14). Itraconazole (ITZ, 0.313-16 µg/ml) and Terbinafine (TER, 0.015-8 µg/mL) were tested. The inoculum was adjusted to a final concentration of 5×10<sup>4</sup> conidia/mL in RPMI 1640. *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) was used as control. The plates were incubated for 48h at 25°C (*Fusarium* sp.) or at 35°C (*C. parapsilosis*). MIC value was determined as the concentration capable of inhibiting 80% of growth as compared to the drug-free control.

#### 2.5.3. Susceptibility of PDT-Hyp on planktonic cells

*Fusarium* strain (1×10<sup>5</sup> conidia/mL) was incubated with Hyp concentrations (0.09-50 µmol/L) for 30min in the dark at 25°C, and irradiated for 20min. Three controls were used: control positive (C-inoculum in sterile saline), dark control (DC-inoculum with Hyp concentrations without irradiation) and light control (LC-inoculum in sterile saline irradiated). After photoinactivation, aliquots of suspension were transferred on PDA, incubated at 25°C for 48h. Colony forming units (CFU) with reduction ≥3log<sub>10</sub>/mL was considered to Minimal Fungicidal Concentration (MFC) compared to the C.

### 2.6. Hyp diffusion on nail fragments *ex vivo* by Photoacoustic Spectroscopy (PAS)

To better understand the permeability of Hyp in patients' nails plate, Photoacoustic Spectroscopy (PAS) in the ultraviolet and visible region was performed according to Ames and collaborators (15). This analysis evaluates absorption of Hyp spectra on *ex vivo* nail fragments. For assay, toenail fragments (n=10) from healthy male volunteers (68 age) were manually sectioned in dimensions of approximately 0.3×0.3 cm with a thickness of 820 µm. Then, a sandpaper was used to carefully remove approximately 30 µm of the dorsal surface and 100µm for the ventral surface. Then 3 µl of Hyp (12.5 µmol/L) were applied in the dorsal surface and incubated in the dark for 30min. Nail fragments without Hyp were included as a control. First, the diffusion measurement of Hyp was evaluated on the dorsal surface followed by ventral assessment.

Subsequently, Hyp diffusion assay on affected nail fragments from patient ID 02 were performed. Therefore, the sample nail fragments were collected and fixed in paraformaldehyde (4%). The healthy nail fragments of ID 02 were used as control. The absorption spectra (250-700nm) with the power of the source of light was 800W and modulation frequency was 24Hz, were obtained on both dorsal and ventral surfaces on *ex vivo* nail fragments.

## 2.7. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software (version 7.0, La Jolla, CA) and analyzed the mean  $\pm$  standard deviation (SD) obtained from three independent experiments in duplicate. Results were evaluated using Student's *t*-test, comparing sample treated with the control. Values of  $*p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. RESULTS

The demographic characteristics of the patients included in the study are shown in table 1. The sites and subtypes of onychomycosis were different among them, and in both patients the genus *Fusarium* was identified as the agent of OM.

**Table 1. Patient' characteristics included in study**

Case	Gender	Age	Underlying disease	OM site	Subtype	Paronychia	DME	CULT	Etiological agent
ID 01	F	50	Diabetes	R Hallux	TDOM	(+)	(+)	(+)	<i>Fusarium</i> sp.
ID 02	F	26	(-)	L Hallux	DLSOM	(-)	(+)	(+)	<i>Fusarium</i> sp.

Abbreviation: F – Female, R – Right, L – Left, TDOM – total dystrophic onychomycosis, DLSOM – distal and lateral subungual onychomycosis.

The patient treatment sessions occurred in parallel with *in vitro* antifungal susceptibility. The antifungal susceptibility profile of clinical isolates (*Fusarium* sp.) show resistance profile for ITZ with MIC values  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  and for TER the MIC values were  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ . Interestingly, PDT-Hyp antifungal activity was effectiveness presented on photodynamic eradication of *Fusarium* conidia, highlighting fungicidal profile, with reductions  $\geq 3\log_{10}$  CFU/mL ( $p < 0.005$ ). The MFC values range from 6.25 to 12.5  $\mu\text{mol/L}$  (Table 2). DC and LC showed no significant difference in relation to the Control (C) (data not shown).

**Table 2. Antifungal susceptibility profile *in vitro* of clinical isolates**

Clinical isolate	MIC ITZ	MIC TER	MFC PDT-Hyp	Reduction $\text{Log}_{10}$ CFU/mL	t-test *p value
ID 01	$\geq 16$ $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{mol/L}$	3.05578	<0.0051
ID 02	$\geq 16$ $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{mol/L}$	4.5722	<0.0001

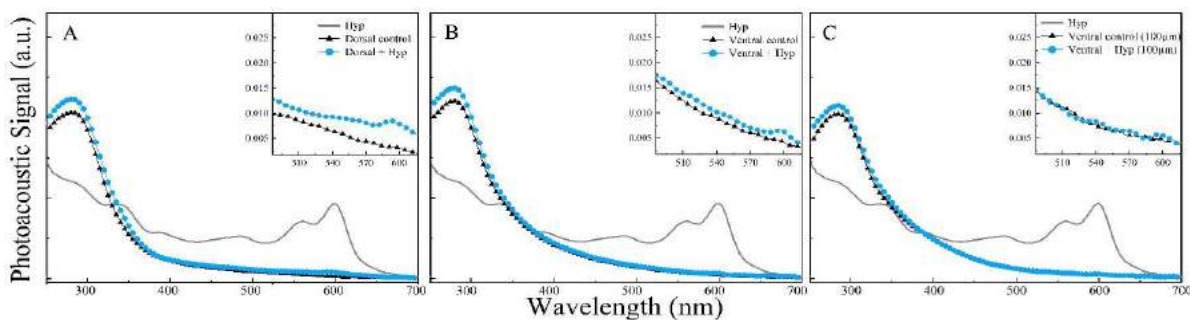
Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined able to inhibit 80% of the fungal growth compared to the drugs-free control well. Minimal fungicidal concentration (MFC) of PDT-Hyp was defined from reductions of  $\geq 3\log_{10}$  colony forming units (CFU/mL). Logarithmic reduction and value of  $*p < 0.05$  in relation to the fungal growth control (C). Abbreviation: ITZ – Itraconazole, TER – Terbinafine, PDT-Hyp – Photodynamic therapy with Hypericin.

Clinical evaluation of patients before treatment are shown in Fig. 1A and D, as described in table 1, patient ID 01 showed onychomycosis defined as TDOM and patient ID 02 DLSOM. During phototreatment the patients reported no pain or burning sensations, no skin photosensitivity, so no side effects were identified. After four PDT-Hyp sessions, there was no detection of fungi in the analyzed samples (DME and CULT). These results ensure mycological cure, as shown in Fig. 1B and E. Despite the mycological cure, patient ID 01 had a slower clinical cure and more dubious. During the treatment, difficulty in the adherence of the nail to nail plate and excessive dryness of the skin were observed. Then, considering the patient's immunosuppressive condition and the opportunistic pathogen agent, as a prophylactic measure, extra sessions of PDT-Hyp were performed, totaling nine sessions. Additionally, topical urea cream 30% was recommended. Additionally, topical urea cream 30% was recommended. Follow-up of patients was carried out fortnightly until clinical cure. Clearly therapeutic success occurred for both patients, as shown in Fig. 1C and F. Patient ID01 ended follow-up at 12 months, while clinical cure for patient ID02 was only at seven months.



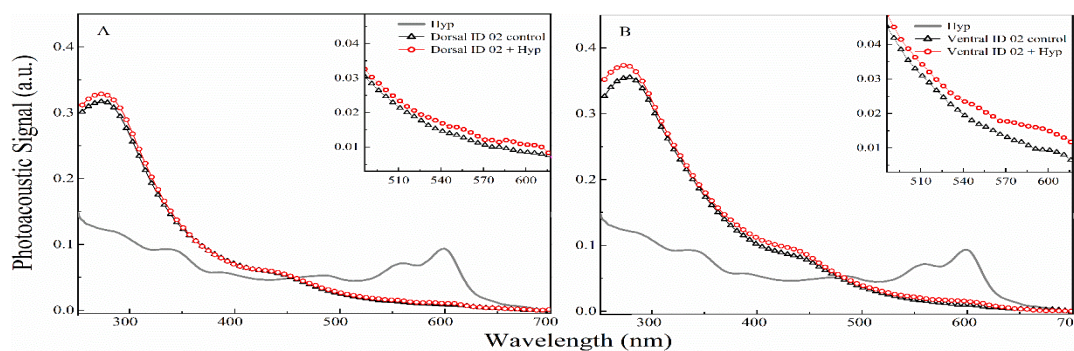
**Figure 1. Clinical effectiveness photodynamic therapy with hypericin in cases of onychomycosis.** A) ID 01 patient diagnosed with total dystrophic onychomycosis. D) ID 02 with distal and lateral subungual onychomycosis. B) Clinical evaluation after one month post-PDT-Hyp, with mycological cure (DME and CULT negative) to ID 01, and E) to ID 02 respectively. C) Treatment outcome post-PDT-Hyp, with follow-up of the twelve months to OM case ID 01. F) Seven months to ID 02 respectively. Representative figures of therapeutic success, showing the restoration of the shape and appearance of the nail.

The Photoacoustic Spectroscopy technique was used to better understand the Hyp permeation in the nail layers. Figure 2 quantified the diffusion of Hyp in the healthy nail fragments. The area under the absorption curve of the dorsal surface toenail of each sample was integrated and the area of the control nail was subtracted. Low amount of PS on the dorsal surface nail plate indicated the Hyp able to permeate the layers into toenail, besides that a presence of Hyp was observed on ventral surface with a thickness at 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2. Photoacoustic Spectroscopy of Hypericin diffusion on healthy nail fragments.** Analysis post 30 min of Hyp incubation in the dark on healthy toenail fragments ( $n=10$ ). A) Spectra on the dorsal surface, B) ventral surface and C) ventral surface with a thickness of 100  $\mu\text{m}$ . Dorsal or ventral surface control: without Hyp. Magnification shows to highlight the presence of the characteristic bands of the Hyp at 560 and 600nm.

The optical-absorption spectra of Hyp on *ex vivo* nails fragments from patient ID 02 also were performed. The Hyp penetrated from the dorsal surface to the ventral surface after 30min of Hyp application on the dorsal surface, as observed in Figure 3A and B. Highlights, that the increase of absorption of the band at 280nm, besides the identification of the bands centered at 560 and 600nm indicates characteristic of the optical absorption of the Hyp. The presence of these bands on the ventral surface, points out that the Hyp permeated the entire thickness of both of the nail fragments.



**Figure 3. Photoacoustic Spectroscopy of Hypericin diffusion on affected nail by onychomycosis.** A) Hyp permeation post 30min incubation protected at light on dorsal and B) ventral surface, from affected nail fragments collected from ID 02 patient. Dorsal or ventral control: healthy nail fragments without Hyp.

#### 4. DISCUSSION

*Fusarium* species are NDM able to cause nail infection. Although it is considered opportunistic pathogens, they have the ability to affect immunocompetent and immunosuppressed individuals in the absence of trauma or dystrophic nail abnormalities (16). It is known that OM is considered an opportunity for disseminated infections, and it becomes worrying when it is understood that the *Fusarium* genus. Especially, because this species has demonstrated high resistance against the main antifungals, as well as high rates around 52% of OM recurrence, an emerging factor in therapeutic failure (1, 5). In our study, the clinical isolates showed high MIC values to conventional antifungals as ITZ and TER. These findings are in agreement with other clinical studies that show *Fusarium* sp. resistance to these antifungals (1, 5). Additionally, these conventional drugs need a long time of treatment and can lead to toxicity (1, 5).

Photodynamic therapy has been shown as an effective alternative approach to treatment of different fungal infections (3, 10). This study shows for the first time clinical efficiency of PDT-Hyp on OM treatment caused by *Fusarium* spp.. Besides, the *in vitro* photoinactivation results on *Fusarium* cells show a susceptible profile to PDT-Hyp, with photodynamic eradication of planktonic cells and statistically significant fungicidal from MFC values ( $\geq 3 \log_{10}$  CFU/mL), data corroborating with Conrado and collaborators (3). These results were important to support the clinical therapy developed in this study. The literature suggests that photodynamic action is related to the properties Hyp lipophilicity, favoring the penetration on different internal structures of the cell, binding to the glutathione (GSH) system that inhibiting the cellular antioxidant activity of the fungus, contributing to irreversible photooxidative damage generated from photoinactivation (17).

The progressive course of chronic infection OM is associated with a structure established by communities cellular surrounded from extracellular polymeric substances known as biofilm, that confer defense mechanisms that lead to resistance to OM treatment (1, 18). In addition, the structure of the nail plate composed of keratin layers is also a factor that limits the permeation or bioavailability of antifungal drugs, contributing to therapeutic failure of mycological cure (18). In this sense, we studied the permeation potential that Hyp in the structure layers of nails with onychomycosis. Our results obtained by PAS showed that Hyp is able to diffuse from the dorsal surface through the entire length of the nail plate to the ventral surface in diseased and healthy (control) nails. Highlight, that keratin layers are composed mainly of amino acids and lipids on the nail plate (19), a factor significant considering that Hyp has lipophilic capacity, allows PS to bind to keratin properties, which explain the Hyp penetration throughout extension on the nail plate.

Mycological cure was observed after four PDT-Hyp sessions in both cases, showing that Hyp not only permeated the layers that make up the nail plate, but also permeated the fungal biofilm state present on the nails plate promoting photodynamic eradication of etiological agents. Previous works by our research group had already shown, *in vitro* and *ex vivo*, the ability of Hyp to permeate biofilm structures (3, 8). Debridement of the diseased nail was also a crucial factor in the exact delivery of Hyp to the fungal target, ensuring therapeutic success, as already shown in another study (20). Moreover, the parameters such as incubation time of Hyp, light dose, and number of sessions performed are in agreement with the literature, showing that PDT is a safe and non-toxic modality for the patients (21). In our case reports, the disparity between the age, and the underlying disease between patients was a determining factor in achieving complete cure. Diabetes is a morbidity that affects circulation, scar and consequently the healing process, being a concern to case ID01 (16). Therefore, prophylaxis care regarding the number of sessions and the use of topical urea after mycological cure were indicated in order to ensure clinical cure with complete healthy growth of the nail plate (1, 22), avoiding detached growth of the nail leading to the risk of gateway for other pathogenic microorganisms (15). It is important to highlight that the use of effective and fast therapeutic as PDT-Hyp modalities, without collateral damage, avoids resistance of the fungus, relapse and possible dissemination in the family, promoting individuals quality of life.

#### 5. CONCLUSION

Effectiveness of PDT-Hyp *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* expanded scientific knowledge showed satisfactory results, showing photodynamic eradication *in vitro* of *Fusarium* sp. as an etiological agent causes OM. The effect of PDT-Hyp in clinical practice showed satisfactory results, being a promising therapeutic modality and safe for the clinical treatment of OM. Overcoming the difficulties in OM treatment and the particularities of each case reported.

#### FUNDING

The authors thank the National Council of Technological and Scientific Development Foundation (CNPq) - process number: 424262/2018-5, and Technology and Higher Education Foundation (CAPES) for the support received.

## REFERENCE

1. Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. 2017 Nov/Dec;21(6):525-539.
2. Löser CR, Nenoff P, Mainusch O, Dippel E, Balakirski G. Common diseases of the nail: Diagnosis and therapy. J Dtsch Dermatol Ges. 2021 Dec;19(12):1761-1775.
3. Conrado PVC, Sakita KM, Arita GS, Gonçalves RS, Cesar GB, Caetano W, et al. Hypericin-P123-photodynamic therapy in an *ex vivo* model as an alternative treatment approach for onychomycosis caused by *Fusarium* spp. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021 Sep;35:102414.
4. 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.
5. 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.
6. Von Tappeiner H: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. Z Biol., 1900 39:524-526.
7. Xu L, Zhang W, Cheng W, Wang Y, Yi K, Wang Z, et al. Hypericin-photodynamic therapy inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells through induction of apoptosis and suppression of viral transcription. Retrovirology. 2019 Feb 19;16(1):5.
8. 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;14:519-531.
9. Paz-Cristobal MP, Gilaberte Y, Alejandro 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.
10. Rook AH, Wood GS, Duvic M, Vonderheid EC, Tobia A, Cabana B. A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. J Am Acad Dermatol. 2010 Dec;63(6):984-90.
11. Gonçalves RS, Rabello BR, César GB, Pereira PCS, Ribeiro MAS, Meurer EC, Hioka N, et al. An Efficient Multigram Synthesis of Hypericin Improved by a Low Power LED Based Photoreactor. 2017 Org. Process Res. Dev;21(12): 2025–2031.
12. Aditya K Gupta AK, Studholme C. How do we measure efficacy of therapy in onychomycosis: Patient, physician, and regulatory perspectives. J Dermatolog Treat. 2016 Nov;27(6):498-504.
13. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi, second ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, 2000.
14. 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.
15. Ames FQ, Sato F, Castro LV, Arruda LML, Rocha BA, Cuman RKN, et al. Evidence of anti-inflammatory effect and percutaneous penetration of a topically applied fish oil preparation: a photoacoustic spectroscopy study. J Biomed Opt. 2017 May 1;22(5):55003.
16. Wu CY, Chen GS, Lan CCE. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* in a woman with diabetes. Clin Exp Dermatol. 2009 Dec;34(8):e772-4.
17. Dalmizrak O, Teralı K, Abdullah RK, Ozer N. Mechanistic and structural insights into the *in vitro* inhibitory action of hypericin on glutathione reductase purified from baker's yeast. J Biochem Mol Toxicol. 2018 May;32(5):e22051.
18. Gupta AK, Venkataraman M, Renaud HJ, Summerbell R, Shear NH, Piguet V. A Paradigm Shift in the Treatment and Management of Onychomycosis. Skin Appendage Disord. 2021 Aug;7(5):351-358.
19. Muddasani S, Lin G, Hooper J, Sloan SB. Nutrition and nail disease. Clin Dermatol. 2021 Sep-Oct;39(5):819-828.
20. Tardivo JP, Wainwright M, Baptista M. Small scale trial of photodynamic treatment of onychomycosis in São Paulo. J Photochem Photobiol B. 2015 Sep;150:66-8.
21. Guo J, Ding A, Zhang J. Combination of toenail thinning and photodynamic therapy in distal and lateral subungual onychomycosis treatment: A case report. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2020 Jun;30:101692.
22. Starace M, Alessandrini A, Piraccini BM. Clinical evidences of urea at high concentration on skin and annexes. Int J Clin Pract. 2020 Dec;74 Suppl 187:e13740.

**Keywords:** nail mycosis, clinical therapy; *Fusarium* sp.



## INSIGHTS INTO URICOSURIA IN CHILDREN

Anna Carolina Hupples de Souza<sup>1</sup>; Mayara Fernanda Ferranti<sup>1</sup>; Ana Luiza de Paula Vasconcelos<sup>1</sup>; Marcia Rosangela Neves de Oliveira<sup>2</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Undergraduate student in Biomedicine, State University of Maringá

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

**Introduction:** Nephrolithiasis is a disease characterized by the accumulation of biochemical analytes and formation of kidney stones. In order to make the laboratory diagnosis, analytes such as uric acid are analyzed, according to the established reference values. However, we found that the reference values used in the pediatric population are the same as in the adult population, which makes it difficult to obtain an accurate diagnosis, as children's metabolism has certain peculiarities. **Aim:** Our research proposed to evaluate uric acid concentrations in 24-hour urine samples from children to bring to light insights into the true urine uric acid levels. **Material and methods:** In this cross-sectional analytical study, twelve 24-hour urine samples were collected from children, without comorbidities and without a family history of nephrolithiasis, to establish reference values in the age group (4 -11 years). The research was developed in the laboratory of Clinical Biochemistry with the approval of the Standing Committee on Ethics in Research Involving Human Beings of the State University of Maringá (n° 0055.0.093.000-10). The measurement was performed using the kinetic-colorimetric method according to manufactures (Interkit®). Statistical analysis was performed using the Graph Prisma 8.0 software, t student test was applied ( $p < 0.05$ ). **Results:** The parameters of uric acid concentration, volume and sex of the population, none showed a significant difference. We observed that the pediatric population has a lower profile of uric acid excretion with median of 169,5 mg/24h (107 – 235 mg/24h) compared to normal levels for adults below 800 mg/24h. This highlights the need to reassess the reference values in this specific population. **Conclusion:** Our study showed that there are real differences between urinary uric acid values between the healthy pediatric and adult population, however we emphasize the need for more research on this topic.

**Palavras-chave:** uric acid; reference values; nephrolithiasis.

**Área temática:** Clinical Biochemistry



## CITRATO URINÁRIO EM CRIANÇAS NÃO LITIÁSICAS

Ana Luiza de Paula Vasconcelos<sup>1</sup>; Anna Carolina Huppel de Souza<sup>2</sup>; Mayara Fernanda Ferranti<sup>3</sup>; Marcia Rosângela Neves de Oliveira<sup>4</sup>; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduada em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2,3</sup> Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4,5</sup> Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A litíase renal (LR) é uma doença de caráter multifatorial, a incidência em crianças varia entre 1 e 2,7%. Entre os fatores promotores da LR, o baixo nível de citrato urinário é determinante e comumente investigado. Apesar da importância, os níveis de citratúria considerados como referência em crianças são controversos. **Objetivo:** Avaliar valores de citrato urinário em crianças não litíásicas. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal, aprovado pelo COPEP-UEM (nº 0055.0.093.000-10), realizado com crianças, selecionadas aleatoriamente, de Maringá e região, menores de 12 anos, segundo definição do Estatuto da Criança e do Adolescente. Critérios de inclusão: concordância voluntária, disponibilidade em realizar a coleta de urina 24 horas, sem obesidade, ausência de LR e de histórico familiar (pais e irmãos) e possuir controle esfincteriano. Os pacientes e responsáveis foram instruídos de forma verbal e escrita a realizar a coleta de urina de 24 horas. A amostra foi processada segundo o procedimento adotado rotineiramente no Laboratório de Bioquímica Clínica para citrato urinário. A dosagem deste biomarcador foi feita pela metodologia enzimática e testadas em duplicata. Análise estatística expressando média, desvio-padrão (DP) e comparação entre sexos. **Resultados:** 87 crianças entre 3 e 11 anos coletaram urina, sendo que 54% eram meninas e 46% meninos. A excreção urinária de citrato teve média de 288,92 mg/24 horas e DP de 146,58. Os valores mínimo e máximo foram, respectivamente, 50 e 703 mg/24 horas e a mediana é igual 264 mg/24 horas. Não houve diferença estatística na excreção de citrato em comparação com os sexos ( $p > 0,05$ ). De forma curiosa, 66,6% das crianças teriam hipocitratúria, se comparados com o valor de referência para adultos (320 mg/24 horas). **Conclusão:** Os resultados desse estudo mostraram que de fato investigar os valores ideais de citrato urinário para crianças é necessário, afim de obter um diagnóstico de forma assertiva.

**Palavras-chave:** nefrolitíase; urina; saúde da criança.

**Área temática:** Bioquímica Clínica





## SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF HYPERICIN NANOENCAPSULATED WITH PLURONIC F127 IN BREAST CANCER CELL

Maria Vitória Felipe de Souza<sup>1</sup>; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles<sup>2</sup>; Natália Lourenço Mari<sup>3</sup>; Vânia Ramos da Sela Silva<sup>4</sup>; Gabriel Batista César<sup>5</sup>; Renato Sonchini Gonçalves<sup>5</sup>; Noboru Hioka<sup>5</sup>; Wilker Caetano<sup>5</sup>; Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke<sup>6</sup>; Marcia Edilaine Lopes Consolaro<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Researcher of technological and industrial development level B – Clinical Cytology Laboratory and Sexually Transmitted Infections – Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup>Post-graduation student (Ph.D.) in Biosciences and Physiopathology – Department of Clinical Analysis and Biomedicine Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>3</sup>Biomedical, M.Sc. in Biosciences and Physiopathology – Maringá/PR.

<sup>4</sup>Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>5</sup>Professor – Department of Chemistry, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>6</sup>Pharmacist, Ph.D. in Biosciences and Physiopathology – Maringá/PR.

**Introduction:** Breast cancer is the most incident type of cancer in the population and the first cause of cancer-related deaths among women in general. Currently, there is no effective treatment for breast cancer. Therefore, new antitumor therapeutic modalities remain an immediate necessity. In this sense, photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality that has been studied for the treatment of various types of cancer, requiring the use of a photosensitizer (PS). Hypericin (HYP), which is a naphthodianthrone compound, has shown increasing interest in use as a PS in PDT to control tumor cells. However, as with most PS, HYP exhibits high hydrophobicity. This can be resolved with nanomedicine-based technology for the delivery of hydrophobic compounds such as HYP, in this case, Pluronic F127. **Objective:** This study aimed to evaluate the subcellular distribution of HYP nanoencapsulated on Pluronic F127 (HYP/F127) against breast cancer cell MCF-7. **Material and methods:** MCF-7 cell line was seeded and incubated overnight at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hours, the cell was incubated for 1 hour with subcellular organelle probes specific for mitochondria (MitoTracker®), endoplasmic reticulum (ER-tracker®), nucleus (NucBlue Live ReadyProbes®) and 30 minutes with HYP/F127 (100 µmol/L HYP/250 µmol/L F-127). To display fluorescence emitted by HYP/F127 and the stained cell organelles, an inverted fluorescence microscope with a blue (DAPI), green (GFP) and red (RFP) filter (EVOS® FL, Life Technologies, USA) was used. **Results:** Our results showed that tumor cell presents high fluorescence that coincides with the fluorescence of mitochondria and endoplasmic reticulum. Also, the MCF-7 presented a weak/absent fluorescence of HYP/F127 that coincides with the fluorescence of the nucleus. **Conclusion:** The subcellular distribution of HYP/F127 occurred in the endoplasmic reticulum and mitochondria, showing the effectiveness of compound delivery to the cells and suggesting they are worthy of cell death pathway evaluations.

**Keywords:** breast cancer cell; photodynamic therapy; subcellular localization.

**Funding:** CNPq and CAPES

**Thematic area:** Clinical Cytology



## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Ruan Rompato Vieira<sup>1</sup>; Karina Midori Endo<sup>2</sup>; Elisa Parceró Hernández<sup>3</sup>; Fernando Rodrigues<sup>4</sup>; Márcia Edilaine Consolaro<sup>5</sup>; Luiz Fernando Cótica<sup>6</sup>.

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

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

<sup>4</sup>Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O câncer cervical é a quarta causa de mortes em mulheres no mundo e seu tratamento apresenta efeitos colaterais severos. Na busca por alternativas que melhorem a eficiência e minimizem os efeitos de tratamentos não-invasivos, as nanopartículas magnéticas (NPMs), particularmente a magnetita, é de especial interesse, devido às suas características atrativas para aplicações biomédicas em tratamentos direcionados utilizando compostos associados a essas NPMs. Desta forma. **Objetivo:** o objetivo deste estudo foi avaliar a síntese e caracterizar as nanopartículas para posterior funcionalização e aplicações em células tumorais de câncer cervical. **Material e método:** As NPMs foram sintetizadas pela via de coprecipitação utilizando  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$ . Para determinar as suas propriedades físico-químicas, foram feitas medidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), análises magnéticas por meio do magnetômetro de amostra vibrante (VSM) e o potencial zeta foi medido para averiguar a carga de superfície das nanopartículas. **Resultados:** Os resultados indicaram que a síntese obteve êxito ao serem observadas nanopartículas esféricas por MEV e MET, apresentando tamanho médio de aproximadamente 11,4 nm. Isso demonstra que foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. A curva de histerese revelou uma magnetização de aproximadamente 40 emu/g em um campo aplicado de 15kOe. Isso demonstrou que as NPMs tiveram caráter superparamagnético, ou seja, não há campo magnético intrínseco, porém, ocorre um aumento significativo da magnetização em relação ao campo magnético incidente aplicado. O potencial zeta obtido em suspensão aquosa foi de -15,2mV. Esse valor indicou que há uma instabilidade em água em pH neutro. **Conclusão:** O estudo verificou que a síntese ocorreu de forma satisfatória, gerando nanopartículas com características superparamagnéticas promissoras para estudos envolvendo campo magnético. São necessários novos estudos de funcionalização destas partículas para aplicações farmacológicas.

**Palavras-chave:** nanopartículas magnéticas; nanocarreadores; câncer.

**Financiador (es):** CNPq, Capes, Finep, Fundação Araucária.

**Área temática:** Citologia Clínica



## AVALIAÇÃO, EM ADOLESCENTES, DAS CONDIÇÕES DE DEPRESSÃO APÓS A PANDEMIA DE COVID-19

Wanderson do Nascimento Oliveira<sup>1</sup>; Cristiane Fabíola Verdán da Silva<sup>2</sup>; Radyja de Lima Pinto<sup>3</sup>; Ana Carolina Alarcão<sup>4</sup>, Kesia Palma-Rigo<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>2</sup> Acadêmica de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>3</sup> Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>4</sup> Docente e coordenadora – Curso de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>5</sup> Docente – Faculdade Adventista Paranaense

<sup>6</sup> Docente colaboradora no programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** Estudos apontam para um aumento na prevalência de depressão após a pandemia de covid-19. Durante a adolescência as relações entre os pares são a base para um bom desenvolvimento psíquico e o isolamento social é um marcador importante para a ocorrência de sintomas depressivos quando se trata da adolescência. **Objetivo:** Realizar uma análise parcial descritiva e bivariada da ocorrência de sintomas depressivos na adolescência após a pandemia de Covid-19 em uma escola privada em um município de pequeno porte no estado do Paraná. **Material e métodos:** Trata-se de uma análise parcial dos dados de um estudo observacional transversal em alunos de uma escola no interior do Paraná, aprovado pelo COPEP com número 15201519.8.0000.0104. Foi aplicado no formato on-line o Inventário de Depressão Infantil (CDI) em 39 alunos com idade entre 14 e 17 anos entre os meses de outubro e novembro de 2021. Análise descritiva e bivariada dos dados foi realizada com o Programa STATA 12. **Resultados:** A análise descritiva mostrou 74,36% são de sexo feminino e 25,64% de sexo masculino. Considerando o score do teste, 53,85% apresentaram presença de sintomas depressivos e 46,15% apresentaram ausência. No que diz respeito aos 5 fatores do (CDI), observou-se presença de 58,97% de humor negativo, 41,03% de problemas interpessoais, 66,67% ineficácia, 56,41% de anedonia e 74,36% de auto-estima negativa. Em relação a análise bivariada entre sexo e score total, os resultados obtidos mostram que 68,97% do sexo feminino indica presença de sintomas enquanto observou-se a presença somente em 10% do sexo masculino. Não houve correlação estatisticamente significativa entre ao sexo e sintomas depressivos. **Conclusão:** A análise parcial dos dados aponta para uma maior ocorrência de sintomas depressivos em adolescentes do sexo feminino, demonstrando que essa é uma população com maior risco ao adoecimento mental pós-covid-19.

**Palavras-chave:** Depressão, adolescência

**Financiador (es):** (Opcional)

**Área temática:** Epidemiologia



## FATORES SOCIOECONÔMICOS E CLÍNICOS QUE PREDISPÕE PACIENTES COM COVID-19 A UM MAU PROGNÓSTICO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Allyson Yuiti Otofui Inada<sup>1</sup>; Jonathan Sanches Rosa<sup>1</sup>; Amanda Larissa Dias Leme<sup>1</sup>; Beatriz Ignacio Pinel<sup>1</sup>; Brenda Serenini Perina<sup>1</sup>; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos-Milaré<sup>2</sup>; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose<sup>2</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>2</sup>, Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmico(a) 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

**Introdução:** o vírus SARS-CoV-2 é extremamente infeccioso e pode ser transmitido de pessoa para pessoa, pelas vias aéreas por meio de gotículas de secreções e aerossóis durante contato próximo. **Objetivo:** identificar em base de dados publicações científicas sobre a epidemiologia e os fatores de riscos associados a pacientes com Covid-19. **Material e métodos:** foi realizada uma busca sistemática de publicações científicas na base de dados eletrônica PubMed, de acordo com recomendações da estratégia PRISMA. Os MeSH Terms foram definidos por cinco pesquisadores e validados por três especialistas. Foi utilizado filtros de pesquisa para aumentar a sensibilidade das buscas. A pesquisa foi realizada no período de 18/01/2021 a 20/05/2021. **Resultados:** esta revisão sistemática recuperou inicialmente 3723 artigos sendo que, após aplicação dos critérios de exclusão e inclusão permaneceram seis publicações. Os resultados foram avaliados levando-se em consideração duas vertentes: variáveis sociodemográficas e variáveis clínicas. Sendo que nas variáveis sociodemográficas observamos que sexo masculino, idade avançada, e hábito de fumar como fatores de risco para Covid-19. Em relação as variáveis clínicas observamos que doenças de base como diabetes, hipertensão arterial, doença cardiovascular e, doença respiratória; assim como febre e dificuldade respiratória ou dispneia são fatores de risco para a Covid-19. **Conclusão:** as evidências identificadas nessa revisão sistemática mostraram que as variáveis idade avançada, sexo masculino e comorbidades como diabetes, hipertensão arterial, doença cardiovascular e doença respiratória são fatores de risco importantes para o desenvolvimento da forma grave e mal prognóstico da Covid-19.

**Palavras-chave:** covid-19; epidemiologia; fator de risco.

**Área temática:** Epidemiologia.



## DECORRÊNCIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE EM ADOLESCENTES: UMA ANÁLISE PÓS PANDEMIA E RETORNO ÀS AULAS ESCOLARES

Cristiane Fabíola Verdan da Silva<sup>1</sup>; Radyja de Lima Pinto<sup>2</sup>; Wanderson do Nascimento Oliveira<sup>3</sup>; Ana Carolina Alarcão<sup>4</sup>; Kesia Palma-Rigo<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>2</sup> Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>3</sup> Acadêmico de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>4</sup> Docente e coordenadora – Curso de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>5</sup> Docente – Faculdade Adventista Paranaense

<sup>5</sup> Docente colaboradora no programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** O período de afastamento das atividades escolares, vivido durante o período da pandemia da COVID-19, agravou entre os adolescentes os sintomas dos transtornos de ansiedade. Considerando a extensa quarentena e o isolamento social, além de se tratar um grupo de maior vulnerabilidade e em desenvolvimento psicoemocional, as decorrências de tais transtornos são mais comuns. **Objetivo:** Relacionar as decorrências e agravamento dos transtornos de ansiedade em adolescentes ao retorno das atividades escolares pós pandemia.

**Método:** Trata-se de uma análise parcial dos dados de um estudo observacional transversal em alunos de uma escola no interior do Paraná, aprovado pelo COPEP com número 15201519.8.0000.0104. Foram entrevistados 39 alunos com idade entre 14 e 17 anos entre os meses de outubro e novembro de 2021, com a aplicação do Inventário de ansiedade infantil - SCARED. A análise descritiva dos dados foi realizada com o Programa STATA 14. **Resultados:** Trinta e nove adolescentes entre 14 e 17 anos participaram do estudo. Destes, 74.36% pertencem ao sexo feminino e 25.64% ao sexo masculino. A análise descritiva apontou que há 84.62% de presença dos transtornos de ansiedade. Uma análise estratificada de alguns tipos de ansiedade apontou que 74.36% dos adolescentes apresentam sintomas de transtorno de pânico, 87.18% apresentam ansiedade generalizada, 58.97% apresentam ansiedade de separação, 61.54% apresentam ansiedade social e 56.41% evasão escolar. **Conclusão:** Na população analisada observou-se uma frequência elevada de transtornos de ansiedade e o sexo não teve impacto sobre o risco para transtornos de ansiedade no período de retorno as aulas presenciais após a pandemia de COVID-19.

**Palavras-chave:** Adolescentes; Ansiedade; Transtornos.

**Financiador (es):**

**Área temática:** Epidemiologia.



## PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE ARANEÍSMO NO PARANÁ

Anthony Marçal Leão de Oliveira<sup>1</sup>; Samuel Botião Nerilo<sup>2</sup>;

<sup>1</sup> Acadêmico de Graduação em Biomedicina – Centro Universitário Ingá – Uningá, Maringá/PR, Brasil.

<sup>2</sup> Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Das mais de 50.000 espécies de aranhas já identificadas, no Brasil apenas 3 gêneros se destacam por possuírem veneno capaz de causar danos de relevância médica aos seres humanos, sendo eles *Phoneutria* sp. (Aranha-Armadeira), *Loxosceles* sp. (Aranha-Marrom) e *Latrodectus* sp. (Viúva-Negra). O Paraná é o estado brasileiro com maior número de casos de picadas por aranhas. **Objetivo:** Identificar o público mais afetado e o gênero de aranha mais recorrente em acidentes no Paraná no período de 2011 a 2020. **Material e métodos:** Os dados foram coletados do Sistema de Informações e Agravos de Notificação (SINAN) utilizando as variáveis ano, unidade federal, sexo, faixa etária, tipo de aranha, classificação e evolução do caso. Todas as informações foram organizadas utilizando o software Microsoft Excel 2013. **Resultados:** Foram notificados 91.676 casos de acidentes por aranha no período de 2011 a 2020, valor que corresponde a 30% do Brasil, 45% dos casos são referentes as *Loxosceles* sp., 13% as *Phoneutrias* sp. e menos de 1% as *Latrodectus* sp., outros valores estão relacionados a outras espécies (30%) ou casos onde a aranha não foi identificada (12%). Também notou-se que 51% das picadas foram em mulheres e 49% em homens e a faixa etária mais afetada está entre 20 a 39 anos de idade (34%). Das 91.676 notificações, 78.573 (86%) foram classificadas como leves, 11.271 (12%) moderadas, 443 (0,5%) graves e 1.389 (1,5%) não possuem classificação listada, a grande parte do casos evoluiu para cura (87.460/95%), porém houveram 11 óbitos por agravo (7 masculinos e 4 femininos) e 17 óbitos por outras causas (14 masculinos e 3 femininos). **Conclusão:** O levantamento epidemiológico do Paraná demonstrou altíssimos números de picadas por aranhas, ficando clara a necessidade de informar a população a respeito dos riscos envolvidos, formas de prevenção e treinamento dos agentes de saúde.

**Palavras-chave:** epidemiologia; Paraná; picadas de aranhas.

**Financiador (es):** -

**Área temática:** Epidemiologia



## FATORES DE RISCO DE INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORA DE CARBAPENEMASES.

Andressa Sulamita Siqueira Menezes de Brito<sup>1</sup>; Júlia da Silva Pimenta<sup>2</sup>; Gerusa Luciana Gomes Magalhães<sup>3</sup>; Talita Caroline da Luz<sup>4</sup>; Giovana Sestari dos Santos<sup>5</sup>; Pedro Olímpio Siqueira Castilho<sup>6</sup>; Bianca Ribeiro Desiderato<sup>7</sup>; Marsileni Pelisson<sup>8</sup>; Marcia Regina Echtes Perugini<sup>9</sup>; Eliana Carolina Vespero<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Microbiologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>4,5,6,7</sup>Acadêmico de graduação em Farmácia, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

<sup>7,8,9</sup>Docente – Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

**Introdução:** Durante a pandemia do covid-19 observou-se um aumento significativo de resistência bacteriana. Atualmente *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, são uma grande ameaça à saúde pública, sendo frequentes em infecções hospitalares adquiridas na comunidade. **Objetivo:** Avaliar fatores de risco e a presença de carbapenemases em isolados de hemoculturas positivas para *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (KPC-CR). **Material e métodos:** O estudo foi aprovado por meio do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE da UEL sob o protocolo 28316819.0.0000.5231. Foram estudados 59 pacientes que tiveram infecção da corrente sanguínea (ICS) por KPN-CR no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, em Londrina-Brasil, de janeiro de 2020 a janeiro de 2022. A presença de genes codificadores das carbapenemases foi avaliada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e fatores de risco foram obtidos no prontuário eletrônico MEDVIEW. Os resultados foram tabulados no software SPSS, a análise estatística analisadas pelo teste Qui-quadrado, exato de Fisher e teste *t* de Student, quando necessário. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. **Resultados:** Dos 59 isolados, 31(52,2%) apresentaram a carbapenemase *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), 9(15,2%) apresentavam *New Deli* Metalobetalactamases (NDM) e 19(32,2%) apresentavam coprodução de KPC e NDM. De acordo com a análise multivariadas, pacientes com obesidade e covid positivo foram fatores de riscos para infecção ICS ( $p=0,004$ ). A carbapenemases KPC ( $p=0,05$ ) foi a mais frequente. A regressão logística evidenciou que pacientes covid positivo e com ICS tinham 5 vezes mais chances de ter KPC ( $p=0,01$ ). Assim como indivíduos que eram obesos, covid positivo e ICS tinham 3 vezes mais chances de ter KPC ( $p=0,05$ ). **Conclusão:** O presente estudo sugere que a maioria dos pacientes positivos para covid e que apresentavam obesidade, também apresentaram maior risco de terem ICS por *K.pneumoniae* produtora de KPC.

**Palavras-chave:** carbapenemases; covid-19; coprodução.

**Financiador (es):** Capes

**Área temática:** Epidemiologia



## AVALIAÇÃO DOS ESTADOS EMOCIONAIS DE DEPRESSÃO, ANSIEDADE E ESTRESSE EM TRABALHADORES RURAIS NO PARANÁ

Rafael Felipe Oliveira de Moraes Vieira<sup>1</sup>; André Inácio da Silva<sup>2</sup>; Radyjia de Lima Pinto<sup>1</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>3</sup>; Kesia Palma Rigo<sup>3,4</sup>; Diego Alexandre Rosendo da Silva<sup>4</sup>; Ana Carolina Jacinto Alarcao<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista do Paraná, Ivatuba/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

<sup>4</sup>Docente – Faculdade Adventista do Paraná, Ivatuba/PR

**Introdução:** Estudos evidenciam que a exposição crônica aos agrotóxicos está relacionada à alteração das condições de saúde dos trabalhadores rurais, inclusive causando impactos diretos na saúde mental desses indivíduos. **Objetivo:** Avaliar os estados emocionais de depressão, ansiedade e estresse em trabalhadores rurais do município de Marialva/Pr. **Material e métodos:** Estudo transversal, que consistiu na aplicação da Escala de autorrelato DASS-21, tipo Likert de pontuação que varia de 0, "não se aplica a mim em tudo," a 4, "se aplica a mim muito, ou a maior parte do tempo", para avaliação de depressão, ansiedade e estresse em trabalhadores rurais, sendo 29 homens e 6 mulheres. Seguido pela tabulação dos dados através do Software Excel® 2010 e posterior análise dos resultados por meio de estatística descritiva simples. O Estudo foi autorizado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá através do CAAE N°65018017.7.0000.0104, parecer n° 4.040.007. **Resultados:** Os níveis de depressão se apresentam normais/leve tanto na população masculina, quanto na feminina, representando 68,96% e 66,66% respectivamente. A mesma tendência se manteve nos níveis de ansiedade, com 89,65% dos homens e 66,66% dos participantes do sexo feminino, e nos níveis de estresse com 86,20% dos homens e 66,66% das mulheres. Contudo, 33,33% das mulheres apresentaram níveis moderados de estresse, mostrando uma tendência de maiores níveis de estresse nessa população comparado aos homens (3,44%). **Conclusão:** Os níveis de depressão, ansiedade e estresse encontram-se predominantemente normais na população estudada. Porém, o sexo feminino demonstrou risco para estresse, ao se sobressair em relação à população do sexo oposto, com maior índice de pessoas com nível moderado. Estes achados apontam para a necessidade de realizar estratégias de prevenção de doenças emocionais, a fim de contribuir para a saúde dos agricultores.

**Palavras-chave:** Agricultores, agroquímicos, saúde emocional.

**Financiador (es):** Fundação Araucária

**Área temática:** (Epidemiologia)





## PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES CARDÍACAS EM ATLETAS COM COVID-19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Bruno Jun Komagome<sup>1,2</sup>; Marco Antonio Vilas Boas de Souza<sup>1,2</sup>; Lucas Lima Pierobom<sup>1,2</sup>; Vinicius da Silva Guidini<sup>1,2</sup>; Vitor Augusto Machado<sup>1,2</sup>; Ailton Fernandes Junior<sup>1,2</sup>; Valdemar Leonardo Batista Bravin<sup>1,2</sup>; Leonardo José Afonso de Carvalho Ito<sup>1,2</sup>; Lucas Zandonadi Dos Santos<sup>1,2</sup>; Fabricio Furtado Vieira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

<sup>2</sup>LAMEEx - Liga Acadêmica de Medicina do Esporte e Exercício, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A síndrome respiratória aguda grave causada pelo coronavírus pode levar a complicações clínicas em vários sistemas do corpo humano, incluindo o cardiovascular. Ao contrário dos estudos iniciais que focaram em alterações cardíacas em pacientes hospitalizados e graves, estudos recentes têm mostrado interesse em complicações cardíacas em indivíduos jovens e saudáveis, o que inclui atletas. **Objetivo:** Essa revisão sistemática visa apresentar os resultados de diferentes estudos sobre as alterações cardíacas em atletas com COVID-19. **Material e métodos:** Foi conduzida uma revisão sistemática de estudos observacionais em duas bases de dados (MEDLINE e EMBASE) e restrita a estudos publicados até 31 de julho de 2022. Os critérios de elegibilidade para a seleção dos estudos foram (1) incluir atletas profissionais, amadores ou universitários com COVID-19, (2) dados sobre alterações cardíacas e (3) estudos observacionais. A seleção dos estudos e a extração dos dados foram realizadas aos pares e de forma independente. O risco de viés foi avaliado pela ferramenta do *Joanna Briggs Institute*. **Resultados:** No total, foram incluídos 24 estudos com 16.376 atletas com COVID-19. A maioria dos atletas eram assintomáticos ou apresentaram sintomas leves. Nos exames de imagem, 2,6% (74/2.868) dos atletas apresentaram miocardite, 0,33% (17/5043) pericardite e 9% (107/1188) derrame pericárdico, além de 0,6% (61/9610) apresentarem elevação da troponina. No eletrocardiograma, 3,5% (337/9610) dos atletas apresentaram alguma modificação, como inversão da onda T, supra e infradesnívelamento do segmento ST, fibrilação atrial e intervalo PR curto. **Conclusão:** Apesar das complicações cardíacas encontradas em atletas com COVID-19, ainda não há uma associação clara desses achados com eventos adversos graves, como a morte súbita no esporte. Portanto, estudos prospectivos de alta qualidade e com acompanhamento estruturado são necessários para confirmar a associação desses achados com a saúde e o desempenho dos atletas.

**Palavras-chave:** covid-19; atletas; cardiopatias.

**Área temática:** epidemiologia



## SAÚDE EMOCIONAL DE ADOLESCENTES APÓS PANDEMIA DE COVID-19

Radyjia de Lima Pinto<sup>1</sup>; Kesia Palma-Rigo<sup>2</sup>; Ana Carolina Alarcão<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista do Paraná

<sup>2</sup> Docente – Faculdade Adventista Paranaense e Docente colaboradora no programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup> Coordenadora do curso de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

**Introdução:** As mudanças no estilo de vida decorrentes das medidas tomadas no período da pandemia do COVID-19 influenciaram a saúde emocional dos adolescentes. Por estarem em uma fase crítica do desenvolvimento são um grupo ainda mais vulnerável, e pela ausência das atividades escolares e sociais foram afetados de forma expressiva. **Objetivo:** Avaliar a ocorrência e a relação de risco das doenças psicoemocionais e uso de medicamentos entre adolescentes de uma escola com regime de internato. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo observacional transversal em alunos de uma escola no interior do Paraná, aprovado pelo COPEP com número 15201519.8.0000.0104, foram entrevistados 39 alunos com idade entre 14 e 17 anos. A coleta de dados ocorreu entre outubro e novembro de 2021, utilizando uma parte do questionário PNAUM - Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos no Brasil. Análise bivariada dos dados foi realizada com o Programa STATA 12. **Resultados:** Análise parcial - população estudada, 74,36% (29/39) pertenciam ao sexo feminino e 25,64% (10/39) ao sexo masculino, 38,46% (15/39) apresentavam alguma doença relacionada ao sistema nervoso central (SNC), 28,2% (11/39) fazia uso de algum medicamento contínuo, destes, 12,82% faziam uso de psicotrópicos. Observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre o sexo e a ocorrência de alguma doença relacionada ao SNC ( $P < 0,05$ ), sendo que dos adolescentes que apresentavam ansiedade, 100% pertenciam ao sexo feminino, também houve uma relação entre o sexo e manifestação de sintomas ( $P < 0,05$ ), onde 93,75% das meninas afetadas manifestavam mais de um sintoma, enquanto apenas 6,25% dos meninos apresentavam o mesmo perfil. Não houve correlações estatisticamente significativas com relação ao uso de medicamentos e o sexo. **Conclusão:** Este estudo aponta para uma relação entre doenças psicoemocionais e manifestações de forma prevalente em adolescentes do sexo feminino, o que indica um maior risco para essa população.

**Palavras-chave:** saúde mental; adolescentes.

**Financiador (es):** (opcional)

**Área temática:** Epidemiologia



## PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND *IN VITRO* ANTIOXIDANT POTENTIAL FROM *Psychotria phyllocalymmoides*

Rafael Vieira<sup>1</sup>; Eduarda Carniel Quaglio<sup>1</sup>; Angélica de Almeida<sup>2</sup>; Silvana Maria de Oliveira<sup>3</sup>; Vagner Marques de Moura<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos de Graduação em Engenharia de Produção (Agroindústria), Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação em Estética Avançada, Unicesumar, Maringá

<sup>3</sup>Docente s- Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá

**Introduction:** The genus *Psychotria* (Rubiaceae) is a particularly rich source of medicinal natural products and many of its species have been widely used for treating bronchitis, ulcer, inflammatory diseases and disorders of the central nervous system. Several bioactive compounds were characterized, alkaloids and flavonoids being the most prominent of them.

**Aim:** Therefore, we evaluate the pharmacognostic perfil of the crude extract from *Psychotria phyllocalymmoides*, and the antioxidant capacity by free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and cation radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays.

**Material and Methods:** The phytochemical profile of crude methanolic extract (PP-1) obtained by maceration of leaves from *P. phyllocalymmoides* was carried out through chemical reactions for the alkaloids, flavonoids and terpenoids classes, as well as thin layer chromatography (TLC) and fluorescence analysis under ultraviolet (UV) light at 254 nm and 365 nm. The antioxidant potential assay of PP-1 (2.0 mg/mL) was performed by the DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> free radical sequestration methods, using the Trolox curve (15 µM to 150 µM) for quantification. The sample was transferred for testing and were later added 3.0 mL of EtOH 80%, 300 µL of DPPH<sup>•</sup> 0.5 µM and 30 µL of ABTS<sup>•+</sup> 7 mM solution. Discoloration of PP-1 was measured at 517 nm and 734 nm, respectively, after incubation for 10 min. in dark a room temperature. **Results:** After applying specific spraying reagents for a particular active constituent, the results of TLC and phytochemical analysis showed the presence of alkaloids and flavonoids, as well as positive test for terpenoids. The maximum potential antioxidant reached against DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals were 540.50±3.29 µmol/g and 50.35±3.25 µmol/g, respectively. **Conclusion:** The preliminary antioxidant results obtained it is important to continue the biomonitoring study of fractionation of the extract of *P. phyllocalymmoides* in order to isolated the compounds responsible for this activity.

**Keywords:** *Psychotria*; pharmacognostic; antioxidant.

**Financial support:** CAPES.

**Thematic area:** Pharmacognosy.



## EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO NA ÁREA DOS ADIPÓCITOS DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS TRANSGÊNICOS PARA ApoCIII HUMANA

Nilton Rodrigues Teixeira Junior<sup>1</sup>; Diogo Rodrigues Jimenes<sup>2</sup>; Cristiany Schultz<sup>3</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>4</sup>; Jairo Augusto Berti<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Fisiologia do Exercício; Departamento de Ciências Fisiológicas Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Departamento de Educação Física; Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Mestra em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A Apolipoproteína CIII humana (apoCIII) está presente principalmente em lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícrons e VLDL). Adicionalmente, camundongos transgênicos que superexpressam a ApoCIII tornam-se hipertrigliceridêmicos e hipercolesterolêmicos. Tais distúrbios podem acarretar alterações metabólicas como esteatose hepática e obesidade, por isso, esses modelos animais são excelentes modelos para estudar metabolismo em diversas condições diferentes, como o exercício físico. Ademais, pesquisas mostram que a prática de exercícios físicos de moderada intensidade é capaz de potencializar a beta oxidação e portando o uso do tecido adiposo como substrato energético. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi de avaliar a área dos adipócitos perigonadais de camundongos transgênicos para apoCIII humana submetidos ao treinamento em esteira. **Material e métodos:** Camundongos da linhagem C57BL/6 divididos em 4 grupos (n=6): NTG (não transgênico), NTG-EX (não transgênico exercitado), CIII (transgênico sedentário) e CIII-EX (transgênico exercitado) foram submetidos ao treinamento moderado em esteira 3 vezes por semana durante 8 semanas, constituído de 44 minutos de corrida em uma velocidade aproximada em 55% obtida do teste de esforço. Após o período experimental, os animais foram submetidos a eutanásia, o tecido adiposo perigonadal foi coletado e submetido a rotina de processamento histológico. Vale ressaltar que este estudo foi previamente aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança nº 819/2013 e pelo Comitê de ética no uso de animais nº020/2013 da UEM. **Resultados:** Dados obtidos pelo Anova *two-way* mostraram diminuição da área dos adipócitos nos grupos CIII-EX e NTG-EX quando comparados aos seus respectivos sedentários (p=0.02). Adicionalmente, a expressão da apoCIII não foi capaz de aumentar a área dos adipócitos (p=0.8). **Conclusão:** A superexpressão da apoCIII não modificou a área dos adipócitos. Contudo, o exercício físico moderado em esteira reduziu a área dos mesmos nos grupos submetidos ao treinamento.

**Palavras-chave:** dislipidemia; exercício; tecido adiposo.

**Área temática:** Fisiologia.



## POTENCIAL AÇÃO ANTI-OBESIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICOS DA SEMENTE DE *TAMARINDUS INDICA*

Gustavo Henrique de Souza<sup>1</sup>, Beatriz Paes Silva<sup>1</sup>, Milena Thais Francisco da Silva<sup>2</sup>, Adelar Bracht<sup>3</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>3</sup>, Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A obesidade é uma desordem metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura. Uma das formas terapêuticas para tratamento da doença se dá através da inibição da lipase pancreática. Entretanto, esses fármacos causam diversos efeitos colaterais. **Objetivos:** Reutilizar os resíduos de tamarindo (sementes) descartados pela indústria alimentícia e avaliar o potencial uso sobre o controle da obesidade. **Materiais e métodos:** Foi preparado extrato hidroetanólico (70%) da semente do tamarindo adquiridas de um produtor local, liofilizado, e avaliado o efeito de uma curva de concentração sobre a atividade da lipase pancreática. Para o ensaio *in vitro* foi utilizado a lipase suína (Sigma) e o para-nitrofenil palmitato como substrato. No estudo *in vivo*, camundongos Swiss receberam azeite extra virgem (5mL/Kg) e o extrato nas doses de 250 e 500 mg/Kg via gavagem. A concentração de triglicerídeos foi determinada em jejum e durante 6 horas após a administração do azeite, com o auxílio do aparelho Accutrend Plus (CEUA nº 9905181121). **Resultados:** O extrato da semente foi capaz de inibir de forma concentração dependente a lipase pancreática, com um IC<sub>50</sub> de 31,51 µg/mL. Adicionalmente, o extrato preveniu o aumento de triglicerídeos plasmáticos após administração do azeite de forma dose dependente, apresentando uma redução de 54,6% e 74% nas doses de 250 e 500mg/mL, respectivamente. A maior dose apresentou um perfil de redução de triglicerídeos muito próxima aos valores do Orlistate, fármaco inibidor da lipase pancreática. **Conclusão:** O extrato hidroetanólico da semente do tamarindo é uma potencial forma terapêutica que poderá ser utilizada, ao menos como coadjuvante, no controle da obesidade.

**Palavras-chave:** obesidade; tamarindo; inibição enzimática.

**Financiador (es):** CAPES e CNPq.

**Área temática:** Farmacologia.



## POTENCIAL AÇÃO ANTIHIPERGLICÊMICA DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Malpighia emarginata*: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Beatriz Paes Silva<sup>1</sup>, Gustavo Henrique de Souza<sup>1</sup>, Driely Cardoso Bueno<sup>2</sup>, Adelar Bracht<sup>3</sup>,  
Rosane Marina Peralta<sup>3</sup>, Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A DM tipo II é uma das doenças mais comuns do século XXI, acometendo cerca de 387 milhões de pessoas no mundo, com perspectiva de ultrapassar 693 milhões até 2045. Os esquemas terapêuticos do diabetes tem por função manter a glicemia plasmática dentro dos limites de normalidade. Existem várias classes de medicamentos para o controle do diabetes, sendo um deles os inibidores da  $\alpha$ -amilase pancreática. **Objetivo:** Avaliar o potencial uso do extrato da semente de *M. emarginata* no controle glicêmico. **Material e métodos:** Foi preparado extrato hidroetanólico (70%) da semente da *M. emarginata*, liofilizado e utilizado para construção da curva de inibição sobre a amilase pancreática (Sigma), utilizando o amido como substrato da reação. Além disso, o extrato também foi utilizado para avaliar o efeito *in vivo* sobre a absorção de amido (Protocolo 9905181121). Para isso, foi realizado teste de tolerância oral ao amido (1g/Kg) com doses de 250 e 500 mg/Kg do extrato. A glicemia foi determinada em jejum e durante 2 horas após a administração do amido, com o auxílio de um glicosímetro. **Resultados:** O extrato inibiu de maneira dependente da concentração a  $\alpha$ -amilase, com IC50 de 37,90  $\mu$ g/mL. Em animais, o extrato também apresentou inibição da absorção do amido com o aumento da dose do extrato. Sendo que, a dose de 250 e 500 mg/kg impediu 11,67% e 69% o aumento da glicemia plasmática. **Conclusão:** Embora, os resultados do presente trabalho revelam uma evidente magnitude de inibição nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, o extrato hidroetanólico da semente da *Malpighia emarginata* pode ser considerado uma potencial forma terapêutica para o tratamento e controle da hiperglicemia em animais.

**Palavras-chave:** Acerola; Diabetes; Hiperglicemia.

**Financiador (es):** Capes e CNPq.

**Área temática:** Farmacologia.



## EFEITO DO BOLDINE SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATO EM FÍGADO DE RATO EM PERFUSÃO

Milena Thais Francisco da Silva<sup>1</sup>, Laís Cristina de Lima Silva<sup>2</sup>, Gustavo Henrique de Souza<sup>3</sup>, Beatriz Paes Silva<sup>3</sup>, Anacharis Babeto de Sá Nakanishi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico de graduação (Iniciação Científica) em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup> Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá/PR.

<sup>3</sup> Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá/PR.

<sup>4</sup> Docente do Departamento de Bioquímica, Pós graduação em Bioquímica e Pós graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá.

**Introdução:** Boldine é um alcalóide encontrado principalmente nas folhas e tronco da árvore boldo chileno (*Peumus boldo*). Este alcalóide tem sido caracterizado como antioxidante e antidiabético. **Objetivo:** O objetivo geral da presente proposta foi realizar um estudo sistemático dos efeitos metabólicos do boldine sobre o metabolismo de carboidratos de fígado de rato em perfusão isolada. **Material e métodos:** Todos procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela CEUA-UEM (nº6416011220). Foram utilizados ratos machos Wistar. O fígado dos animais previamente anestesiados foi removido cirurgicamente para a perfusão não-recirculante. Boldine foi infundido nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Amostras do perfusado efluente foram coletadas a cada 2 minutos e usadas para quantificação de glicose, lactato e piruvato. O consumo de oxigênio foi monitorado de forma contínua através do eletrodo de prata/platina. **Resultados:** Boldine aumentou a produção de lactato e piruvato, sinalizando um aumento da via glicolítica. O alcalóide também reduziu a produção de glicose de forma concentração dependente, com concentração inibitória média de 71,85  $\mu\text{M}$ . O consumo de oxigênio não foi modificado pelas concentrações de boldine avaliadas. **Conclusão:** Conclui-se que o boldine estimulou a glicólise e inibiu a gliconeogênese sem interferir diretamente no consumo de oxigênio do fígado de rato. Estas alterações de fluxo poderiam contribuir para justificar a redução da glicemia plasmática em ratos diabéticos tratados com boldine. Sendo assim, o boldine pode ser considerado uma potencial ferramenta terapêutica para o controle do diabetes.

**Palavras-chave:** alcalóide; antidiabético, gliconeogênese.

**Área temática:** Farmacologia



## ASSOCIAÇÃO DO SNV rs1800896 DE *IL10* COM A GRAVIDADE DA COVID-19

Janaina Nicolau de Oliveira<sup>1</sup>; Caroline Yukari Motoori Fernandes<sup>1</sup>; Eliza Pizarro Castilha<sup>1</sup>; Sarah Lott Moretto<sup>1</sup>; Rafaela Roberta de Jaime Curti<sup>1</sup>; Giulia Mariane Fortunato<sup>2</sup>; Mariane Ricciardi da Silva<sup>2</sup>; Isaura Maria Fuzinato<sup>2</sup>; Andrea Name Colado Simão<sup>3</sup>; Karen Brajão de Oliveira<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Londrina

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Patologia Aplicada, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

**Introdução:** a *IL-10* tem sido elencada como um possível marcador de gravidade da COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, sendo encontrada em elevadas concentrações plasmáticas no quadro grave. O SNV rs1800896 localizado na região promotora do gene *IL10*, pode influenciar os níveis séricos desta citocina, bem como a suscetibilidade às doenças virais. Porém, não existem estudos que avaliem se a presença deste polimorfismo está relacionada à gravidade da COVID-19. **Objetivo:** avaliar a associação do SNV rs1800896 com a gravidade da COVID-19, na cidade de Londrina-PR. **Material e métodos:** o projeto foi aprovado pelo CEP-UEL (CAAE: 36247920.1.0000.5231). Pacientes diagnosticados com COVID-19, previamente à vacinação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a coleta de sangue periférico. Até o momento, 185 destas amostras, foram submetidas à genotipagem por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, após extração do DNA por kit comercial, sendo subdivididas nos grupos leve (66), moderado (55) e grave (64), segundo critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. Os dados foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado. **Resultados:** no grupo leve, o genótipo AA foi o mais frequente (54,5%), enquanto os grupos moderado e grave apresentaram o genótipo AG em maior frequência, 52,7% e 45,3%, respectivamente. Não foi encontrada associação significativa entre os genótipos com a gravidade da COVID-19, nos modelos codominante e recessivo ( $p > 0,05$ ). No entanto, o modelo dominante demonstrou uma tendência de associação entre a presença do alelo G com o grupo moderado e do genótipo AA com o grupo leve ( $p = 0,052$ ). **Conclusão:** até o momento, nossos dados sugerem que o SNV rs1800896 de *IL10* não está associado à forma grave da COVID-19. Porém, o aumento do número amostral e análise de haplótipos, poderiam contribuir para maior compreensão dos polimorfismos da *IL-10*, na gravidade da COVID-19.

**Palavras-chave:** citocina imunossupressora; variante de nucleotídeo único; doença do coronavírus.

**Área temática:** imunogenética.





## CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES COM COVID-19 ATENDIDOS NO HOSPITAL PARANÁ EM MARINGÁ

Amanda de Amorim Fernandes Toledo Martins<sup>1</sup>; Matheus Yugo Inoue<sup>2</sup>; Victor Hugo de Souza<sup>3</sup>; Matheus Braga<sup>3</sup>; Sergio Grava<sup>3</sup>; Jeane Eliete Laguila Visentainer<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, 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 Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

**Introdução:** A COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, é uma doença respiratória com inflamação intensa e causa prejuízo ao hospedeiro. Estes são influenciados diretamente por vários fatores, como cepa viral e características do hospedeiro, especialmente aquelas que modificam sua resposta imunológica. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo caracterizar uma amostragem de pacientes atendidos em um hospital de Maringá, no Paraná, com diferentes formas clínicas de COVID-19, qualificando-as para estudos de associação genética do hospedeiro com a COVID-19. **Material e métodos:** Assim, este estudo descritivo foi feito utilizando-se de uma amostragem de 144 indivíduos com COVID-19 atendidos no Hospital Paraná, em Maringá, Paraná. Estes foram classificados quanto à forma clínica da doença (leve, moderada e grave), características demográficas e sintomatológicas. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética COPEP-UEM sob nº4.357.896 e CAAE: 38095420.5.0000.0104. As análises estatísticas foram feitas por regressão logística utilizando-se do *software* R versão 4.2.0. Estimativas de poder estatísticos para frequências alélicas foram feitas usando o *software* QUANTO. Para todas as análises foi utilizado como significativo  $P < 0,05$ . **Resultados:** As características individuais dos pacientes com diferenças significativas entre os grupos de COVID-19 foram o IMC ( $P = 0,047$ ) e a presença de comorbidades ( $P < 0,001$ ). Essas características foram associadas ao risco aumentado para formas mais graves da doença. Dentro do quadro de sintomas, as manifestações respiratórias graves mostraram diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) entre os grupos de infectados pelo SARS-CoV-2, indicando que os pacientes com tais sintomas tendem a desenvolver formas mais graves da doença. **Conclusão:** As formas clínicas da COVID-19 avaliadas nesta amostragem apresentam diferenças demográficas e sintomatológicas estatisticamente significativas. Isso, em conjunto com uma avaliação do poder estatístico do alelo objeto de estudo, indicam um potencial dessas amostras para estudos de associação genética.

**Palavras-chave:** epidemiologia; coronavírus; sintomatologia.

**Financiador (es):** Laboratório de Imunogenética (LIG-UEM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária (FA).

**Área temática:** Imunogenética.



## AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO -174C>G DO GENE *IL6* EM PACIENTES COM COVID-19

Pedro Emanuel Santiago Silva<sup>1</sup>; Matheus Braga<sup>2</sup>; Victor Hugo de Souza<sup>2</sup>; Jeane Eliete Laguila Visentainer<sup>3</sup>; Joana Maira Valentini Zacarias Santim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, 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 Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19) é causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). A IL-6 é uma citocina que atua na regulação da resposta inflamatória e se encontra presente em elevados níveis na tempestade inflamatória de citocinas em casos mais graves de COVID-19. Polimorfismos presentes na região promotora do gene *IL6*, como -174C>G, podem estar relacionados com alterações na expressão desta citocina e, assim, estarem envolvidos com casos mais graves de COVID-19. **Objetivo:** Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar se polimorfismo -174C>G (rs1800795) pode influenciar na gravidade da doença. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo de caso-controle com 30 pacientes moderados e 30 graves internados no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com COVID-19. O polimorfismo -174C>G foi genotipado por qPCR (*QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION*) e a análise estatística foi realizada no software SNPStats. Os grupos foram comparados em relação ao genótipo e alelos, e valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** A distribuição dos genótipos estava de acordo com o esperado pelo *Hardy-Weinberg equilibrium*. Os grupos estavam pareados de acordo com o sexo, no entanto, o teste T mostrou uma diferença estatisticamente significativa na média de idade entre pacientes moderados ( $54,73 \pm 14,16$ ) e graves ( $66,43 \pm 16,86$ ), por isso a variável idade foi incluída na análise de regressão logística. Apesar de não ser observada associação entre os genótipos e a gravidade da doença, o alelo G apresentou uma frequência de 65% em pacientes moderados e 60% em graves, e o alelo C uma frequência de 35% em pacientes moderados e 40% em graves. **Conclusão:** O polimorfismo -174C>G do gene *IL6* não está associado com a gravidade da doença entre pacientes moderados e graves. Para confirmação de tais achados é necessário analisar um maior número de amostras.

**Palavras-chave:** interleucina 6; polimorfismo genético; covid-19.

**Financiador (es):** Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM), CAPES, e CNPq.

**Área temática:** Imunogenética.



## IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS T-CAR EM DOENÇAS ONCO-HEMATOLÓGICAS DERIVADAS DE CÉLULAS B. UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE REVISÕES SISTEMÁTICAS

Mariana Akemi Sonoda Shiga<sup>1</sup>; Edson Tatsuo Miyasiro Fujimoto<sup>1</sup>; Matheus Yugo Inoue<sup>1</sup>; Flávia Letícia Doro<sup>1</sup>; Maria Vitória Alves de Lisbôa<sup>1</sup>; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré<sup>2</sup>; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose<sup>2</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>2</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico (a) de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá/PR

**Introdução:** imunoterapia com células T- CAR são terapias individualizadas que agem em alvos específicos, usando as próprias células do paciente para o tratamento. A terapêutica consiste na extração de células de defesa do organismo do paciente que vão ser adaptadas em laboratório para combater o tumor. **Objetivo:** fazer uma revisão sistemática de revisões sistemáticas para avaliar a efetividade terapêutica e toxicidade da terapia com células T- CAR para os antígenos CD19 e CD20 em doenças onco-hematológicas derivadas de células B. **Material e métodos:** a seleção das publicações de interesse para a estruturação da revisão sistemática ocorreu em 3 bases de dados científicas: PubMed, Embase e Cochrane Library, seguindo as recomendações da estratégia PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). **Resultados:** após toda busca inicial, aplicação dos critérios de inclusão e exclusão e validação por especialistas, 10 artigos foram selecionados, dentre esses 2 reportam informações sobre tratamento com células CAR-T anti-CD19, 6 sobre células CAR-T CD19 e 2 sobre células CAR-T CD19 e CAR-T CD20 associadas. As imunoterapias apresentaram resultados importantes em relação à eficácia terapêutica; tanto nos estudos individuais das células CAR-T CD19 e CD20, como com as células em associação foram reportadas taxas de respostas promissoras. Em relação aos efeitos adversos observados destacam-se a toxicidade, incluindo fatos como a síndrome de liberação de citocinas e a neurotoxicidade; outras situações menos marcantes também foram relatadas em alguns dos trabalhos, como anemia e hipotensão. **Conclusão:** a terapia com células CAR-T visando os antígenos alvo CD19 isolado e associado ao CD20 mostrou-se promissora em neoplasias hematológicas, apesar dos efeitos adversos encontrados.

**Palavras-chave:** imunoterapêutico, onco-hematologias, imunorreceptores.

**Área temática:** Imunologia



## INFLUÊNCIA DA DEPRESSÃO E DO ESTRESSE NOS MECANISMOS EFETORES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO. UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE REVISÕES SISTEMÁTICAS

Edson Tatsuo Miyasiro Fujimoto<sup>1</sup>; Matheus Yugo Inoue<sup>1</sup>; Flávia Letícia Doro<sup>1</sup>; Maria Vitória Alves de Lisboa<sup>1</sup>; Mariana Akemi Sonoda Shiga<sup>1</sup>; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré<sup>2</sup>; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose<sup>2</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoní<sup>2</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico (a) 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)

**Introdução:** as emoções são sentimentos que se alteram frequentemente por fatores internos e externos, modulando a qualidade de vida das pessoas. Desequilíbrios no sistema das emoções podem gerar problemas psicológicos, como a depressão e o estresse, que também estão associados a alterações no sistema imunológico. **Objetivo:** identificar a associação e a influência das emoções sobre o sistema imune por meio de uma revisão sistemática de revisões sistemáticas. **Material e métodos:** a revisão sistemática foi feita em 4 bases de dados diferentes: PubMed, Embase, Cochrane e LILACS, de acordo com recomendações da estratégia PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). O período de busca, análise e inclusão dos artigos foi de 08/2021 a 05/2022. **Resultados:** inicialmente, foram encontrados 62 artigos. Após exclusão de duplicatas, leitura completa dos artigos, validação das tabelas e busca nas referências, 10 publicações permaneceram, sendo 3 destas relacionadas a depressão e sistema imune, 5 estresse e sistema imune, e 2 associando depressão e estresse com o sistema imune. A depressão parece predispor a senescência do sistema imune e um ambiente inflamatório rico em neutrófilos. Por outro lado, o estresse parece exercer um papel dicotômico na resposta imune dependendo da sua duração. Apesar do estresse agudo trazer em um primeiro momento uma melhora nas funções imunológicas, com o passar do tempo (crônico) observa-se efeitos deletérios supressores de neutrófilo, redutores da citotoxicidade das células NK e da resposta linfocitária; além da diminuição da imunidade em geral, especialmente nas mucosas. A associação do estresse e da depressão apresentam efeitos cumulativos no sistema imune, o que pode explicar o pior prognóstico das infecções virais em pacientes com essas manifestações psicológicas. **Conclusão:** esses dados sugerem uma possível associação entre depressão e estresse, quando estudados juntos ou separadamente, com redução da atividade do sistema imunológico.

**Palavras-chave:** sistema imune; emoções; saúde mental.

**Área temática:** Imunologia



## CITOCINAS SÉRICAS EM RESPOSTA A INFECÇÃO POR SARS- CoV-2: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Amanda Larissa Dias Leme<sup>1</sup>; Beatriz Ignácio Pinel<sup>1</sup>; Brenda Serenini Perina<sup>1</sup>; Allyson Yuiti Otofujii Inada<sup>1</sup>; Jonathan Sanches Rosa<sup>1</sup>; Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos-Millaré<sup>2</sup>; Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose<sup>2</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardoni<sup>2</sup>; Jorge Juarez Vieira Teixeira<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmico(a) 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

**Introdução:** a pandemia da Covid-19 teve início em 2019 em Wuhan, na China, e devido à alta transmissibilidade e contágio do vírus denominado SARS-CoV-2, a doença tornou-se uma preocupação a nível mundial. **Objetivo:** realizar uma revisão sistemática para compreender os mecanismos da resposta imune perante o vírus SARS-CoV-2 e evolução da Covid-19, visando o entendimento dos mecanismos efetores e patológicos. **Material e métodos:** foi realizada uma busca sistemática de publicações científicas na base de dados eletrônica PubMed de acordo com recomendações da estratégia PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses. O período de busca, análise e inclusão dos artigos foi limitado ao período de 1/2020 a 2/2021. Os MeSH Terms foram definidos em consenso e validados por especialistas. Realizou-se também uma busca com emprego de termos livres e palavras-chave, que acarretou no aumento da sensibilidade de busca das publicações, além do uso de filtros que permitiram refinar a pesquisa de acordo com os objetivos estabelecidos. **Resultados:** após análise dos artigos na íntegra, seis artigos se mantiveram na revisão sistemática. Os artigos incluídos estudaram o papel de sete interleucinas (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-2R, TNF-alfa) na gravidade e progressão da infecção causada pelo SARS-CoV-2 em mais de 36.595 pacientes infectados. A resposta imune protetora ao vírus é dependente da ativação da resposta Th1, que deve ser regulada, pois a produção em excesso das interleucinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e proliferativas desregula a resposta imune, desencadeando a tempestade de citocinas e causando a forma mais grave da Covid-19. **Conclusão:** as evidências relacionadas a resposta imune identificadas nesta revisão mostraram que os biomarcadores IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-2R e TNF-alfa estão relacionados com um pior prognóstico para a Covid-19, assim como a evolução dos casos para a severidade e possíveis óbitos.

**Palavras-chave:** imunologia; interleucinas; covid-19.

**Área temática:** imunologia



## HEMATOLOGICAL PROFILE AND BIOCHEMICAL MARKERS OF COVID-19 DEATH COHORT IN REGIONAL UNIVERSITY HOSPITAL OF MARINGÁ

Léo Shigueki Sato<sup>1</sup>; Deborah de Castro Moreira<sup>1,2</sup>; Dennis Armando Bertolini<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Virology, State University of Maringá (UEM), Maringá/PR

<sup>2</sup>Graduate Program in Health Sciences (Doctoral), State University of Maringá (UEM), Maringá/PR

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

**Introduction:** COVID-19 is a respiratory disease in which infected individuals may present progressive complications and eventual death. Thus, rapid identification of risk factors for disease severity can help clinicians in the management of these patients. **Objective:** Analyze the hematological profile and biochemical markers of COVID-19 death cohort in the Regional University Hospital of Maringá (HUM). **Materials and methods:** Laboratory test results were obtained from 404 diagnosed patients for COVID-19 hospitalized in the HUM from March 2020 to May 2021, through the Sistema de Gestão Ambulatorial e Hospitalar do SUS (GSUS). The t-test for independent samples was performed using Jamovi 2.0 to compare the hematological (hemoglobin, hematocrit, leucocytes, lymphocytes, neutrophils, and platelets count) and biochemical (D-dimer, LDH, C reactive protein, AST, ALT, bilirubin, urea, and creatinine) findings between survivors and death cohort. The value of  $p < 0.05$  (CI 95%) was considered significant. The study was approved by the Permanent Committee on Ethics in Research with Humans (COPEP) of the State University of Maringá (Protocol nº 4.634.043). **Results:** Among 404 patients included in this study, 101 died and the mean age of these patients was higher ( $67.2 \pm 15.2$ ) than the survived ( $55.0 \pm 15.3$ ) ( $p < 0.001$ ). The death cohort had a significant increase in leukocyte ( $p < 0.001$ ) and neutrophil ( $p < 0.001$ ) counts and a significant decrease in hemoglobin ( $p = 0.016$ ), lymphocyte ( $p < 0.001$ ), and platelets count ( $p = 0.004$ ) compared with survivors' cases. Furthermore, in our findings, some biochemical markers showed a significant increase in the death cohorts, such as D-dimer ( $p < 0.001$ ), LDH ( $p < 0.001$ ), AST ( $p = 0.002$ ), urea ( $p < 0.001$ ), and creatinine ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** It was possible to observe a significant difference in hematological and biochemical profiles between survivors and death cohort, and these parameters may be used in the hospital context for risk stratification purposes.

**Keywords:** COVID-19; hematological profile; biochemical markers.

**Funding:** This study is financed by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES).

**Thematic area:** Microbiology

## HIGIENE DAS MÃOS NO AMBIENTE HOSPITALAR ENTRE PROFISSIONAIS, RESIDENTES E ESTUDANTES: SERÁ QUE ESTAMOS FAZENDO A NOSSA PARTE?

Fabricio Furtado Vieira<sup>1</sup>, Hilton Vizi Martinez<sup>3</sup>, Marcos Vinícios Cardoso<sup>1</sup>, Leonardo Jose Afonso de Carvalho Ito<sup>1</sup>, Maria Julia Rossi Mendes<sup>1</sup>, Jeferson Yukio Cabeças<sup>1</sup>, Victor Akihiro Ishikawa<sup>1</sup>, Joshua Yamakami<sup>1</sup>, Douglas Sotti Gomes<sup>1</sup>, Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, Hospital Universitário Regional de Maringá

**Introdução:** As infecções hospitalares geram alta morbimortalidade as quais podem ser diminuídas com a correta higiene das mãos (HM) nos momentos em que esta é preconizada. A HM é a medida individual mais simples e menos dispendiosa para prevenir a propagação das infecções, porém tem sido negligenciado por muitos profissionais da saúde. **Objetivo:** Quantificar e comparar a adesão à HM entre profissionais, residentes e acadêmicos de graduação de medicina e enfermagem de um hospital de ensino do Paraná. **Material e métodos:** A pesquisa contou com 16 acadêmicos participantes de um projeto no Serviço de Controle de infecções hospitalares que avaliaram a adesão à HM de profissionais, residentes e acadêmicos nos 5 momentos preconizados pela Organização Mundial de Saúde. Antes de contato com paciente; antes da realização do procedimento asséptico; após risco de exposição a fluídos corporais; após contato com paciente; após contato com superfícies próximas ao paciente. As observações foram registradas manualmente em questionário no *Google forms*, e os dados tabelados em aplicativo excel e os resultados analisados estatisticamente. A adesão foi considerada nula quando o profissional não executava a HM em nenhum dos 5 momentos recomendados. **Resultados:** Durante 8 meses foram realizadas 849 observações. A adesão à HM foi de 49% de modo geral. Quando os grupos foram avaliados individualmente percebemos que entre os residentes houve maior adesão com 63,2% (55/87) seguido pelos profissionais 50,2% (281/560) e os estudantes 39,3% (80/202). Entre os acadêmicos de graduação a maioria 60,7% não realizou a HM em nenhum dos 5 momentos propostos. **Conclusão:** Os resultados são preocupantes uma vez que demonstram que a HM tem sido negligenciada em momentos cruciais para a transmissão de infecções por todas as categorias avaliadas. Maior comprometimento em reduzir as infecções nos serviços de saúde deve ser exigido de todas as categorias avaliadas.

**Palavras-chave:** infecção hospitalar; antissepsia das mãos; capacitação em serviço.

**Área temática:** Microbiologia



## INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE *Fusarium* spp.

Larissa de Souza Brianezi <sup>1</sup>; Pollyana Cristina Vincenzi Conrado <sup>2</sup>; Gabriela Franco de Oliveira Barbosa <sup>1</sup>; Glaucia Sayuri Arita <sup>2</sup>; Juliana Aparecida Fernandes <sup>3</sup>; Barbara Cipulo Legabão <sup>3</sup>; Isis Regina Grenier Capoci <sup>4</sup>; Wilker Caetano <sup>5</sup>; Patricia de Souza Bonfim de Mendonca<sup>4</sup>; Erika Seki Kioshima Cotica<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<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>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** O gênero *Fusarium* são fungos classificados como fitopatógenos, porém, podem apresentar capacidade de infecção, como nos casos de ceratites, infecções sistêmicas e onicomicoses (OM). A etiologia da OM envolve as espécies *F. solani* e *F. oxysporum*, e entre as novas opções terapêuticas para OM, destaca-se a Inativação Fotodinâmica (IFD), que associada à Curcumina (CUR), tem mostrado uma interessante proposta no contexto antifúngico. **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica da IFD+CUR sobre isolados clínicos de *Fusarium*. **Material e métodos:** A CUR foi fornecida pelo Núcleo de pesquisa em sistemas fotodinâmicos da UEM e as cepas, *F. solani* e *F. oxysporum*, foram obtidas a partir amostras coletadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas, aprovado pelo comitê de ética (nº2.748.843). Para irradiação foi utilizado LED azul (440nm a 460nm) e o ensaio foi realizado com a CUR nas concentrações de 50-0.09 µM, e inóculo padronizado em 10<sup>5</sup> UFC/mL. Após incubação de 10 minutos no escuro, as placas foram irradiadas na fluência de 30 J/cm<sup>2</sup>. A ação antifúngica da IFD+CUR foi avaliada pela inibição total do crescimento fúngico (atividade fungicida) e quantitativamente pela contagem de células fúngicas viáveis (Log UFC/mL). Os resultados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0*<sup>®</sup>, com os teste *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) e *Tukey*. **Resultados:** A IFD+CUR teve atividade fungicida para *F. oxysporum* na concentração de 12,5 µmol/L e 6,25 µmol/L para *F. solani*. Além disso, a IFD+CUR inibiu significativamente o crescimento fúngico (≥1 Log UFC/mL) a partir da concentração de 0,78 µmol/L (*p*<0.05), para ambas espécies analisadas. **Conclusão:** Os resultados deste estudo são promissores e incentivam mais estudos para avaliar a atividade antifúngica da IFD+CUR nos casos de onicomicose.

**Palavras-chave:** inativação fotodinâmica; curcumina; onicomicose.

**Área temática:** Microbiologia





## AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE CARVACROL E NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS CONTRA *Salmonella* spp.

Vinicius Alexandre<sup>1</sup>; Isabelly Vitoria da Silva Gonçalves<sup>2</sup>; Andreia Farias Pereira Batista<sup>3</sup>; Maíra Dante Formagio<sup>4</sup>; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sád<sup>5</sup>; Renata Katsuko Takayama Kobayashi<sup>6</sup>; Gerson Nakazato<sup>6</sup>; Jane Martha Graton Mikcha<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-graduação (doutorado) em Ciências de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-graduação (doutorado) em Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina

**Introdução:** *Salmonella* spp. é uma das principais causas de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no mundo, sendo uma das maiores preocupações da saúde pública mundial. Produtos naturais antibacterianos vêm sendo uma alternativa para esta problemática.

**Objetivo:** Avaliar a ação antibacteriana dos compostos naturais carvacrol e nanopartícula de prata, de forma individual e associados frente a *Salmonella* spp. **Material e métodos:** Foram utilizadas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella enterica* serovar Enteritidis envolvida em surto alimentar. Avaliou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do carvacrol e da nanopartícula de prata de forma isolada e em combinação através do método de *checkerboard*, frente aos isolados de *Salmonella* spp. **Resultados:** Em relação à *S. Typhimurium*, o carvacrol teve como CIM um resultado de 312,5 µg/ml, sendo este igual à CBM, enquanto a nanopartícula de prata mostrou um resultado de 31,25 µg/ml para CIM e CBM. Em seguida, avaliou-se *S. Enteritidis* relacionada ao surto alimentar frente aos mesmos compostos. A CIM do carvacrol foi 625 µg/ml, sendo esta igual à CBM. Em relação à nanopartícula, a CIM e a CBM foram iguais a 61,25 µg/ml. A partir destes resultados foi realizada a associação dos compostos em que carvacrol juntamente com nanopartículas de prata frente à *S. Typhimurium* ATCC 14028 apresentou um índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de 0,99, considerando a associação como aditiva. Em relação à *S. Enteritidis* proveniente de surto quando testadas as mesmas substâncias em conjunto, obteve-se um ICIF de 0,375, sendo assim, sinérgico. **Conclusão:** As substâncias testadas, carvacrol e nanopartículas de prata, tiveram efeito antibacteriano quando testados individualmente. Em associação mostraram-se aditivos frente à cepa padrão *S. Typhimurium* e sinérgicos em relação à *S. Enteritidis* envolvida em surto de DTA, mostrando-se uma alternativa potencial para o controle de microrganismos em alimentos.

**Palavras-chave:** *Salmonella*; produto natural; atividade antibacteriana.

**Área temática:** Microbiologia



## PREVALÊNCIA DE *Acinetobacter baumannii* E *Pseudomonas aeruginosa* EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA COVID EM HOSPITAL ESCOLA

Victória Caroline da Silva Amaral<sup>1</sup>; Lucas Wada<sup>2</sup>; Ihorrana Wencz Alflen<sup>3</sup>; Danielle Rosani Shinohara<sup>4</sup>; Josy Anne Silva<sup>5</sup>; Cecília Saori Mitsugui<sup>6</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>7</sup>; Fabrícia Gimenes<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, PR.

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, PR.

<sup>3</sup>Mestranda do Programa de Biociências e Fisiopatologia PBF, Universidade Estadual de Maringá, PR.

<sup>4</sup>Doutora no Programa de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, PR.

<sup>5</sup>Enfermeira do Hospital Universitário de Maringá, Maringá PR.

<sup>6</sup>Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário de Maringá, Maringá, PR.

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

<sup>8</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

**Introdução:** *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são patógenos que causam infecções de difícil tratamento, principalmente em pacientes imunocomprometidos como, é o caso dos pacientes hospitalizados com COVID-19. O monitoramento da presença desses microrganismos é de grande importância, principalmente nestes pacientes, pois pode influenciar em seu prognóstico. **Objetivo:** Avaliar a incidência de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* em pacientes com COVID-19, internados em um hospital escola no sul do Brasil entre março de 2020 e março de 2022. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo, com dados de laudos de bactérias não fermentadoras retirados do Sistema de Gestão da Assistência de Saúde do Sistema Único de Saúde (GSUS) e do software *Epicenter-BD*<sup>TM</sup>. A identificação bacteriana foi executada pelo equipamento automatizado *BD-Phoenix*<sup>TM</sup>. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa: UEM COPEP 2.093.342–COREA 020/2021-HUM. **Resultados:** Durante o estudo, dados de 440 pacientes internados com COVID-19, 161 apresentaram isolados de bactérias não fermentadoras, totalizando 301 isolados, sendo 184 (61,1%) isolados clínicos e 117 (38,9%) isolados de vigilância (*swab* retal). De modo geral, a prevalência foi de 218 (72,42%) para *A. baumannii* e 83 (27,58%) para *P. aeruginosa*. O aspirado traqueal (47,17%; 142/301) se destacou entre os sítios infecciosos/clínicos, com 71,12% isolados de *A. baumannii* e 28,9% de *P. aeruginosa*. O segundo principal sítio infeccioso foi o sangue com 24 isolados sendo 75% *A. baumannii* e 25% de *P. aeruginosa*. Similarmente, *A. baumannii* também predominou na urina (9/16) e ponta de cateter (2/2). Entre 117 isolados de vigilância 75% eram *A. baumannii* e 25% *P. aeruginosa*. **Conclusão:** A alta incidência de bactérias naturalmente resistentes, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* em infecções e *swabs* de vigilância nos pacientes hospitalizados com COVID-19, alertam para a necessidade de implementação de estratégias para controlar a propagação destes patógenos multirresistentes, especialmente no contexto da COVID-19.

**Palavras-Chave:** *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; covid-19; bactérias resistentes.

**Área temática:** Microbiologia.



## ONICOMICOSE NÃO DERMATOFÍTICA IDENTIFICADA EM PACIENTES ATENDIDOS PELO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA MÉDICA EM UMA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ

Brenda Serenini Perina<sup>1</sup>; Juliana Aparecida Fernandes<sup>2</sup>; Cibele da Silva Lira dos Santos<sup>3</sup>; Isis Regina Grenier Capoci<sup>4</sup>; Erika Seiki Kioshima Cotica<sup>5</sup>; Patricia de Souza Bonfim de Mendonça<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Micologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Centro Universitário Ingá, Maringá/PR

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

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** Nos últimos anos houve um aumento significativo no número de casos de onicomicoses causadas por Fungos Filamentosos Não Dermatofitos (FFND). As principais espécies isoladas em infecções ungueais são pertencentes ao gênero *Fusarium*. Apesar de serem tradicionalmente fungos saprófitas, podem causar infecções oportunistas, inclusive de difícil tratamento. **Objetivo:** Conhecer a casuística das espécies de FFND como agentes etiológicos de onicomicose, isolados de pacientes atendidos pela divisão de Micologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá (UEM). **Material e Métodos:** Foi realizado um estudo descritivo, retrospectivo, transversal e observacional, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEM (nº 2.748.843), no qual foram avaliados os registros de isolados clínicos de pacientes com suspeita de onicomicose, e selecionados os casos de infecção por FFND, entre os anos de 2017 e 2021. **Resultados:** Um total de 34 amostras de unhas apresentaram cultura positiva para FFND, sendo que as espécies de *Fusarium* foram as mais frequentes, totalizando 88% dos isolados clínicos. Em relação às espécies desse gênero, foram relatadas *F. solani* (67%), *F. oxysporum* (15%) e *F. verticillioides* (6%). Outras espécies também foram encontradas, sendo *Acremonium strictum* (3%), *Cladosporium cladosporoides* (3%), *Penicillium piceum* (3%) e *Exophiala dermatitidis* (3%). Em relação ao sexo, 73,53% dos pacientes eram mulheres, enquanto 26,47% homens. Onicomicose nas unhas dos pés foram mais frequentes com taxas acima de 70%. E por fim, a faixa etária mais acometida foram os adultos (19-59) com 69,70% dos casos, seguido dos idosos (60+) 27,27% e crianças e adolescentes (0-18) com 3,03%. **Conclusão:** Os resultados deste estudo mostram concordância com a literatura expondo que os FFND estão presentes nos casos de onicomicose e que o gênero *Fusarium* apresenta uma prevalência significativa nos casos de onicomicose por FFND.

**Palavras-chave:** onicomicose; não dermatofitos; *Fusarium*.

**Área temática:** Microbiologia



## CARACTERIZAÇÃO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL POR *Candida tropicalis* EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NÃO-DIABÉTICOS

Isis Regina Capoci<sup>1</sup>; Ana Julia Aguiar de Freitas<sup>2</sup>; Valéria Mosca<sup>3</sup>; Glaucia Sayuri Arita<sup>3</sup>, Daniella Faria<sup>3</sup>, Karina Mayumi Sakita<sup>3</sup>, Francielle Vilugron<sup>3</sup>, Érika Seki Kioshima Cotica<sup>1</sup>, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

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

**Introdução:** Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma patologia relacionada à saúde da mulher, sendo considerada um importante problema de saúde pública. Nos últimos anos, tem sido considerada a infecção genital mais frequente no Brasil e nos Estados Unidos. A espécie *Candida albicans* é considerada o principal agente fúngico causador da CVV, seguido de *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Dentre os fatores de risco para CVV, destaca-se a diabetes mellitus, a qual favorece o aumento nos níveis de glicogênio do tecido vaginal, além de causar alterações metabólicas favorecendo a CVV. Apesar da literatura mostrar os fatores de risco para CVV, principalmente relacionados à mulher, não se sabe qual o impacto patofisiológico das espécies de *Candida* desafiadas em diferentes hospedeiros. **Objetivo:** Dessa forma, este estudo teve o objetivo apresentar alguns aspectos patofisiológicos da CVV por *C. tropicalis* em modelo experimental com animais diabéticos e não-diabéticos. **Material e métodos:** Foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c com aproximadamente seis semanas de idade, criados em condições livres de patógenos (CEUA nº 3624120717). O estado diabetogênico foi induzido pela administração de Aloxana 60mg/kg em dose única. A CVV foi realizada após a indução de pseudoestruo com 1mg/mL de 17- valerato de  $\beta$ -estradiol e inoculação de *C. tropicalis*  $2 \times 10^7$  UFC/mL. A avaliação da carga fúngica do tecido vaginal foi realizada após 1,3,5,7 e 10 dias. **Resultados:** Os resultados mostraram que o padrão de infecção em animais diabéticos se diferencia de animais não-diabéticos. Após o quinto dia de infecção, a carga fúngica no tecido vaginal de animais não-diabéticos diminuiu consideravelmente em relação aos animais diabéticos, com diferença aproximada de 3 unidades logarítmicas ( $p < 0.05$ , teste *t student*, GraphPad Prism 8.0). **Conclusão:** Nossos resultados mostraram que animais diabéticos são mais susceptíveis a CVV por *C. tropicalis*.

**Palavras-chave:** candidíase vulvovaginal; leveduras; diabetes.

**Área temática:** Microbiologia.



## PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE FORMAS LEVEDURIFORMES DE *Paracoccidioides* spp.

Caroline Franco Domingues da Silva<sup>1</sup>; Isis Regina Grenier Capoci<sup>2</sup>; Érika Seki Kioshima Cotica<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

**Introdução:** A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*, descritas atualmente duas espécies: complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. A PCM é relevante problema de saúde pública, destacando-se como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Cultura, sorologia ou histopatologia tem sido as ferramentas para o diagnóstico da PCM, no entanto, não é capaz de distinguir as espécies deste gênero, que é feita apenas por métodos moleculares. Desta forma, é essencial conhecer as espécies de *Paracoccidioides* que circulam em nossa região, especialmente do ponto de vista epidemiológico. **Objetivo:** Padronização da técnica de extração de DNA do *Paracoccidioides* spp., com foco na futura implementação da metodologia de identificação molecular das diferentes espécies deste gênero. **Material e métodos:** A busca do protocolo de extração foi realizada com revisão de literatura na base de dados do *National Center for Biotechnology Information National* (PubMed; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e nas técnicas já utilizadas em nosso laboratório. Devido as condições favoráveis, o protocolo escolhido e padronizado foi o já utilizado para outras leveduras em nosso laboratório. A técnica de extração foi a que utiliza *fenol: clorofórmio: álcool isoamílico* e a eletroforese em gel de agarose (0,8% em TBE) foi utilizada para avaliar as condições da técnica de extração. A cepa de *Paracoccidioides* (pb01) pertencente a micoteca do Laboratório de Micologia Médica da UEM foi utilizada para avaliação do protocolo. **Resultados:** O protocolo padronizado foi eficiente mostrando DNA de qualidade e com quantidade satisfatória (DNA1 apresentou 792,29 ng – 1,95 A260/280 e o DNA 2 apresentou 729,00 ng – 1,85 A260/280) e sem contaminação de RNA. **Conclusão:** Esta técnica poderá ser utilizada como parte inicial do diagnóstico molecular e diferenciação de espécies de *Paracoccidioides* spp.

**Palavras-chave:** fungos; paracoccidioidomicose; micoses.

**Financiador (es):** Fundação Araucária

**Área temática:** Microbiologia



## AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM HIPERICINA HIDROSSOLÚVEL EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Candida albicans*

Camila Galinari<sup>1</sup>; Maria Naomi Yamanaka<sup>2</sup>; Isis Regina Capoci<sup>3</sup>; Érika Seki Kioshima Cótica<sup>3</sup>,  
Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

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

**Introdução:** Atualmente poucas drogas antifúngicas estão disponíveis na prática clínica, e aqueles existentes possuem efeitos adversos e baixa atividade antifúngica. A Terapia Fotodinâmica (TDF) tem sido promissora nos últimos anos, e associada à Hipericina (HY) tem mostrado efeitos antimicrobianos satisfatórios. Assim, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da HY na TDF em células planctônica e em biofilme de *Candida albicans*. **Material e métodos:** Foi utilizado cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028, na concentração de  $1.0 \times 10^6$  UFC/mL. Na avaliação da TDF+HY em células planctônicas, foram testadas quatro concentrações de HY encapsulada em 0.025% do pluronic P123: 1.5  $\mu$ M, 0.75  $\mu$ M, 0.35  $\mu$ M e 0.18  $\mu$ M, em nove diferentes condições de pré-incubação (PI) com HY e exposição à Luz (L). Na avaliação da TDF+HY em biofilme em formação e formado, foram testadas 5 concentrações de HY sendo essas com o tempo de PI+L estabelecidos a partir da avaliação em células planctônicas, devido ao seu melhor efeito. Após os tratamentos, alíquotas foram plaqueadas em placas de *Sabouraud Dextrose Agar* para a avaliação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), e para a avaliação da biomassa total foi feito o método de coloração de cristal violeta. **Resultados:** Na ausência de luz, a HY não interferiu na viabilidade fúngica, independentemente da concentração ou do tempo de pré-incubação. Na avaliação da HY+TDF em células planctônicas foi possível determinar a concentração fungicida mínima para redução  $\geq 3 \log_{10}$  ( $\geq 99.9\%$ ), sendo essa de 0,75  $\mu$ M. Em biofilme em formação e formado, foi constatado uma redução na biomassa total e viabilidade fúngica. **Conclusão:** Dessa forma, podemos concluir que a HY+TDF possui efeito fungicida *in vitro* sobre *C. albicans*. Sendo estes resultados promissores, caracterizando um bom candidato alternativo para o tratamento de infecções fúngicas.

**Palavras-chave:** inativação fotodinâmica; antifúngico; hipericina.

**Financiador (es):** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - 424262/2018-5.

**Área temática:** Microbiologia



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE COMPOSTO POR MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Maria Luiza Froes da Motta Dacome<sup>1</sup>; Jonathan Sanches Rosa<sup>2</sup>; Andrew Matheus Frederico Rozada<sup>3</sup>; Gisele de Freitas Gauze<sup>4</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>5</sup>; Vera Lúcia Dias Siqueira<sup>5</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>5</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli<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

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Química, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A metodologia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos permite investigar o modo de ação de fármacos sobre as bactérias, a fim de visualizar de forma mais nítida possíveis alterações na morfologia micobacteriana. Derivados oxadiazólicos têm sido testados por nosso grupo de pesquisa e têm apresentado resultados promissores antituberculose. Dentre os compostos, o derivado O-AON (oxadiazol-4-metoxinaftaleno) teve destaque pela concentração inibitória mínima (CIM) obtida para *Mycobacterium tuberculosis* (0,97µg/ml) e baixa toxicidade. **Objetivo:** Investigar a ação do composto O-AON sob a morfologia micobacteriana. **Material e métodos:** Foi utilizado *Mycobacterium smegmatis* no ensaio como modelo por questão de biossegurança. Após serem padronizadas as suspensões bacterianas, elas foram expostas ao composto O-AON nas concentrações de CIM (3,9µg/ml) e 16x a CIM (62,5µg/ml) por 5 dias. Suspensão bacteriana sem tratamento foi utilizada como controle do ensaio. Em seguida, os bacilos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato por pelo menos 2 horas. As bactérias tratadas foram aderidas nas lamínulas com auxílio da poli-L-Lisina. As amostras foram desidratadas com diferentes graduações de etanol e depois submetidas ao ponto crítico. Por fim, as amostras foram coradas com ouro para visualização pelo MEV. Foram fotografados para cada amostra em média 20 campos nas magnificações (10.000x, 15.000x e 20.000x). **Resultados:** As imagens obtidas foram analisadas criteriosamente e não foram observadas alterações significativas na morfologia bacteriana das amostras tratadas com O-AON quando comparadas ao controle. **Conclusão:** O ensaio de MEV sugere que o composto estudado não apresentou ação direta na parede celular de *M. smegmatis*. Embora o modelo utilizado foi *M. smegmatis* supõe-se que os resultados possam ser extrapolados para *M. tuberculosis*. Novos estudos com os derivados oxadiazólicos deverão ser conduzidos a fim de melhor compreender o modo de ação desses compostos promissores em micobactérias.

**Palavras-chave:** tuberculose; fármaco antituberculose; microscopia eletrônica de varredura.

**Financiador (es):** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

**Área temática:** Microbiologia



## A INCIDÊNCIA DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO EM IDOSOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Dayane Nayara Bathke Loch<sup>1,2</sup>; Flávia Franco Veiga<sup>1</sup>; Janisleya Silva Ferreira Neves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Núcleo Diagnóstico

<sup>2</sup>Acadêmico do curso de Biomedicina, Uniasselvi, Maringá/PR.

**Introdução:** As infecções do trato urinário (ITU) são causadas principalmente por bactérias e fungos, acometendo uretra, bexiga ou até mesmo os rins, sendo uma das principais causas das internações hospitalares de idosos. **Objetivo:** Avaliar a incidência de ITU em idosos da Unidade de Terapia Intensiva (UTI). **Material e métodos:** Foram avaliados dados do sistema laboratorial pacientes de um hospital no período de um mês. Foram considerados critérios de inclusão: idade entre 60 e 100 anos, sexo feminino e masculino, ter realizado exames de parcial de urina, bacterioscopia e urocultura e ser alocado para a UTI. Após seleção dos pacientes que condiziam com o perfil necessário, foi verificado no sistema quais pacientes faziam uso da sonda de Foley. Os dados foram catalogados e comparados. **Resultados:** Na pesquisa, foram detectados 32 pacientes com ITU, idades entre 64 e 89 anos, sendo 23 (71,87%) do sexo feminino e 9 do sexo masculino (28,13%). Resultados apontaram que 15,63% dos pacientes apresentaram infecção urinária por leveduras, sendo todos do sexo feminino. Além disso, 18,75% apresentaram infecção urinária por bactérias, presentes em ambos os sexos. *Escherichia coli* foi o microrganismo mais frequentemente isolado, sendo responsável por 42,86% dos casos. Por fim, 57,14% dos resultados positivos para ITU foram de pacientes em uso de sonda Foley. **Conclusão:** 31,25% dos pacientes foram positivos para algum tipo de infecção no trato urinário. Somado a este fato, a grande parte dos idosos internados embora adentrassem ao hospital com diurese espontânea, posteriormente foi necessário uso de sonda Foley. Esse dispositivo permanece na bexiga por período indeterminado, tendo como desvantagem o maior risco de colonização e infecção microbiana. Deste modo deixando subentendido sua correlação com uma maior propensão ao desenvolvimento de um novo quadro clínico ao paciente.

**Palavras-chave:** Cistite; Idosos; UTI.

**Financiador (es):** Laboratório Núcleo Diagnóstico

**Área temática:** Microbiologia





## AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS EM HEMOCULTURAS DE PACIENTES INTERNADOS EM DUAS UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL ENSINO: UTI GERAL E UTI COVID-19

Rafael Renato Brondani Moreira<sup>1</sup>; Heloisa Moreira Dias Pereira<sup>2</sup>; Daniela Dambroso Altafini<sup>3</sup>; Mirian Nicéa Zarpellon<sup>3</sup>; Nathalie Kira Tamura<sup>3</sup>; Ihorrana Wencz Afflen<sup>4</sup>; Sheila Alexandra Belini Nishiyama<sup>5</sup>; Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, MARINGÁ/PR

<sup>3</sup>Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário 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>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, MARINGÁ/PR

**Introdução:** Pacientes críticos atendidos em unidades de terapia intensiva (UTI) como aqueles com COVID-19 podem apresentar infecções bacterianas, agravando seu prognóstico. As infecções de corrente sanguínea (ICS) possuem alto índice de letalidade e assim, conhecer o perfil dos isolados de ICS em cada unidade é de extrema importância. **Objetivo:** Comparar a incidência e perfil de sensibilidade das bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes internados nas UTI Adulto e COVID-19 (UTI-A e UTI-COVID) em um hospital ensino nos anos 2020-2021. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo com dados extraídos do *software EpiCenter™*. As hemoculturas foram realizadas pelo sistema *Bactec-BD™*. Apenas foram incluídas neste estudo amostras positivas nos dois frascos de hemocultura coletados. A identificação e o antibiograma foram realizados no equipamento *Phoenix-BD™*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEM COPEP 2.093.342–COREA 020/2021-HUM. **Resultados:** No período do estudo, 73 pacientes da UTI-COVID e 62 da UTI-A tiveram ICS; sendo detectados 94 e 63 isolados bacterianos nas UTI-COVID e UTI-A, respectivamente. A maioria eram BGN em ambas as UTIs. Os BGN mais prevalentes foram *Klebsiella pneumoniae* (UTI-COVID 19/42 e UTI-A 13/28) e *Acinetobacter baumannii* (UTI-COVID 11/42 e UTI-A 05/28). Entre os CGP também houve uma similaridade de espécies em ambas as UTIs: na UTI-COVID 32,7% eram *Staphylococcus epidermidis*, 28,9% *Staphylococcus haemolyticus* e na UTI-A essas duas espécies tiveram 34,3% cada uma delas. A resistência antimicrobiana observada nos BGN foi alarmante, chegando a 80% para meropenem. Importante diferença foi verificada entre as UTIs quanto à presença das carbapenemases KPC e NDM. Enquanto na UTI-A foram apenas 03 KPC e 02 NDM, na UTI-COVID foram 10 isolados produtores de KPC e 4 de NDM. **Conclusão:** A elevada resistência demonstrada pelos isolados de ambas as UTIs, destaca a importância dos protocolos de controle da disseminação de patógenos hospitalares multirresistentes.

**Palavras-chave:** infecção de corrente sanguínea; unidades de terapia intensiva; resistência antimicrobiana.

**Área temática:** Microbiologia



## ATIVIDADE DE NOVAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Jonathan Sanches Rosa<sup>1</sup>; Maria Luiza Froes da Motta Dacome<sup>2</sup>; Izabella Ventura de Souza<sup>2</sup>; Andrew Matheus Frederico Rozada<sup>3</sup>; Gisele de Freitas Gauze<sup>3</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>4</sup>; Vera Lucia Dias Siqueira<sup>4</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli<sup>4</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico 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>Departamento de 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 emergência de micobactérias resistentes aos fármacos tem trazido grandes dificuldades no tratamento das infecções. A pesquisa de novas substâncias químicas tem sido uma necessidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste sentido, hidrazonas e derivados oxadiazólicos, a N-acilhidrazona (4k) foi obtida a partir de precursores a carbohidrazida, e seu oxadiazol (O-AON) através da reação de ciclização oxidativa. Tem sido explorado por nosso grupo de pesquisa contra micobactérias tuberculosas e não tuberculosas.

**Objetivo:** Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) da hidrazona (4K) e seu oxadiazólico (O-AON) em micobactérias não tuberculosas. **Material e métodos:** A atividade antimicobacteriana do 4K e do O-AON foram avaliados em nove micobactérias não tuberculosas (MNT - crescimento rápido as *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155; *M. smegmatis*; *M. abscessus* ATCC 19977; *M. absc. subs. absc.*; *M. absc. subs. massiliense*; *M. absc. subsp. bolletti* e *M. fortuitum* e crescimento lento as *M. kansasii* e *M. avium subsp. avium*) por meio da metodologia de microdiluição em caldo utilizando resazurina como indicador de crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para determinar a concentração bactericida mínima foi realizado o plaqueamento da suspensão bacteriana na CIM em meio Mueller Hinton Agar (MHA), com a variação de 2 CIM. Ciprofloxacino foi utilizado como fármaco padrão e controle dos ensaios. **Resultados:** De forma geral para as MNTs estudadas, a CIM da substância 4K variou de 62,5 a >250 µg/mL e a CBM de 125 a > 250 µg/mL e a CIM da substância O-AON variou de 3,9 a >250 µg/mL e a CBM de 15,8 a >250 µg/mL. **Conclusão:** O derivado oxadiazólico se mostrou mais ativo do que a hidrazona em micobactérias não tuberculosas.

**Palavras-chave:** Compostos sintéticos; micobactérias não tuberculosas; resistência.

**Área temática:** Microbiologia



## USO DO OZÔNIO PARA DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAIS MÉDICOS E HOSPITALARES

Aline Daniele Casari<sup>1</sup>; Samara Santos Bueno<sup>1</sup>; Taísa Rocha Navasconi Berbert<sup>2</sup>; Mariana Felgueira Pavanelli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Biomedicina, Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR.

<sup>2</sup> Docente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR.

<sup>3</sup> Docente do curso de Medicina, Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR.

**Introdução:** As infecções relacionadas à assistência à saúde contribuem para o aumento das taxas de morbimortalidade, resistência microbiana e custos para o setor. Por conta disso muito se discute pela busca de métodos eficientes de desinfecção de materiais e ambientes hospitalares que não danifiquem tais materiais e nem prejudiquem a saúde do paciente. Dentre esses métodos o ozônio (O<sub>3</sub>) tem se destacado pelo seu rápido efeito microbicida. **Objetivo:** Avaliar o efeito descontaminante do ozônio em diferentes materiais médicos e hospitalares.

**Material e métodos:** Duas unidades de materiais de diferentes composições (inox, plástico e tecido) foram contaminados com uma suspensão de *Escherichia coli* diluída na proporção 1:1000. Cada unidade desses materiais foi exposta, separadamente, a 18.000 mg de O<sub>3</sub> durante 5 e 15 minutos e molho em solução de hipoclorito de sódio pelo mesmo tempo. Após os tempos de molho e O<sub>3</sub>, amostras foram coletadas com swab e semeadas em ágar MacConkey, em triplicata, e incubadas a 37±1°C de 24 a 48 horas. Alíquotas da suspensão bacteriana sem a exposição ao O<sub>3</sub> e ao hipoclorito foram semeadas em triplicata e classificadas como controle positivo (CP). Decorrido o tempo de incubação as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram quantificadas, os resultados expostos em média ± desvio padrão e comparados ao CP.

**Resultados:** O crescimento do CP foi 892 ± 372 UFC. Os dois métodos testados foram 100% eficientes contra *E. coli* no inox e no plástico em ambos os tempos de exposição. Para o tecido, houve 100% de redução com o hipoclorito de sódio e com O<sub>3</sub> redução de 74,3% e 87,25% aos 5 e 15 minutos de exposição, respectivamente. **Conclusão:** O O<sub>3</sub> é um gás com elevado efeito bactericida contra *E. coli* para uso em materiais médicos e hospitalares de inox e plástico.

**Palavras chaves:** contaminação; ozônio; hospital.

**Área temática:** Microbiologia.



## IDADE E OBESIDADE INTERFEREM NA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO MUSCULAR DOS TIPOS I E III EM RATOS EXERCITADOS

Diogo Rodrigues Jimenes<sup>1</sup>; Sara Suelen Carvalho Oliveira<sup>2</sup>; Demis Roger da Silva<sup>3</sup>; Fernanda Cândido<sup>4</sup>; Silvano Piovan<sup>5</sup> Carmem Patrícia Barbosa<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, 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>Doutor em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR

**Introdução:** O colágeno presente na matriz extracelular dos músculos estriados esqueléticos desempenha papel essencial na transmissão da força produzida pelas fibras musculares, principalmente durante o exercício. Os tipos I e III constituem a maioria do colágeno presente no organismo, sendo o tipo I considerado maduro e o tipo III o neocolágeno. Fatores como consumo de dieta hiperlipídica (HFD) e envelhecimento modificam tal proporção. Por exemplo, a HFD relaciona-se à maior produção destas fibras colágenas em diversos tecidos, ao passo que o envelhecimento associa-se ao declínio na geração de força e aumento da rigidez muscular.

**Objetivo:** Este estudo objetivou avaliar o efeito do Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) sobre os colágenos tipos I e III no músculo sóleo em ratos obesos de diferentes idades.

**Material e métodos:** Ratos Wistar machos com 7 e 9 meses, alimentados ou não com HFD ( $n=56$ ), foram submetidos a 8 semanas de HIIT em esteira (45 min, 3 vezes/semana). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados, o músculo sóleo foi removido, processado histologicamente e cortes semi-seriados foram analisados pela técnica de picrossírius em luz polarizada. Vale ressaltar que este estudo foi previamente aprovado pelo CEUA/UEM; parecer nº 5230050620.

**Resultados:** Dados obtidos pelo Anova *three-way* apresentaram maior área ( $\mu\text{m}^2$ ) de colágeno do tipo I nos grupos controles de 7 meses quando comparado aos grupos controles de 9 meses ( $P=0.0005$ ) (fator idade), assim como nos grupos HFD de 9 meses quando comparado aos grupos controles de 9 meses ( $P=0.0001$ ). Adicionalmente, a área ocupada pelo colágeno do tipo III foi maior somente nos grupos treinados controles 7 e 9 em relação aos seus respectivos sedentários ( $P=0.0001$ ). **Conclusão:** O HIIT foi eficaz na produção de colágeno do tipo III. Os fatores idade e obesidade podem interferir na deposição de colágeno do tipo I e na formação do neocolágeno.

**Palavras-chave:** matriz extracelular; dieta hiperlipídica; treinamento intervalado de alta intensidade.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Morfologia



## TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE REDUZ O PESO DO FÍGADO E DA GORDURA RETROPERITONEAL DE RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA

Fernanda Cândido<sup>1</sup>; Diogo Rodrigues Jimenes<sup>2</sup>; Demis Roger da Silva<sup>3</sup>; Sara Suelen Carvalho Oliveira<sup>4</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

<sup>5</sup>Docente do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR

**Introdução:** O excesso de gordura na dieta, além de causar obesidade, pode aumentar o conteúdo lipídico hepático, tornando o fígado gorduroso. Ademais, ocasiona aumento nos depósitos de gordura corporal como, por exemplo, na região retroperitoneal. Estudos utilizando modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD) têm sido realizados para a melhor compreensão de diversos aspectos do sobrepeso. Por outro lado, pesquisas recentes têm demonstrado o quanto a prática de exercícios físicos é capaz de prevenir tais danos. **Objetivo:** Este estudo, previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEM; parecer nº 5230050620), objetivou avaliar o efeito de 8 semanas de Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) em esteira sobre o peso do fígado e da gordura retroperitoneal de ratos Wistar machos. **Material e métodos:** Ratos Wistar machos com 12 meses de idade foram subdivididos em 4 grupos (n=10): GCT (alimentado com ração padrão e treinado com HIIT), GCS (alimentado com ração padrão e sedentário), GT-HFD (alimentado com HFD e treinado) e GS-HFD (alimentado com HFD e sedentário). Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para remoção e pesagem do fígado e da gordura retroperitoneal. **Resultados:** Os dados obtidos pelo ANOVA *two-way* mostraram diferença significativa para o efeito da dieta (grupos GS-HFD e GT-HFD apresentaram maior peso da gordura retroperitoneal em relação aos grupos GCS e GCT;  $p=0,0001$ ) e para o treinamento (redução desta gordura no grupo GT-HFD em relação ao grupo GS-HFD;  $p=0,0001$ ). Adicionalmente, o grupo GT-HFD apresentou menor peso do fígado em relação ao grupo GS-HFD ( $p=0,002$ ). **Conclusão:** A oferta da dieta HFD aumenta o peso da gordura retroperitoneal e o HIIT é eficaz na redução desta gordura assim como na redução do peso do fígado quando os animais são submetidos à essa dieta.

**Palavras-chave:** gordura hepática; exercício; obesidade.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Morfologia



## ANÁLISE SOBRE A INFLUÊNCIA DA SUPEREXPRESSION DE APO-CIII NO RECRUTAMENTO DE MASTÓCITOS EM PRÓSTATA DE CAMUNDONGO.

Myllena Borges Miguel<sup>1</sup>; Mikaelly Kiemi Murai<sup>2</sup>; Jairo Augusto Berti<sup>3</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>4</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** As apolipoproteínas participam do transporte de lipídios (como o colesterol), por isso, quando estão alteradas podem levar à dislipidemia, hipertriglicemia, aterosclerose e problemas reprodutivos. A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino que contribui com 20-40% da produção do semen. Estudos anteriores já demonstraram em outros modelos experimentais que disfunções no metabolismo lipídico podem afetar a morfologia/atividade prostática e predispor a processos inflamatórios, geralmente associados ao recrutamento de mastócitos responsáveis pela liberação de citocinas e outros fatores que interagem com as células vizinhas. **Objetivo:** Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os impactos da superexpressão da Apolipoproteína-CIII em relação ao recrutamento de mastócitos na próstata de camundongos. **Material e métodos:** Aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA/UEM nº6558180517), doze camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram distribuídos em 2 grupos: grupo controle (NT) constituído por 6 animais *Wild type*, e grupo transgênico (T) composto por 6 animais com superexpressão da Apo-CIII humana. Após 24 meses, os animais foram pesados e submetidos a eutanásia (NT24 e T24) e tiveram os complexos urogenitais dissecados, pesados e processados para análise morfológica. A quantificação de mastócitos foi realizada em 3 cortes semi-seriados (5µm) corados em azul de toluidina. **Resultados:** Os resultados obtidos foram analisados pelo teste T-Student, sendo considerados significativos dados onde  $p \leq 0,05$ . Não houve diferença de peso entre os grupos. A análise morfológica qualitativa revelou que o parênquima glandular apresentou ácinos menos dilatados nos animais T24 em relação ao NT24. No estroma glandular prostático dos animais transgênicos foi observado um aumento discreto no número de mastócitos em relação aos animais controle ( $18,56 \pm 4,44$  vs  $17,16 \pm 6,27$ ). **Conclusão:** Portanto, conclui-se que a superexpressão da Apo-CIII não impactou o número de mastócitos estromais na próstata de camundongos.

**Palavras-chave:** próstata; dislipidemia; mastócitos.

**Financiador (es):** PIBIC CNPq - Fundação Araucária - UEM.

**Área temática:** Morfologia.



## A INFECÇÃO CRÔNICA PELO *Toxoplasma gondii* COM/SEM *E. purpurea* REDUZ A PROPORÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS DO TIPO III NA PRÓSTATA ANTERIOR DE RATOS

Giovanna de Carvalho<sup>1</sup>; Julia Calvi Mori<sup>2</sup>; Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>5</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Biomedicina, 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> Docente - Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama/PR

<sup>4</sup> Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup> Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O tratamento indicado para a toxoplasmose é a pirimetamina. Sabe-se que ela induz efeitos colaterais e até resistência de algumas cepas do *T. gondii*, assim, tratamentos alternativos como com a *Echinacea purpurea* estão sendo estudados. Porém, pouco se sabe sobre os impactos de seu uso nos órgãos reprodutores. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do uso de *E. purpurea* na distribuição de fibras colágenas tipo I e III na próstata anterior de ratos infectados com *T. gondii* (cepa RH genótipo I). **Material e métodos:** 16 ratos *Wistar* machos (CEUA/UEM-protocolo:7633021018) foram distribuídos em: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI) que recebeu 500 oocistos esporulados de *T. gondii* via oral; GC e GI tratados com 100mg/kg de *E. purpurea* via oral por 56 dias (GCEP e GIEP respectivamente). Após eutanásia, as próstatas foram dissecadas, pesadas, fixadas e embocadas em parafina. Cortes de 5µm submetidos ao picrossirius-red para avaliação das fibras colágenas por meio de microscopia de luz polarizada. As quantificações foram realizadas com uso do software Image-Pro Plus® e os dados comparados sob a estrutura geral de modelos lineares mistos, sendo considerado significante valores de  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** Não houve diferença no peso glandular entre os grupos. As fibras colágenas do tipo I e III apresentaram-se dispersas no estroma e ao redor dos ácinos/ductos epiteliais. Na análise quantitativa, observou-se redução das fibras colágenas tipo III no GI ( $0,44 \pm 0,15$ ) em relação ao GC ( $1,11 \pm 0,17$ ), sendo que o tratamento com *E. purpurea* amenizou a diferença ( $0,65 \pm 0,13$ ) mas não foi capaz de reverter esta alteração. **Conclusão:** Neste trabalho, a *E. purpurea* não desencadeou alterações prostáticas, porém também não amenizou as alterações de matriz extracelular desencadeadas pela infecção crônica por *T. gondii*.

**Palavras-chave:** tratamento alternativo; toxoplasmose; órgãos reprodutores.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ, PROAP-PBF/UEM

**Área temática:** Morfologia.



## O USO DA *Echinacea purpurea* REDUZ OS IMPACTOS DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* NOS MASTÓCITOS DA PRÓSTATA ANTERIOR DE RATOS

Isadora Pereira Casagrande<sup>1</sup>; Julia Calvi Mori<sup>2</sup>; Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>5</sup>, Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Biotecnologia, 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 - Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR

<sup>4</sup> Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup> Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A toxoplasmose, parasitose causada pelo *Toxoplasma gondii*, pode impactar a fertilidade masculina, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão elucidados. A pirimetamina é a indicação terapêutica na fase aguda da doença, apesar de induzir resistência em algumas cepas, como a RH. Assim, a busca por terapias alternativas e/ou coadjuvantes na terapêutica da toxoplasmose, bem como a caracterização de seus efeitos em órgãos reprodutores têm sido relevantes. A *Echinacea purpurea*, bastante conhecida por suas ações imunomoduladoras e anti-inflamatórias, tem demonstrado resultados promissores em doenças infecciosas. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do fitocomplexo *Echinacea purpurea* na distribuição dos mastócitos na próstata anterior de ratos infectados com *T. gondii* (cepa RH). **Material e métodos:** 16 ratos *Wistar* machos (CEUA/UEM-protocolo:7633021018) foram distribuídos em: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI) que recebeu 500 oocistos esporulados de *T. gondii*, via oral; GC e GI tratados com 100mg/kg de *E. purpurea*, via oral, por 56 dias (GCEP e GIEP, respectivamente). Após eutanásia, as próstatas anteriores foram dissecadas, pesadas, fixadas e emblocadas em parafina. Cortes de 5µm foram corados em azul de toluidina e utilizados para contagem dos mastócitos. Os dados foram comparados sob a estrutura geral de modelos lineares mistos, sendo considerado significante valores de  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** Os mastócitos foram evidenciados no tecido conjuntivo do compartimento estromal de todos os animais. A análise estatística demonstrou um maior número desta população celular no GI ( $38 \pm 2$ ) em relação aos demais grupos (GC,  $31 \pm 2$ ; GCEP,  $32 \pm 2$ ; GIEP,  $32 \pm 2$ ). **Conclusão:** O uso da *E. purpurea* pode amenizar os impactos da infecção pelo *T. gondii* de modo a restaurar o número de mastócitos no estroma prostático de ratos.

**Palavras-chave:** toxoplasmose crônica; infecção; fitocomplexo.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ, PROAP-PBF/UEM

**Área temática:** morfologia





## O USO DE *Equinacea purpurea* E/OU PIRIMETAMINA ALTERAM A PROPORÇÃO DOS COMPARTIMENTOS GLANDULARES DA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS INFECTADOS POR *T. gondii*

Emily Matos dos Santos<sup>1</sup>; Larissa Ayumi Ussuda<sup>2</sup>; Julia Calvi Mori<sup>3</sup>; Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>4</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>5</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>6</sup>, Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup> Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup> Docente - Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR

<sup>5</sup> Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup> Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A próstata contribui com 40% do líquido seminal, portanto, influenciando na fertilidade masculina. Estudos prévios demonstraram que o *Toxoplasma gondii* pode impactar na fertilidade masculina. Sabendo que o principal tratamento para a toxoplasmose é a pirimetamina e que ela tem diversos efeitos colaterais, estudos envolvendo fitocomplexos são propostos como terapêutica coadjuvante. Entretanto, há pouca informação sobre os detalhes dessas abordagens no sistema reprodutor masculino. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da pirimetamina e da *E. purpurea* sobre a próstata de animais portadores do *T. gondii*. **Material e métodos:** 24 ratos Wistar machos (CEUA/UEM-protocolo:7633021018) foram distribuídos em: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI) que recebeu 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH) via oral; GC e GI tratados com 100mg/kg de *E. purpurea* via oral por 56 dias (GCEP e GIEP, respectivamente); GC e GI tratados com pirimetamina 12,5 mg/kg por 28 dias (GCP e GIP respectivamente). Após eutanásia, as próstatas ventrais foram dissecadas, pesadas, fixadas e emblocadas em parafina. Cortes de 5µm foram corados em hematoxilina e eosina para análise pelo método de *Weibel*. Os dados foram comparados pelo teste *Anova Two-way*. **Resultados:** A infecção não impactou na distribuição entre os compartimentos glandulares, entretanto o GIP reduziu a proporção do compartimento epitelial comparado ao GC enquanto o GIEP aumentou o estroma glandular comparado à GC e GCP, por fim, GIP apresentou maior proporção de lúmen que GIEP. **Conclusão:** O tratamento com a pirimetamina reduziu a proporção epitelial e aumentou a luminal, sugerindo uma atrofia de parênquima glandular. Por outro lado, o uso da *E. purpurea* não alterou o parênquima, mas o estroma prostático. Assim, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos.

**Palavras-chave:** compartimentos prostáticos; toxoplasmose crônica; fitocomplexo.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ, PROAP-PBF/UEM

**Área temática:** morfologia



## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO USO DE PIRIMETAMINA E/OU *Equinacea purpurea* EM NEURÔNIOS DA CÁPSULA PROSTÁTICA DE RATOS COM INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii*

Julia Calvi Mori<sup>1</sup>; Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>2</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>3</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>4</sup>, Jaqueline de Carvalho Rinaldi<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> Docente - Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, 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 *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que apresenta tropismo pelo tecido nervoso. Sabendo que o tratamento indicado para a toxoplasmose é a pirimetamina e que estudos prévios do nosso grupo já demonstraram a ação imunomoduladora do fitocomplexo *Equinacea purpurea*. **Objetivo:** Avaliar o efeito da pirimetamina e da *E. purpurea* sobre gânglios do plexo pélvico situados na cápsula prostática de ratos infectados por *T. gondii*. **Material e métodos:** 24 ratos *Wistar* machos (CEUA/UEM-protocolo:7633021018) foram distribuídos em: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI) que recebeu 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH), via oral; GC e GI tratados com 100mg/kg de *E. purpurea* via oral por 56 dias (GCEP e GIEP, respectivamente); GC e GI tratados com 12,5mg/kg de pirimetamina por 28 dias após a infecção (GCP e GIP, respectivamente), via oral. Após eutanásia, as próstatas dorsolaterais foram dissecadas, pesadas, fixadas e emblocadas em parafina. Cortes de 5µm foram corados em hematoxilina e eosina para análise da mensuração do corpo e citoplasma neuronal. Os dados foram comparados sob a estrutura geral de modelos lineares mistos, sendo considerado significativo valores de  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** O plexo pélvico presente na cápsula prostática apresentou-se com aglomerados de corpos celulares neuronais abundantes. Não houve diferença na mensuração do núcleo e do citoplasma destes neurônios entre os grupos. **Conclusão:** A infecção crônica pelo *T. gondii* com ou sem o uso de *E. purpurea* ou pirimetamina não impactaram a morfologia neuronal de gânglios do plexo pélvico situados na cápsula prostática.

**Palavras-chave:** plexo pélvico; toxoplasmose crônica; fitocomplexo.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ, PROAP-PBF/UEM

**Área temática:** morfologia



## A INFECÇÃO AGUDA E CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* IMPACTA DIFERENCIALMENTE NA CONTAGEM TOTAL DE FOLÍCULOS OVARIANOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Vanessa de Brito Pereira<sup>1</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>2</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>2</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<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 Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A toxoplasmose é uma zoonose negligenciada mas, de ampla distribuição. Ela é causada pelo parasito intracelular *Toxoplasma gondii* e pode levar a sequelas em diferentes sistemas orgânicos, inclusive em órgãos reprodutores. **Objetivo:** Investigar a influência no número de folículos ovarianos em camundongos C57BL/6 na fase de estro pela infecção aguda e crônica por *T. Gondii*. **Material e métodos:** Trinta e duas fêmeas foram divididas em dois grupos, sendo eles infectado (GI, n=16), cujos animais receberam 1000 oocistos *T. gondii* da cepa (ME-49) por gavagem e grupo controle (GC, n=16) (que receberam apenas água). Metade dos animais de GI e GC foram submetidos a eutanásia após 5 dias de infecção e a outra metade após 60 dias de infecção para avaliar os impactos da infecção aguda e crônica respectivamente. Os ovários foram coletados, dissecados, pesados, processados e emblocados em parafina. Cortes semiseriados de 5µm foram corados em Hematoxilina-eosina para análise da morfologia geral dos órgãos e quantificação folicular. CEUA/UEM sob nº 4092040517. **Resultados:** Não foi observada alteração no peso dos animais ou dos órgãos. Enquanto a infecção aguda não influenciou o número de folículos, a infecção crônica pelo *T. gondii* levou ao aumento na quantidade de folículos totais no córtex ovariano. **Conclusão:** Este estudo sugere que o tempo de infecção impacta diferencialmente na distribuição folicular no córtex ovariano.

**Palavras-chave:** ovário; toxoplasmose; morfologia.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ, PROAP-PBF

**Área temática:** Morfologia



## O USO DE *Echinacea purpurea* E/OU DE PIRIMETAMINA NA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* REDUZEM O COMPARTIMENTO ESTROMAL DA PRÓSTATA ANTERIOR DE RATOS

Maria Eduarda Gobara de Moura<sup>1</sup>; Julia Calvi Mori<sup>2</sup>; Emerson Luiz Botelho Lourenço<sup>3</sup>; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>4</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>5</sup>; Jaqueline de Carvalho Rinaldi<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> Docente - Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR

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

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

**Introdução:** O *Toxoplasma gondii* é o parasito intracelular causador da toxoplasmose, cujo tratamento mais utilizado é a pirimetamina, apesar de induzir resistência. Devido a isso, o uso de terapêutica coadjuvante, como a *Echinacea purpurea* que possui efeitos imunomoduladores estão sendo desenvolvidos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do uso da pirimetamina e da *E. purpurea* sobre a próstata anterior de ratos infectados com *T. gondii* (cepa RH genótipo I). **Material e métodos:** 24 ratos *Wistar* machos (CEUA/UEM-protocolo:7633021018) foram divididos em seis grupos: Grupo controle (GC); Grupo infectado com 500 oocistos esporulados de *T. gondii* via oral (GI); GC e GI que receberam 100mg/kg de *E. purpurea* via oral por 56 dias (GCEP e GIEP, respectivamente); GC e GI tratados com pirimetamina 12,5 mg/kg por 28 dias (GCP e GIP, respectivamente). Após eutanásia, a próstata foi dissecada, pesada, fixada e emblocada em parafina. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina para análise em grade de Weibel. Os dados foram comparados sob a estrutura geral de modelos lineares mistos. **Resultados:** Não houve alteração de peso corpóreo ou glandular entre os grupos. A aplicação da grade de Weibel evidenciou alterações significativas na proporção entre os compartimentos glandulares de GIP e GIEP quando comparados a GI. **Conclusão:** A pirimetamina e a *E. purpurea* impactaram a morfologia prostática, sugerindo atrofia da próstata anterior. Mais análises são necessárias para compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo.

**Palavras-chave:** fitocomplexo; resistência; compartimentos prostáticos.

**Financiador (es):** CAPES, CNPQ, PROAP-PBF/UEM

**Área temática:** morfologia



## OPTIMIZED PERFUSION PROTOCOL FOR WHOLE-OVARY DECELLULARIZATION: A STRUCTURAL AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida<sup>1</sup>; Leandro Norberto da Silva Junior<sup>2</sup>; Mariana Sversut Gibin<sup>3</sup>; Henrique dos Santos<sup>4</sup>; Bianca de Oliveira Horvath-Pereira<sup>2</sup>, Mauro Luciano Baesso<sup>5</sup>; Francielle Sato<sup>5</sup>; Luzmarina Hernandez<sup>6</sup>, Maria Angelica Miglino<sup>7,8</sup>, Ana Claudia Oliveira Carreira<sup>8,9</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Student (Master's) in Anatomy of Domestic and Wild Animals, University of São Paulo, São Paulo/SP,

<sup>2</sup>Postgraduate Student (Doctorate) in Anatomy of Domestic and Wild Animals, University of São Paulo, São Paulo/SP,

<sup>3</sup>Postgraduate Student (Doctorate) in Physics, State University of Maringá, Maringá/PR,

<sup>4</sup>Postgraduate Student (Master's) in Physics, State University of Maringá, Maringá/PR,

<sup>5</sup>Professor - Department of Physics, State University of Maringá, Maringá/PR,

<sup>6</sup>Professor - Department of Morphological Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR,

<sup>7</sup>Professor - Department of Surgery, University of São Paulo, São Paulo/SP,

<sup>8</sup>Professor – Post graduation Program in Anatomy of Domestic and Wild Animals, University of São Paulo, São Paulo/SP,

<sup>9</sup>Professor – Center of Natural and Human Sciences, Federal University of ABC, São Paulo/SP

**Introduction:** Application of decellularized biological scaffolds as tools for artificial tissues reconstruction has great therapeutic potential in regenerative medicine. The biomimetic ovarian tissue reconstruction has been proposed to reestablish endocrine functions and reproductive potential in patients with ovarian pathologies. Despite many decellularization methods proposed by immersion and agitation technique in decellularizing solutions, there is no established protocol for whole-ovaries by solvent perfusion, which are able to preserve tissue macro and microstructure with higher efficiency. **Aim:** Establish an efficient protocol for porcine ovaries decellularization based on solvent perfusion and ultrasonication to obtain functional whole-ovary scaffolds that can be used in ovarian tissue engineering. **Materials and Methods:** Porcine ovaries (n = 5) were cannulated and perfused with solvents (0.5% SDS and 1% Triton X-100) to produce acellular scaffolds with preserved ECM (CEUA nº 8756210222). The decellularization efficiency were evaluated by DAPI staining and total genomic DNA quantification. Ovarian ECM morphological evaluation was performed by histological analysis using light microscopy (HE, Masson's Trichrome, Picrosirius Red, Alcian Blue and Fucsin-Resorcin staining), and ultrastructural analysis by scanning electron microscopy. ECM physico-chemical composition was evaluated using spectroscopic analyses, via FTIR and Raman spectroscopy. **Results:** The protocol was able to reduce cellular components, decreasing the genomic DNA content in 97% compared to native tissue. Morphological analyses showed that the ECM was preserved. Regarding ultrastructural evaluation, the protocol produced a well-structured three-dimensional scaffold. FTIR analyses revealed that Amide I and Amide II specters showed higher intensity in decellularized samples compared to native tissue. No significant difference were observed in proteoglycan spectrum between the samples. Raman scattering showed no significant differences in Amide I, Amide III, GAGs, elastin and hydroxyproline specters between decellularized and native samples. **Conclusion:** The proposed decellularization protocol produced whole-ovaries scaffolds with the ECM composition highly preserved and with great potential application in tissue engineering.

**Keywords:** decellularization; scaffold; reproductive tissue engineering.

**Financial Support:** National Scientific and Technological Development Council (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)

**Theme Area:** Morphology



## CURCUMINA NANOENCAPSULADA REDUZ O EDEMA DE PATA DE RATOS COM ARTRITE REUMATOIDE

Melissa Cumani Aragão<sup>1</sup>; Karile Cristina da Costa Salomão<sup>2</sup>; Luciana Facco Dalmolin<sup>3</sup>; Janette Betzabeth Villarruel<sup>4</sup>; Roberto Kenji Nakamura Cuman<sup>5</sup>; Renata Fonseca Vianna Lopez<sup>6</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>7</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 Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Pós-Doutorado em Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP

<sup>4</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A artrite reumatoide é uma doença inflamatória que atinge principalmente as articulações, podendo afetar outros órgãos. O metotrexato (MTX) é uma droga antirreumática muito utilizada com eficácia clínica definida, porém apresentam efeitos colaterais. Além disso, muitos compostos naturais estão sendo pesquisados para tratamento alternativo da artrite. Entre esses compostos, a curcumina é uma substância com potencial antioxidante e anti-inflamatório. No entanto esse composto tem uma solubilidade limitada, o que prejudica sua utilização clínica. A curcumina nanoencapsulada pode ser uma forma promissora visando aumentar a solubilidade e biodisponibilidade do ativo. **Objetivo:** Analisar o efeito do uso isolado e da associação da curcumina livre ou nanoencapsulada e metotrexato sobre o edema de pata de ratos artríticos. **Material e métodos:** Foram utilizados 70 ratos machos Holtzman (CEUA n° 2012070222) e divididos em 7 grupos com 10 animais cada: controle (C), artrítico (AIA), artrítico tratado com curcumina livre (AIA+CL), artrítico tratado com curcumina nanoencapsulada (AIA+CN), artrítico tratado com metotrexato (AIA+ MTX), artrítico tratado com curcumina livre e metotrexato (AIA+CL+MTX) e artrítico tratado com curcumina nanoencapsulada e metotrexato (AIA+CN+MTX). Os animais artríticos foram induzidos através da administração intradérmica do adjuvante completo de Freund na pata esquerda traseira. Seguinte a inoculação do adjuvante, o volume da pata traseira esquerda até a articulação tibiotársica foi medido por pletismografia. Após 7 dias da indução da artrite, iniciou o tratamento via oral por *gavagem*. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism v.8. Foram realizadas análises de variância One-Way ANOVA. **Resultados:** Entre todos os grupos artríticos, o volume da pata traseira esquerda dos animais do grupo AIA+CN foi menor ( $p= 0,0355$ ) quando comparados com os do grupo AIA. **Conclusão:** O tratamento com a curcumina nanoencapsulada reduziu o edema de pata de ratos artríticos e sua administração pode ser promissora na terapia da artrite reumatoide.

**Palavras-chave:** inflamação; anti-inflamatório; antioxidante.

**Financiador (es):** CNPq

**Área temática:** Morfologia



## AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO DUODENO DE HAMSTERS INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Sabrina Isabel Obono Martí Avomo<sup>1</sup>; Rafaela Mariana Moraes de Carvalho<sup>2</sup>; Maria Gabriela Lima da Silva<sup>3</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>4</sup>; Thaís Gomes Verzignassi Silveira<sup>5</sup>; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>6</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo<sup>5</sup>; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR.

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LVB) causa principalmente leishmaniose tegumentar, no entanto, foram observadas na literatura diversas alterações em outros órgãos, como o intestino. Nesse órgão, a composição colágena pode ser remodelada durante infecções e resposta inflamatória. **Objetivo:** Avaliar as fibras colágenas do duodeno de hamsters após a infecção por LVB em diferentes tempos de infecção. **Material e métodos:** Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob protocolo nº 7587260416. Utilizadas 32 hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*), agrupadas em quatro grupos (n=8): um grupo controle e três infectados com as cepas MHOM/BR/1975/M2903 (2903), MHOM/BR/2003/2311 (2311) e MHOM/BR/2009/3476 (3476) de LVB. A eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico após 90 e 120 dias de infecção (n=4) e coletado 1 cm do duodeno para histologia. Cortes semi-seriados de 5 µm foram corados pela técnica de Picrosirius red. Foram capturadas 16 imagens (20x) em microscópio de luz polarizada para a mensuração da área ocupada pelas fibras de colágeno tipo I e III e outras 16 imagens sem luz polarizada para as fibras colágenas totais. As imagens foram analisadas utilizando o software Image-Pro Plus® 4.5. A normalidade dos dados foi evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk e a análise de variância entre os grupos foi realizada por ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey (p<0,05). **Resultados:** Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa quando comparados os grupos de 90 ou 120 dias de infecção com os respectivos controles para as fibras colágenas totais, tipos I ou III. **Conclusão:** A infecção crônica por LVB não teve influência sobre a remodelação das fibras colágenas analisadas no duodeno de hamsters.

**Palavras-chave:** leishmaniose; colágeno; intestino delgado.

**Financiador (es):** CNPq e CAPES

**Área temática:** Parasitologia



## POTENCIAL GIARDICIDA DE DERIVADO DA *Camellia sinensis* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS

Liara Izabela Lopes Romera<sup>1</sup>; Giovanna Natallia Fidelis Pereira<sup>2</sup>; Vinícius França Scanavaca<sup>2</sup>; Mariana Guimarães Barbosa de Medeiros<sup>3</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>4</sup>; Cristiane Maria Colli<sup>5</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo<sup>5</sup>; Mônica Lúcia Gomes<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação, Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação, Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>6</sup>Docente, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A giardíase é uma das doenças parasitárias mais comuns, podendo desencadear transtornos no crescimento, desenvolvimento intelectual e cognitivo de crianças. O Metronidazol, droga de primeira escolha, pode ser ineficaz e apresentar efeitos adversos. Estudos relatam ação giardicida de derivado da *Camellia sinensis*, comumente conhecido como chá preto. **Objetivo:** investigar a ação de composto derivado da *C. sinensis* em camundongos infectados com *Giardia duodenalis*. **Material e métodos:** Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá nº1360080620. Quarenta camundongos (*Mus musculus*) suíços machos foram divididos em 8 grupos de 5 animais, sendo: controles positivos (GC+1 e GC+2), controles negativos (GC-1 e GC-2), tratados com 150 mg/kg de chá preto 1x/dia/7dias (GCP1 e GCP2) e tratados com 500 mg/kg de Metronidazol 1x/dia/7dias (GMT1 e GMT2). Com exceção dos controles negativos, os animais receberam por gavagem 10<sup>4</sup> cistos viáveis de *G. duodenalis*. O tratamento foi iniciado no 7º dia pós-infecção, quando a carga parasitária foi quantificada como alta. A infecção e o tratamento foram confirmados pelo método de Faust e pela amplificação do Gene da Glutamato Desidrogenase (GDH) via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram considerados curados os grupos que obtiveram exames parasitológico e molecular negativos. Parâmetros clínicos de ingesta de água, ração e eliminação de excretas foram observados. **Resultados:** Após o fim do tratamento os grupos GCP1, GCP2, GMT1 e GMT2 permaneceram positivos, porém, ambos tiveram redução da carga parasitária de alta para baixa. Os grupos tratados consumiram maior quantidade de ração e água, e eliminaram mais excretas em relação aos grupos não-infectados, e menores quantidades quando comparados aos controles positivos. **Conclusão:** O chá preto, em menor dose, teve efeito semelhante ao metronidazol, indicando seu potencial giardicida sem efeitos adversos aparentes. Novas dosagens devem ser testadas a fim de obter a cura dos animais.

**Palavras-chave:** camundongos; chá-preto; *Giardia duodenalis*.

**Financiador (es):** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – código de financiamento 001)

**Área temática:** Parasitologia





## CITOTOXICIDADE DA HIPERICINA LIVRE E ENCAPSULADA COM F127 PARA MONÓCITOS HUMANOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Larissa Ferreira de Oliveira<sup>1</sup>; Tiffany Suzawa<sup>2</sup>; Ana Carolina Vieira de Oliveira<sup>3</sup>; Paulo Cesar Souza Pereira<sup>4</sup>; Renato Sonchini Gonçalves<sup>5</sup>; Daniele Stefanie Sara Lopes Lera Nonose<sup>6</sup>; Maria Valdrinez Campana Lonardon<sup>7</sup>

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

<sup>2</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Química, Universidade Estadual de Maringá,

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão

<sup>6</sup>Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

<sup>7</sup>Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** As leishmanioses são parasitoses que podem causar lesões viscerais, úlceras cutâneas na pele e/ou mucosas dependendo da espécie do agente etiológico, os protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil a forma tegumentar é endêmica. Estes parasitos são fagocitados por macrófagos teciduais do hospedeiro, onde sobrevivem e se multiplicam. O tratamento desta doença é problemático, com altos níveis de toxicidade e recidivas, tornando imprescindível a busca por terapias alternativas. A terapia fotodinâmica (TFD) utiliza substâncias fotossensibilizadoras, luz e oxigênio atmosférico para destruir o alvo. Essa metodologia já estabelecida em tratamentos dermatológicos, apresenta resultados promissores contra leishmaniose tegumentar. A hipericina (HY) é um fotossensibilizador com efeito leishmanicida que pode ser utilizado de forma livre ou associada a um plurônico como F127 (HYPF127) buscando melhorar a sua distribuição farmacológica. **Objetivo:** considerando o potencial da hipericina, a demanda por tratamentos alternativos e o ciclo de infecção do parasito o objetivo foi avaliar a citotoxicidade de HY e HYPF127 aplicando ou não TFD. **Material e métodos:** culturas de monócitos humanos Thp1 convertidos em macrófagos em placas de cultura foram expostos a concentrações de 100µM a 1,56 µM de HY e de HYPF127 seguidas por irradiação ou não (19,2 mW/cm<sup>2</sup>) por 30 minutos. A viabilidade celular foi revelada por ensaio XTT após uma incubação de 24 horas. **Resultados:** ambos os fotossensibilizadores resultaram em alta citotoxicidade celular em todas as concentrações testadas quando aplicada TFD. No entanto, essa toxicidade foi menor ou nula na ausência de luz. Os valores de CC50 foram superiores a 100 µM na ausência de TFD. Tanto na presença como na ausência de luz a HY apresentou maior inibição celular que a HYP127. **Conclusão:** a hipericina em sua forma livre ou encapsulada por F127, combinada à TFD, apresentou citotoxicidade para macrófagos. Esta característica pode ser vantajosa para o desenvolvimento de formulações tópicas.

**Palavras-chave:** Leishmaniose; terapia fotodinâmica; citotoxicidade.

**Área temática:** Parasitologia



## EVIDÊNCIAS DA RELAÇÃO ENTRE A INFECÇÃO POR PROTOZOÁRIOS E A MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Juliane Camila Crubelati<sup>1</sup>; Maria Angélica Polonio<sup>1</sup>; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo<sup>2</sup>, Andrea Claudia Bekner da Silva Fernandes<sup>2</sup>, Camila Alves Mota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Laboratório de Parasitologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** As protozooses intestinais compreendem um problema de saúde pública, que acomete principalmente populações desfavorecidas socioeconomicamente. A microbiota é um conjunto de microrganismos que contribuem para a manutenção da saúde humana, sendo relativamente estável ao longo do tempo, mas é influenciada por diversos fatores. A homeostase intestinal é afetada por qualquer alteração na composição ou função da microbiota, o que dá origem à disbiose. **Objetivo:** Considerando a gravidade e frequência das enteroparasitoses, e a importância da homeostase intestinal, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática para investigar evidências de como as protozooses intestinais influenciam a microbiota intestinal humana. **Material e métodos:** A pesquisa foi realizada através de métodos sistematizados de busca nas bases de dados Pubmed, Scopus, Web of Science e Embase utilizando descritores pré-definidos. Inicialmente, foram selecionados 31 artigos. Cada artigo foi lido e revisado pelos pesquisadores considerando critérios de inclusão e exclusão, e 25 foram incluídos. As referências também foram checadas para recuperar artigos que não tenham sido incluídos na pesquisa inicial. **Resultados:** A presença de coccídeos e *Giardia duodenalis* está estreitamente relacionada com o aumento do gênero *Prevotella*, um *cluster* de bactérias associado a inflamação intestinal e problemas metabólicos. Ademais, os gêneros *Lactobacillus*, *Malassezia* e *Bifidobacterium* também foram afetados quantitativamente de forma negativa. Outro achado importante foi o surgimento de uma condição eubiótica na infecção por *Entamoeba* ou *Blastocystis*, e uma condição disbiótica na infecção por *G. duodenalis*, que favorece espécies potencialmente nocivas. Além disso, um possível risco para diabetes I e síndrome do intestino irritável foi relatado, já que a disbiose causada pelas protozooses favorecem um ambiente inflamatório e perturba a homeostase, afetando o aparecimento e curso destas doenças. **Conclusão:** As evidências observadas mostraram que, de fato, as protozooses podem alterar a microbiota gastrointestinal, e ainda influenciar o desenvolvimento de algumas doenças.

**Palavras-chave:** Protozoários; Microbiota; Gastrointestinal.

**Área temática:** Parasitologia.



## INFLUÊNCIA DAS INFECÇÕES HELMÍNTICAS NA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA- UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Vinícius França Scanavaca<sup>1</sup>; Giovanna Natallia Fidelis Pereira<sup>1</sup>; Geovanna Castilho de Freitas<sup>1</sup>; Sabrina Isabel Obono Martí Avomo<sup>1</sup>; Andrea Claudia Bekner da Silva Fernandes<sup>2</sup>; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo<sup>2</sup>; Camila Alves Mota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico (a) 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.

**Introdução:** A microbiota intestinal equilibrada apresenta relevante importância para a manutenção da saúde humana. Contudo, infecções parasitárias, assim como características relacionadas ao estilo de vida do indivíduo podem alterar a quantidade e a variedade de microrganismos, condição denominada disbiose. A disbiose desencadeia alterações na microbiota intestinal, promovendo o aumento de bactérias patogênicas sobre as benéficas, ocasionando problemas ao indivíduo. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática sobre a relação entre doenças parasitárias provocadas por helmintos e sua influência na microbiota intestinal humana. **Material e Métodos:** Foi realizado um levantamento de artigos indexados nas bases de dados PubMed, Web of Science, Embase e Scopus, com o objetivo de extrair estudos que abordassem a relação entre a microbiota intestinal e a infecção por helmintos. Obteve-se inicialmente um total de 36 artigos, publicados entre 2013 e 2021. **Resultados:** Após aplicação dos critérios de elegibilidade para o estudo, 22 publicações foram incluídas, com um total de 4.363 pacientes, relatados nos artigos, em uma faixa etária de 0 a 85 anos. Em 64% dos artigos, a helmintíase foi reportada como um fator que modifica as características constitucionais da microbiota intestinal em humanos, promovendo o aumento ou diminuição da diversidade bacteriana, dependendo do agente parasitário, do tempo de duração da infecção e do estado imunológico e nutricional do hospedeiro, bem como o uso de medicações. No entanto, 36% dos artigos relataram não existir influência significativa da infecção helmíntica sobre a microbiota. **Conclusão:** Dessa forma, é válido ressaltar que helmintíases ocasionam mudanças, significativas ou não na microbiota, podendo aumentar ou diminuir a diversidade microbiana. Contudo, alterações na microbiota intestinal não são influenciadas apenas por parasitos, uma vez que duração e recorrência das infecções, dieta, estilo de vida, hereditariedade e geolocalização podem determinar a ocorrência ou não desses efeitos sobre a microbiota do hospedeiro.

**Palavras-chave:** microbiota intestinal; helmintos; disbiose.

**Área temática:** Parasitologia.



## EFEITOS DA IMUNOESTIMULAÇÃO COM *Echinacea purpurea* E DA INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO DE RATOS WISTAR

Henrique Cazanti Sona<sup>1</sup>; Maria José Pastre<sup>2</sup>; Claudia Nara de Almeida Lino Bratti<sup>3</sup>; Lainy Leiny de Lima<sup>4</sup>; Aline Rosa Trevisan<sup>5</sup>; Mariana Buranelo<sup>6</sup>; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana<sup>7</sup>

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

<sup>4</sup>Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Mestre em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A infecção por *Toxoplasma gondii*, acarreta em uma inflamação intestinal, desencadeando a liberação de citocinas e mediadores que atraem leucócitos para área lesada. O acúmulo de neutrófilos e monócitos leva ao aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que auxilia na fagocitose e produção de oxidantes celulares. A *Echinacea purpurea* (EP) é uma planta com princípios imunomodulatórios e anti-inflamatórios, e o seu uso pode auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos contra patógenos intestinais. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da infecção crônica de *T. gondii* e a imunostimulação com *Echinacea purpurea* sobre a atividade da enzima MPO no jejuno de ratos Wistar. **Material e métodos:** Aprovado pela CEAU/JEM (nº7633021018). Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, distribuídos aleatoriamente seis animais em cada grupo, sendo Grupo controle (GC), Grupo infectado e não imunostimulado (GI-NT), Grupo não infectado e imunostimulado (GC-EP) e Grupo infectado e imunostimulado (GI-EP). Os grupos GC-EP e GI-EP receberam 100 mg/kg de suspensão de EP, por gavagem, 28 dias antes e depois da infecção, já os grupos GI e GC receberam apenas água fervida. Os grupos GI-NT e GI-EP receberam 500 oocistos esporulados da cepa RH de *T. gondii*. Findado o experimento, os animais sofreram eutanásia, coletado o jejuno e armazenado à -80°C. Posteriormente foram processados e verificado a atividade da enzima MPO em 450 nm em leitor de microplaca. Os dados foram demonstrados em média  $\pm$  desvio padrão e a comparação realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido por Tukey. Considerando significativo ( $p > 0,05$ ). **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), GC ( $0,10 \pm 0,01$ ), GI-NT ( $0,11 \pm 0,01$ ), GC-EP ( $0,10 \pm 0,01$ ) e GI-EP ( $0,12 \pm 0,03$ ). **Conclusão:** A imunostimulação com *E. purpurea* e a infecção não causaram alterações na atividade da MPO.

**Palavras-chave:** intestino delgado, toxoplasmose, tratamento

**Financiador (es):** Capes

**Área temática:** Parasitologia



## EFEITO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS DO JOELHO DE RATOS OBESOS

Demis Roger da Silva<sup>1</sup>; Diogo Rodrigues Jimenes<sup>2</sup>; Sara Suelen Carvalho Oliveira<sup>3</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>4</sup>; Fernanda Cândido<sup>5</sup>; Silvano Piovan<sup>6</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Doutor em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Docente do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR

**Introdução:** As articulações podem sofrer alterações morfofuncionais em decorrência de fatores como envelhecimento, obesidade e prática de exercícios físicos. São comuns a rigidez articular, perda de água e colágeno, e até o surgimento de um processo inflamatório desencadeado pelo sobrepeso. Exercícios físicos, têm se destacado tanto na prevenção quanto no tratamento da obesidade, pois induzem aumento do gasto energético e diminuição da sobrecarga articular. Todavia, embora possam ser realizados em qualquer idade e mesmo em condições de aumento de peso, sua intensidade pode contribuir negativamente à saúde articular. Dentre os diversos tipos de exercícios, o Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (*HIIT*) tem sido indicado para melhorar o condicionamento físico e a composição corporal. **Objetivo:** Este estudo, objetivou avaliar o efeito do HIIT sobre a quantificação de leucócitos totais (LT) do joelho de ratos obesos de diferentes idades. **Métodos:** Ratos Wistar machos de 7, 9 e 12 meses, alimentados ou não com dieta hiperlipídica (HFD), sedentários e treinados, foram submetidos a 8 semanas de HIIT em esteira (45 min, 3 vezes/semana). Após o período experimental, foram eutanasiados e os lavados articulares foram analisados na objetiva de 40x para a contagem dos LT em câmara de Neubauer. Vale ressaltar que este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/UEM nº 5230050620. **Resultados:** O ANOVA *three-way* mostrou que a obesidade foi o principal fator de aumento de LT/mm<sup>3</sup> ( $p=0,0001$ ), seguido da idade ( $p=0,0212$ ). Ademais, nos animais de 12 meses alimentados com HFD foi observado aumento no número de LT no grupo treinado ( $307.143 \pm 120.515$ ) em relação ao grupo sedentário ( $150 \pm 44.121$ ). **Conclusão:** Conclui-se assim que tanto a idade quanto a obesidade representam fatores causadores de aumento de LT na cavidade articular do joelho e que a prática do HIIT pode aumentar ainda mais esse parâmetro em animais mais velhos.

**Palavras-chave:** exercício; leucócitos totais; idade.

**Financiador (es):** Capes

**Área temática:** Patologia



## NÍVEIS DE INTERLEUCINA-17 E INTERLEUCINA-10 EM RATOS OBESOS DE DIFERENTES IDADES SUBMETIDOS AO TREINAMENTO

Ailton Fernandes Júnior<sup>1</sup>; Diogo Rodrigues Jimenes<sup>2</sup>; Demis Roger da Silva<sup>3</sup>; Sara Suelen Carvalho Oliveira<sup>4</sup>; Joana Maria Valentini Zacarias<sup>5</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>5</sup>Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>6</sup>Docente do Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo devido à ingestão excessiva de alimentos associada à diminuição do gasto energético. Estudos demonstram que esta condição está altamente relacionada a um quadro de inflamação sistêmica, gerando aumento nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, concomitante à redução no nível de citocinas anti-inflamatórias. Evidências destacam que a prática regular de exercício físico é eficaz na inversão deste quadro. Dentre os diversos tipos de exercícios, o Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) tem sido bastante estudado, pois melhora o condicionamento e a composição corporal. Todavia, sua influência sobre a dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias ainda não é conclusiva. **Objetivo:** Este estudo, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEM; parecer nº 5230050620), objetivou avaliar o efeito de 8 semanas HIIT sobre os níveis séricos de IL-17 e IL-10 em ratos obesos de diferentes idades. **Material e métodos:** Ratos Wistar machos com 7 e 9 meses de idade foram subdivididos em 4 grupos (n=7): GCT (ração padrão e treinado), GCS (ração padrão e sedentário), GT-HFD (dieta HFD e treinado) e GS-HFD (dieta HFD e sedentário). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado e o plasma analisados pelo modelo ELISA. **Resultados:** Dados obtidos pelo Anova *three-way* mostraram interação significativa para o efeito do HIIT na redução de IL17 nos grupos GCT de 7 e 9 em relação aos grupos GCS (P=0.0167 e P=0.0042, respectivamente), e do grupo GT-HFD em relação ao grupo GS-HFD nas mesmas idades (P=0.0149 e P=0.0002, respectivamente). Houve aumento da IL-10 nos grupos GCT de 7 e 9 em relação ao grupo GCS nas mesmas idades (P=0.0022 e P=0.0001, respectivamente), e no grupo GT-HFD 9 em relação ao GS-HFD 9 (P=0.0001). **Conclusão:** O HIIT reduziu a IL-17 e aumentou a IL-10, independentemente da dieta.

**Palavras-chave:** citocinas; exercício físico; inflamação.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Patologia



## QUANTIFICAÇÃO DE HIPERPLASIAS E DISPLASIAS NO CÓLON DE ROEDORES INDUZIDOS COM 1,2-DIMETILHIDRAZINA E TRATADOS COM PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA E ARTEPILLIN C

Brenda Barroso Pelegrini<sup>1</sup>; Amanda Alexandrino Becker<sup>2</sup>; César Agostinho Ferreira<sup>3</sup>; Gregório Rossetto Machado<sup>3</sup>; Sabrina Roledo Mazarin<sup>3</sup>; Tânia Cristina Alexandrino Becker<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 Medicina, Unicesumar, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmicos de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A Própolis Marrom Brasileira (PMB) e seu principal constituinte, o Artepillin C (ARC), possuem ação antioxidante, uma propriedade capaz de reduzir o risco para o câncer colorretal (CCR). Modelos experimentais de indução do CCR com 1,2-DIMETILHIDRAZINA (DMH) em roedores apresentam semelhanças aos de ocorrência natural em humanos. **Objetivo:** Induzir a formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes) na região colorretal para avaliar a possível atividade quimiopreventiva da PMB, ARC e FRE (Fração Enriquecida com ARC). **Material e Métodos:** Dez grupos de ratos *Wistar* (CEUA nº 3301180520) foram tratados por gavagem, com extrato alcoólico de PMB, FRE e ARC por 15 semanas, conforme segue: CNDMH: controle do veículo de diluição do DMH (n=06); CNG: controle do veículo da gavagem (n=06); IDMH: controle da indução com DMH (n=06); IPMB: DMH e PMB (n=06); IFRE: DMH e FRE (n=06); PPMB: grupo profilaxia, tratamento prévio com PMB e indução com DMH na 6ª semana, (n=06); IARC: DMH e ARC (n=02); CPMB, CFRE e CARC: grupos controles do tratamento com PMB (n=06), FRE (n=03) e ARC (n=02), respectivamente. Os cólons dos animais foram incluídos em parafina e lâminas histológicas foram confeccionadas, coradas com hematoxilina e eosina (HE), e analisadas sob objetiva de 40x do microscópio de luz para identificação de displasias. **Resultados:** Os grupos IPMB, IFRE, PPMB e IARC, em ambas as porções do cólon (proximal e distal), apresentaram menores quantidades de focos displásicos em relação ao grupo IDMH, porém sem diferença estatística. **Conclusão:** Observamos uma redução na quantidade de focos de criptas aberrantes com caráter displásicos nos grupos induzidos e tratados, em relação ao grupo sem tratamento (apenas indução), sugerindo uma possível atividade quimiopreventiva da PMB e/ou ARC, visto que houve um controle na proliferação de criptas aberrantes nos focos, mesmo que, estatisticamente, os valores não foram significativos.

**Palavras-chave:** focos de criptas aberrantes displásicos; porção colorretal do intestino; fitoterapia.

**Financiador:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Área temática:** Patologia.



## EFEITO DO METOTREXATO, DA CURCUMINA LIVRE E NANOENCAPSULADA NA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS DO JOELHO DE RATOS ARTRÍTICOS

João Marcelo de Souza Baptista<sup>1</sup>; Karile Cristina da Costa Salomão<sup>2</sup>; Melissa Cumani Aragão<sup>3</sup>; Luciana Facco Dalmolin<sup>4</sup>; Janette Betzabeth Villarruel Muñoz<sup>5</sup>; Diogo Rodrigues Jimenes<sup>6</sup>; Amanda Gubert Alves dos Santos<sup>7</sup>; Renata Fonseca Vianna Lopez<sup>8</sup>; Nilza Cristina Buttow<sup>9</sup>; Carmem Patrícia Barbosa<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP

<sup>5</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP

<sup>6</sup>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>7</sup>Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>8</sup>Docente da Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP

<sup>9,10</sup>Docentes do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) - Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR

**Introdução:** Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que afeta as articulações, aumentando células imunológicas nas cavidades articulares. A artrite induzida por adjuvante completo de Freund (AIA) simula os efeitos da AR em modelos animais sendo útil para estudos da resposta inflamatória. A AIA é induzida pelo adjuvante contendo 5% de *Mycobacterium tuberculosis* inativadas pelo calor. O metotrexato (MTX) e a curcumina (C) têm sido opções de tratamento para estas doenças. No entanto, a C pode ter seu potencial terapêutico prejudicado por sua rápida degradação, de modo que seu encapsulamento em nanopartículas pode representar um método vantajoso. **Objetivo:** Este estudo, previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEM; nº 2012070222), objetivou avaliar os efeitos do uso isolado e associado do MTX e da C em suas formas livres (CL) e nanoencapsulada (CN) na contagem de leucócitos totais (LT) em joelhos de ratos artríticos. **Métodos:** Foram utilizados ratos *Holtzman* com 50 dias de idade e divididos em 7 grupos (n=7): controle (C), artrítico (AIA), artrítico tratado com curcumina livre (AIA+CL); artrítico tratado com nanopartículas de C (AIA+CN); artrítico tratado com MTX (AIA+MTX); artrítico tratado com CL e MTX (AIA+CL+MTX); artrítico tratado com CN e MTX (AIA+CN+MTX). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e os lavados articulares foram analisados em câmara Neubauer. **Resultados:** A AIA foi capaz de aumentar o número de LT/mm<sup>3</sup> (7020±1307) quando comparado ao grupo controle (760±148.7) (p<0.0001). Os tratamentos foram capazes de reduzir os LT nos grupos AIA+CL (5261±845.9), AIA+MTX (1600±692.8), AIA+MTX+CL (1889±669.3), AIA+CN (3133±780.8) e AIA+CN+MTX (1550±473.3) (p<0.0001). **Conclusão:** Todos os tratamentos foram capazes de reduzir os LT, sendo esta redução mais pronunciada nos grupos tratados com MTX e suas associações com a C. Vale destacar que a CN reduziu os LT tanto quanto os tratamentos associados ao MTX.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide; *Mycobacterium tuberculosis*; inflamação.

**Financiador (es):** CAPES

**Área temática:** Patologia





## EFICÁCIA DE DOIS ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA NA PREDIÇÃO DO ABANDONO DO TABACO EM PACIENTES ATENDIDOS POR UM CENTRO DE TRATAMENTO AOS FUMANTES NO BRASIL

Miyoko Massago<sup>1</sup>, Mamoru Massago<sup>2</sup>, Samile Bonfim de Oliveira<sup>3</sup>, Idalina Diair Regla Carolino<sup>4</sup>, Aline Cardoso Machado Moliterno<sup>5</sup>, João Marcelo de Souza Baptista<sup>6</sup>, Celso Ivam Conegero<sup>7</sup>, Luciano de Andrade<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup>Mestre em Ciências da Computação, 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 Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>5</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>6</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>7</sup>Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, 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 predição utilizando os modelos computacionais como o aprendizado de máquina (AM) é fundamental para aumentar a eficácia dos serviços de saúde e destinação correta dos recursos financeiros. **Objetivo:** Avaliar a eficácia dos algoritmos de aprendizado de máquina (AM) na predição do abandono do tabaco em pacientes atendidos por um centro de tratamento aos fumantes em um município no sul do Brasil entre 2006 e 2017. **Material e Métodos:** Conforme aprovado no parecer nº 468.857/2021 do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá, foram utilizados dados sobre o perfil do tabagismo (tempo de consumo em anos, nível de dependência à nicotina, escala de contemplação e número de recaídas) para o desenvolvimento dos seguintes algoritmos de AM: árvore de decisão e Vetor de Suporte de Máquina. Os dados foram divididos na proporção 70/30 (treino/teste) para o cálculo da razão de erro, sensibilidade, especificidade, valor preditivo de positividade (VPP) e área sob a curva característica de operação do receptor (ASCROC). **Resultados:** Para a árvore de decisão obteve-se uma razão de erro de 30,0%, sensibilidade de 83,2%, especificidade de 52,4%, VPP de 70,0% e ASCROC de 71%, enquanto que para o Vetor de Suporte de Máquina, a razão de erro foi de 20,3%, sensibilidade de 79,3%, especificidade de 80,6%, VPP de 88,8% e ASCROC de 77,7%. **Conclusão:** Embora os dois algoritmos analisados nesta pesquisa tenham apresentado um grande potencial para a predição do abandono do tabaco, o Vetor de Suporte de Máquina ao apresentar o menor valor de razão de erro e maiores valores de VPP e ASCROC, mostrou ser mais eficaz na predição da eficácia terapêutica em fumantes.

**Palavras-chave:** aprendizado de máquina; sucesso terapêutico; tabagistas.

**Financiador:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**Área temática:** Saúde Coletiva



## AVALIAÇÃO DA CONCILIAÇÃO MEDICAMENTOSA NO PRONTO ATENDIMENTO EM UM HOSPITAL ESCOLA

Regivaldo Florentino Rodrigues<sup>1</sup>; Mariana Evely Zambon Abrantes<sup>1</sup>; Fabianne Martins Ribeiro<sup>1</sup>; Lucas de Alcântara Sica de Toledo<sup>2</sup>; Hélen Cássia Rosseto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico (a) de Pós-Graduação (Residência) em Residência Integrada Multiprofissional em Saúde na Atenção à Urgência e Emergência, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup>Docente – Centro Universitário Integrado, Campo Mourão/PR

<sup>3</sup>Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** A conciliação medicamentosa (CM) consiste na revisão das medicações de uso contínuo do paciente seguido da comparação com a prescrição hospitalar, análise das discrepâncias medicamentosas e a intervenção farmacêutica visando minimizar erros de medicação. **Objetivo:** Realizar o processo de CM na admissão hospitalar de pacientes e avaliar as discrepâncias medicamentosas. **Material e métodos:** Estudo observacional descritivo no pronto atendimento (PA) do Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM), aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - COPEP (35194320.5.0000.0104). Foi realizada busca ativa nos prontuários, revisão das prescrições e aplicação de um formulário aos pacientes internados no período de 16/10/2020 a 25/11/2020. Os participantes foram entrevistados e os dados entre os medicamentos utilizados descritos nos formulários e os prescritos no PA-HUM foram comparados. As discrepâncias foram caracterizadas como intencionais (DI) e não intencionais (DNI). **Resultados:** Foram selecionados 50 pacientes para o estudo: 72% (n=36) do sexo feminino e 28% (n=14) masculino, com idade entre 60-79 anos em 44% (n=22) dos participantes. 12% (n=6) relataram alergia a medicamentos, 38% apresentaram pelo menos duas comorbidades, com prevalência de hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus. A polifarmácia foi observada em 48% (n=24) dos participantes, com ênfase para os medicamentos anti-hipertensivos, 68% (n=34). Discrepâncias foram encontradas em 80% (n=40) dos pacientes, totalizando 105 discrepâncias, sendo 45,71% (n=48) DI e 54,28% (n=57) DNI. Das DI a maioria, 70,83% (n=34), foram por troca ou adição de medicamento, já nas DNI as omissões de medicamentos (75%) foram as mais comuns. A CM possibilitou a prática de intervenções, como iniciar imediatamente o medicamento (75,44%). Das intervenções, 100% foram aceitas. **Conclusão:** Verifica-se a importância da CM visto que uma alta taxa de discrepância foi encontrada, assim, a intervenção farmacêutica e o trabalho multidisciplinar são ferramentas importantes para evitar que erros de medicação atinjam os pacientes.

**Palavras-chave:** erros de medicação; atenção à saúde; tratamento farmacológico.

**Financiador (es):** Programa de Residência Integrada Multiprofissional em Saúde na Atenção à Urgência e Emergência, Universidade Estadual de Maringá.

**Área temática:** Saúde Coletiva



## ANÁLISE CITOGENÉTICA DE VITICULTORES EXPOSTOS AOS FUNGICIDAS ETILENO-BISDITIOCARBAMATOS

Matheus Catanio Silva<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Carlos Roberto Bueno Junior<sup>3</sup>; Jéssica Cristina Zoratto Romoli<sup>4</sup>; Miguel Machinski Junior<sup>5</sup>; Edilson Nobuyoshi Kaneshima<sup>6</sup>; Alice Maria de Souza Kaneshima<sup>5</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Graduado em Bioquímica, 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>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>4</sup>Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>5</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>6</sup>Docente – Departamento do Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

**Introdução:** Etileno-bisditiocarbamatos (EBDC) são muito utilizados como praguicidas na agricultura brasileira. Estudos relatam que estas substâncias podem estar associadas a citotoxicidade e genotoxicidade. **Objetivo:** Realizar análise citogenética de viticultores que são expostos aos EBDC. **Material e métodos:** O estudo foi realizado com 2 viticultores da região de Marialva-PR envolvidos com a cultura em modelo familiar. A amostra foi coletada do epitélio jugal direito e esquerdo, com o auxílio de uma escova citológica, acondicionada em tubos cônicos contendo 5 mL de solução de NaCl 0,9%, e encaminhadas sob refrigeração para processamento. Para determinar a exposição aos EBDC, foi realizada a quantificação de etilenotiouréia (ETU) em urina, pelo método DPX/CG-EM. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá sob parecer nº4.254.657. **Resultados:** Ambos relataram exposição recente ao fungicida da classe dos EBDC e trabalham há muitos anos na viticultura. Para o paciente E.B. o valor de ETU na urina foi de 5,06µg/g de creatinina. As alterações citogenéticas encontradas na análise de 2.000 células bucais, foram: células binucleadas (n=20), broto nuclear (n=2) e micronúcleo (n=3). Foram observadas células em processo de morte celular: cariólise (n=28), cariorrex (n=18) e picnose (n=11). Já para o paciente O.M, o valor de ETU na urina foi de 0,78µg/g de creatinina e as alterações celulares encontradas foram: células binucleadas (n=26), broto nuclear (n=3), micronúcleo (n=2), cariólise (n=66), cariorrex (n=89) e picnose (n=4). **Conclusão:** Os viticultores, expostos aos EBDC por muitos anos, apresentam presença de ETU na urina e alterações indicativas de genotoxicidade. Futuramente, pretende-se comparar estes resultados com análise feita com população não exposta aos agrotóxicos.

**Palavras-chave:** genotoxicidade; etileno-bisditiocarbamatos; exposição ocupacional.

**Financiador (es):** CNPq e Fundação Araucária

**Área temática:** Toxicologia



## INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS NO BRASIL: PERÍODO ANTERIOR E DURANTE A PANDEMIA DE CORONAVÍRUS

Deborah Thais Palma Scanferla<sup>1</sup>, Nicole Santos Baccule<sup>2</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<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 Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>3</sup> Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O elevado número de intoxicações medicamentosas atendidas pelo SUS contribuiu para sobrecarga do sistema. Medidas restritivas de circulação durante a pandemia de coronavírus, alteraram a dinâmica social, impactando a saúde mental. Compreender o perfil dos casos notificados antes e durante a pandemia pode auxiliar no planejamento de estratégias preventivas. **Objetivo:** Analisar dados epidemiológicos das intoxicações medicamentosas notificadas no SINAN, período anterior e durante a pandemia de coronavírus. **Material e métodos:** Estudo exploratório, descritivo e retrospectivo com análise de dados secundários, obtidos do SINAN, disponível no Site do DATASUS, referente ao período anterior e durante a pandemia do coronavírus (2018-2019 e 2020-2021). Microsoft Excel foi usado para análise estatística. **Resultados:** Foram registradas 339.864 intoxicações por medicamentos no período analisado, 53,0% nos anos 2018 e 2019. As variáveis circunstância “tentativa de suicídio” (TS) e sexo feminino foram semelhantes nos períodos analisados, com média de ocorrência de 70,5% e 73,4%, respectivamente. A faixa etária com elevação dos registros, primeiro e segundo período, correspondeu a 20-39 anos, 42,1% e 44,0%, respectivamente. Quanto à escolaridade os dados foram semelhantes em ambos os períodos; ensino médio completo 15,8% (2018-2019) e 17,3% (2020-2021), sendo frequente casos ignorados 36,2% e 38,6%, respectivamente. Nos dois períodos, uma porcentagem baixa de casos passou por diagnóstico clínico-laboratorial, 3,2% e 3,9%, respectivamente. A exposição aguda-única foi a mais registrada nos dois períodos, 66,6% e 63,4%. A maior parte das notificações vieram da região Sudeste (45,0%) e Sul (22,5%). O número de óbitos foi de 894 em 2018-2019 e de 817 no período de 2020-2021. **Conclusão:** A pandemia não modificou significativamente o perfil das notificações de intoxicações medicamentosas. O gênero feminino adulto, em conjunto com a circunstância TS é predominante, sendo preocupante o número de óbitos. São necessárias ações preventivas direcionadas a esse público, especialmente em casos diretamente relacionados à distúrbios psicológicos.

**Palavras-chave:** medicamentos; intoxicação; pandemia coronavírus.

**Financiador (es):** CAPES, CNPq.

**Área temática:** Toxicologia.



## AGROTÓXICOS E EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA UTILIZADOS POR TRABALHADORES RURAIS DO MUNICÍPIO DE MARIALVA/PR

Beatris Truzzi Silva<sup>1</sup>; Aline Amenencia de Souza<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Nadya Garcia de Oliveira<sup>3</sup>, Raul Gomes Aguera<sup>2</sup>, Clayton Mendonça Ferreira<sup>3</sup>, Juliana Cristina Castro<sup>4</sup>, Samuel Botião Nerilo<sup>4</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador, Bolsista graduado, Laboratório de Toxicologia, 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>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** Nas últimas décadas o uso de agrotóxicos tornou-se essencial para as atividades agrícolas em países em desenvolvimento, reduzindo perdas, aumentando produtividade e protegendo plantações contra pragas e doenças. Sabendo do elevado potencial de intoxicação apresentado pelos agrotóxicos, a utilização dos Equipamentos de Proteção Individual-EPI, visa reduzir a exposição ocupacional a estes agentes químicos. Os equipamentos considerados básicos são máscara, luvas, botas, macacão e viseira. No entanto a subutilização e a utilização incorreta destes podem levar a um aumento no risco de intoxicação. **Objetivo:** Avaliar o percentual de uso de determinados agrotóxicos e a aderência ao uso de EPI em trabalhadores rurais do município de Marialva/PR. **Material:** Estudo descritivo transversal, com aplicação de um questionário estruturado, e análise por estatística descritiva simples. **Resultados:** Entre os agrotóxicos mais utilizados o Curzate<sup>®</sup> foi o mais citado pelos produtores, representando 14,1% do uso, seguido de Roundup<sup>®</sup>(13,1%), Dithane<sup>®</sup>(12,1%), Dormex<sup>®</sup>(8,08%), Engeo Pleno<sup>®</sup>(8,08%) e Glifosato<sup>®</sup>(8,08%), estas substâncias possuem classificação toxicológica 5, 5, 3, 4 e 5 respectivamente. Dos 67 agricultores participantes, apenas 10,4% fazem uso dos cinco EPI básicos, 23,9% não fazem uso de nenhum, enquanto 13,4% usam apenas um tipo de EPI. A luva é o equipamento de proteção de maior aderência, sendo usada por 61,2% dos agricultores, seguida da máscara, com 59,7%. A viseira é o equipamento de proteção com menor adesão, usada apenas por 19,4% dos entrevistados, enquanto 37,31% usam macacão e 34,32% usam botas. **Conclusão:** É evidente a baixa adesão ao uso de EPI, o que pode contribuir para um aumento no risco de intoxicação destes trabalhadores, reforçando a necessidade de ações informativas/conscientizadoras e a efetividade de políticas de controle e fiscalização do uso de EPI e agrotóxicos por estas populações.

**Palavras-chave:** agrotóxicos; EPI; intoxicação.

**Financiador (es):** Fundação Araucária, CAPES e CNPq

**Área temática:** Toxicologia.



## INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICO AGRÍCOLA RELACIONADO A TENTATIVA DE SUICÍDIO NO BRASIL EM 2021

Aline Amenencia de Souza<sup>1</sup>; Beatris Truzzi Silva<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Nadya Garcia de Oliveira<sup>3</sup>, Raul Gomes Aguera<sup>2</sup>, Clayton Mendonça Ferreira<sup>3</sup>, Juliana Cristina Castro<sup>4</sup>, Samuel Botião Nerilo<sup>4</sup>, Miguel Machinski Junior<sup>4</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4,5</sup>.

<sup>1</sup>Pesquisador, Bolsista graduando, Laboratório de Toxicologia, 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>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** As intoxicações por agrotóxicos têm se tornado um dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento seja ela acidental ou intencional. Em 2020, 38,3% das intoxicações por agrotóxicos agrícolas notificadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram por tentativas de suicídio (TS). Estudos relacionam que a exposição aos agrotóxicos provoca alterações hormonais, sendo capaz de desencadear desequilíbrio e transtornos mentais. As intoxicações exógenas estão entre as três formas mais relacionadas em TS.

**Objetivo:** Analisar o risco de TS por ingestão/contato com agrotóxicos agrícolas no Brasil, por faixa etária, no ano de 2021. **Materiais e métodos:** Estudo epidemiológico, ecológico, referente as intoxicações por agrotóxico agrícola no Brasil por faixa etária, no ano de 2021. Os dados foram extraídos do SINAN disponível no site DATASUS, considerando a circunstância TS. Calculamos a razão de chances (OR) utilizando o software OpenEpi®, atendendo ao intervalo de confiança (nível de 95%) e nível de significância com valor de  $p < 0,05$ . O grupo considerado como não exposto, foi o de 0-9 anos. **Resultados:** Foram notificados um total de 3816 intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola em 2021, sendo 37,1% intoxicações motivadas por TS. Todas as variáveis testadas demonstraram significância estatística com  $p < 0,05$ , sendo que para a faixa etária de 10-19 anos o OR foi: 9,895 (CI 95% 5,96-16,43), entre 20 a 39 anos o OR obtido foi de 7,948 (CI 95% 4,2928-12,82), em 40-59 anos, o OR foi de 6,69 (CI 95% 4,121-10,86) e mais de 60 anos, OR de 5.895 (CI: 3,503-9,92). **Conclusão:** Adolescentes de 10 a 19 anos, apresentam chance de intoxicação com agrotóxico de uso agrícola por TS, 9,895 vezes maior que o grupo não exposto. O estudo das tentativas de suicídio e os riscos por intoxicações dentro da população, simbolizam uma importante prática dentro do processo de prevenção.

**Palavras-chave:** agrotóxico; intoxicação; tentativa de suicídio.

**Financiador (es):** Fundação Araucária, CAPES, CNPq.

**Área temática:** Toxicologia.



## INTOXICAÇÕES AGUDAS E PERCEPÇÃO DE AGRICULTORES EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE A AGROTÓXICOS

Thalita Fontana Manocchi<sup>1</sup> Aline Amenencia de Souza<sup>2</sup>; Beatris Truzzi Silva<sup>2</sup>; Renata Sano Lini<sup>3</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4,5</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup>Pesquisador, Bolsista Graduado, Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

<sup>4</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

<sup>5</sup>Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos e o Paraná é o terceiro maior consumidor do país. A exposição a essas substâncias, no entanto, pode ocasionar um efeito tóxico prejudicial à saúde humana. Embora as notificações sejam importantes para monitorar a ocorrência de intoxicações, há uma subnotificação evidenciada nos bancos de dados nacionais que pode ser explicada pela desinformação e a ocorrência de manifestações clínicas inespecíficas. **Objetivo:** Avaliar a percepção de um grupo de agricultores em relação à influência do uso de agrotóxicos em suas vidas e relacionar ao número de intoxicações agudas. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo quantitativo descritivo, onde foram realizadas entrevistas com um grupo de agricultores da região de Marialva-PR. A análise de dados foi realizada por meio do software Microsoft Excel® (2019). Estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEM (CAAE nº 650118017.7.0000.0104), sob o parecer nº 5.578.887. **Resultados:** De 87 agricultores, 96,5% relataram ter contato atual ou contato passado com agrotóxicos, sendo 96,42% através do trabalho e 3,57% por meio de contaminação ambiental. Desses, 16,09% relataram algum episódio de intoxicação aguda por esses compostos. Contudo, dentre os que já se intoxicaram, 71,42% alegaram que o uso de agrotóxicos não exerce qualquer interferência em suas vidas, enquanto 21,42% concordam que seu uso pode trazer algum prejuízo. **Conclusão:** Diante dos dados obtidos, a existência de casos de intoxicações relatadas e a percepção de que os agrotóxicos não exercem interferência na qualidade de vida dos entrevistados, podem estar associados à falta de informações sobre os riscos da utilização destes compostos, assim como a dificuldade em reconhecer os sintomas de uma intoxicação, levando a possíveis subnotificações.

**Palavras-chave:** agrotóxicos; agricultura familiar; saúde do trabalhador.

**Financiador:** Fundação Araucária, CAPES e CNPq.

**Área temática:** Toxicologia.



## **CASOS NOTIFICADOS DE INTOXICAÇÕES POR MEDICAMENTOS NO ESTADO DO PARANÁ RELACIONADAS AS TENTATIVAS DE SUICÍDIO EM 2021: LEVANTAMENTO DE DADOS OFICIAIS DA PLATAFORMA DATASUS.**

Rafaella Souza Cavallaro<sup>1</sup>; Mariana Risson Bittencourt<sup>1</sup>; Adriano Bueno Machado<sup>1</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>2</sup>; Raul Gomes Aguera<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista do projeto Universidade Sem Fronteiras, Universidade Estadual de Maringá e Discente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Ingá – UNINGÁ.

<sup>2</sup>Docente do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup>Aluno de Pós-Graduação (Doutorado) do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá e Docente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Ingá – UNINGÁ.

**Introdução:** As tentativas de suicídios associadas a medicamentos estão crescendo no estado do Paraná, sendo assim uma grande preocupação para a saúde pública. O suicídio é um ato deliberado e executado pelo próprio indivíduo de forma intencional. A ingestão proposital de medicamentos são as principais formas de intoxicações nessa ocorrência. **Objetivo:** Analisar e quantificar os casos notificados de intoxicações por medicamentos relacionados com suicídio no estado do Paraná em 2021. **Material e métodos:** O estudo é exploratório, descritivo e retrospectivo com análise de dados secundários, obtidos do SINAN, disponível no Site do DATASUS, os mesmos constam em classificações de sexo, faixa etária, nível de escolaridade e evolução. Os dados utilizados nesse trabalho são domínio público, não havendo necessidade da submissão do estudo a um comitê de ética em pesquisa, respeitando o que é preconizado pela Resolução 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. **Resultados:** Foram notificados um total de 6.985 casos, diante aos dados, com relação a variável sexo e idade, podemos inferir um predomínio de notificações de intoxicações por medicamentos relacionados tentativas de suicídio, em sua maioria mulheres (5.325), entre a faixa etária de 20 a 39 anos (3.387). Com relação a escolaridade dos casos notificados, o predomínio está no ensino médio completo (1.482), no que diz respeito a evolução dos casos notificados, a maioria desses evoluíram a uma cura sem sequelas (6.064). **Conclusão:** O presente estudo mostrou um predomínio de casos notificados do sexo feminino entre 20 a 39 anos, com grau de escolaridade média, com maior incidência de casos que evoluíram para a cura sem sequelas, em relação a intoxicação por medicamentos relacionados a tentativa de suicídio.

**Palavras-chave:** Intoxicações; Medicamentos; Suicídio.

**Financiador (es):** UGF - SETI

**Área temática:** Toxicologia.





## INTOXICAÇÕES POR DROGAS DE ABUSO NO ESTADO DO PARANÁ DE 2016 A 2020

Nicole Santos Baccule<sup>1</sup>; Fernando de Carvalho Figueiredo<sup>2</sup>; Deborah Thais Palma Scanferla<sup>3</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá

<sup>2</sup> Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá

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

<sup>4</sup> Docente, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O uso abusivo de Substâncias Psicoativas (SPA), sejam lícitas ou ilícitas, é um grave problema de saúde pública, visto que se relaciona com crescente criminalidade no Brasil. O usuário pode sofrer malefícios decorrente de intoxicações, podendo levar a sequelas, e, em casos mais graves, ao óbito. O perfil epidemiológico deve ser elucidado para desenvolver estratégias de prevenção e/ou contenção de danos. **Objetivo:** Analisar dados das notificações de intoxicações por drogas de abuso no estado do Paraná, notificadas no SINAN, no período de 2016 a 2020. **Material e métodos:** Estudo descritivo e exploratório com análise de dados obtidos no Departamento de Informação e Informática do SUS (DATASUS), referente ao uso de drogas de abuso nos anos de 2016 a 2020 no estado do Paraná, seguindo a resolução 466/2012-CNS. Microsoft Excel foi usado para análise estatística. **Resultados:** No período analisado foram notificados 9.667 casos de intoxicação por drogas de abuso, com predominância no sexo masculino (75,20%) nas intoxicações. Em relação à faixa etária, observou-se que o intervalo de 20 a 39 anos representou maior frequência de notificações, 49,13%. Quanto ao tipo de exposição e circunstância de uso, observou-se que a exposição aguda-única foi de 43,16%, sendo a mais frequente e o uso abusivo foi o mais expressivo, com 89,18% das intoxicações. A cidade paranaense com maior número de notificações foi a capital do estado, Curitiba, com 41,43% e o número de cura sem sequela e óbitos foram de 8.408 e 107 casos, respectivamente. **Conclusão:** O número de óbitos, decorrentes de intoxicações por drogas de abuso, é significativamente alto, levando em conta ocorrência de subnotificações. As estratégias de prevenção devem ser voltadas principalmente ao jovem adulto masculino. Ademais são necessárias medidas preventivas e educativas na adolescência, a fim de evitar o primeiro contato com SPAs, visando diminuir significativamente as intoxicações.

**Palavras-chave:** drogas de abuso; intoxicação; epidemiologia.

**Financiador (es):** CAPES, CNPq.

**Área temática:** Toxicologia.



## CASOS NOTIFICADOS DE ACIDENTES CAUSADOS POR ARANHAS NO ESTADO DO PARANÁ NO ANO DE 2021: LEVANTAMENTO DE DADOS OFICIAIS DA PLATAFORMA DATASUS.

Mariana Risson Bittencourt Moraes<sup>1</sup>; Adriano Bueno Machado<sup>1</sup>, Rafaella Souza Cavallaro<sup>1</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>2</sup>, Raul Gomes Aguera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista do projeto Universidade Sem Fronteiras, Universidade Estadual de Maringá e Discente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Ingá – UNINGÁ.

<sup>2</sup>Docente do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup>Aluno de Pós-Graduação (Doutorado) do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá e Docente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Ingá – UNINGÁ.

**Introdução:** Os acidentes causados por animais peçonhentos são comuns no estado do Paraná, e as aranhas destacam-se quando o assunto é este, possuindo um número relevante de notificações. As principais espécies que são consideradas de importância médica no estado do Paraná são: *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Latrodectus*. **Objetivo:** Investigar e caracterizar dados epidemiológicos referentes às notificações de acidentes causados por aranhas no Paraná no ano de 2021. **Material e métodos:** O presente estudo trata-se de um levantamento de dados, com a pesquisa realizada através da plataforma DATASUS. Os critérios utilizados foram, a quantidade de acidentes notificados em 2021, tipo de aranha, idade, sexo e evolução dos quadros clínicos. O estudo seguiu a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) na coleta e na divulgação dos dados. **Resultados:** Diante todas as notificações de acidentes causados por animais peçonhentos no ano de 2021 no estado do Paraná, totalizando 14.368 casos, as aranhas correspondem a 48,97% das notificações, ocupando o primeiro lugar no ranking com 7.037 casos. Dentre as espécies, a *Loxosceles* é a responsável pela maioria dos acidentes, totalizando 2.900 casos. A faixa-etária mais acometida são pessoas entre 20-59 anos com 44,48% de notificações, havendo pouca diferença entre os gêneros, onde notificou-se 3.436 casos do sexo feminino e 3.601 casos do sexo masculino. Com relação aos quadros clínicos, em sua maioria evoluem para cura (89%). **Conclusão:** diante dos dados analisados, até o presente momento podemos inferir um predomínio de notificações de acidentes por aranhas, em sua maioria foram pessoas de 20 a 59 anos, com um leve predomínio de homens e, que a maioria dos casos evoluem à cura.

**Palavras-chave:** epidemiologia; aranhas; intoxicação.

**Financiador (es):** UGF - SETI

**Área temática:** Toxicologia



## PERFIL DO USO DE ÁLCOOL, TABACO E OUTRAS DROGAS EM UNIVERSITÁRIOS DA ÁREA DE SAÚDE DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA

Jéssica Yuri Sakurada<sup>1</sup>; Raul Gomes Aguera<sup>2</sup>; 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>Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) 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, Maringá/PR

**Introdução:** Em 2018, cerca de 269 milhões de pessoas no mundo, entre 15 e 64 anos, utilizaram drogas pelo menos uma vez no ano anterior. O período da graduação apresenta momentos favoráveis e vulneráveis que gera um julgamento liberal sobre as drogas que elevam a propensão do seu consumo. Há poucos estudos que trazem uma visão geral do consumo de drogas de abuso em cursos da área da saúde. Assim, questiona-se a associação do conhecimento teórico-prático adquirido na graduação e o comportamento no uso de drogas.

**Objetivo:** Descrever as características epidemiológicas do consumo de álcool, tabaco e outras drogas em alunos dos cursos da área da saúde de uma universidade pública. **Material e métodos:** Estudo realizado com amostra de 217 alunos dos cursos de Biomedicina, Educação física, Enfermagem, Farmácia, Medicina, Odontologia e Psicologia, no ano de 2020. O instrumento “*Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test*” acrescido com questões sociodemográficas foi utilizado para coleta de informações. Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá com parecer nº 3.430.374. **Resultados:** Observou-se o uso de álcool (90%), tabaco (57%) e maconha (43%) sendo que nos últimos três meses foi prevalente o consumo de álcool (77%), tabaco (28%) e maconha (18%). Cerca de 50% dos alunos já usavam álcool antes do ingresso na universidade. A partir da análise comparativa do uso entre as seriações, notou-se que entre primeiro ano e o quinto ano, houve aumento de 40% na utilização de outras drogas, seguido pelo tabaco com aumento de 19% e pelo álcool com aumento de 4%. **Conclusão:** Os resultados obtidos ressaltam a importância de estudos mais aprofundados sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas na instituição e regionalmente, além de estratégias preventivas.

**Palavras-chave:** drogas de abuso; estudantes de ciências da saúde; epidemiologia descritiva.

**Área temática:** Toxicologia



## AVALIAÇÃO CITOGENOTÓXICA DO FUNGICIDA RIDOMIL GOLD MZ<sup>®</sup> EM BIOENSAIO COM *Allium cepa*

Débora Hayane Vidal Pereira<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>3</sup>; Tânia Cristina Alexandrino Becker<sup>3</sup>; Edilson Nobuyoshi Kaneshima<sup>3</sup>; Alice Maria de Souza Kaneshima<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmica de Graduação em Biologia, Universidade Estadual de Maringá.

<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 Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

**Introdução:** Os agrotóxicos, muito utilizados para aumentar a produção agrícola, podem causar danos à saúde humana. O bioensaio com *Allium cepa* é fácil e de baixo custo para determinar citogenotoxicidade de substâncias tóxicas. **Objetivo:** analisar os efeitos citogenotóxicos do fungicida Ridomil Gold-MZ<sup>®</sup>, através do bioensaio com *Allium cepa*. **Material e métodos:** Este experimento foi realizado em quadruplicata e o fungicida foi doado por um produtor de uva da região de Marialva-PR. Foram testadas, a concentração de uso na viticultura (25g/L) e outras 4 concentrações, sendo 2 abaixo da concentração de uso (6,25g/L e 12,5g/L) e 2 acima (50g/L e 100g/L), como controle negativo utilizou-se água. Os bulbos de *Allium cepa*, foram adquiridos de um mesmo fornecedor, com diâmetro de aproximadamente 3 cm. Os bulbos foram colocados em água por 48 horas para que houvesse crescimento da raiz e após, foram imersos por 72 horas nas soluções-teste com Ridomil Gold-MZ<sup>®</sup>. Cada tratamento foi comparado com o controle negativo e a ocorrência de citotoxicidade foi considerada quando ocorresse a diferença significativa no comprimento das raízes em solução teste. Para a genotoxicidade, foram preparadas lâminas por esmagamento manual coradas com Reativo de Schiff, onde analisou-se 2.000 células para cada replicata e o número de anormalidades em 100 células em divisão celular. **Resultados:** Os resultados evidenciam que o ativo inibiu a divisão celular na maior concentração do teste (100g/L), na qual não foram encontradas células em divisão celular, mas sim muitas células com imensos vacúolos nucleares, além de morte celular. Nas outras quatro concentrações, dentre elas, a concentração de uso na viticultura, foram observadas alterações citotóxicas e genotóxicas em todas as fases de divisão celular em quantidade maior do que observado no controle negativo. **Conclusão:** O fungicida Ridomil Gold-MZ<sup>®</sup> apresentou efeito citogenotóxico nas concentrações testada.

**Palavras-chave:** ridomil; *Allium cepa*; citogenotoxicidade.

**Financiador (es):** Fundação Araucária.

**Área temática:** Toxicologia.



## DADOS OFICIAIS DAS NOTIFICAÇÕES DE INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS AGRÍCOLAS RELACIONADOS A INGESTÃO DE ALIMENTOS E BEBIDAS NO BRASIL NOS ÚLTIMOS CINCO ANOS

Nathali Miranda Piacquadio<sup>1</sup>, Natália Santos Pretes<sup>1</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>2</sup>, Juliana Cristina Castro<sup>2</sup> e Miguel Machinski Junior<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

<sup>2</sup> Docente, Departamento de Ciências da Saúde (DBS), Universidade Estadual de Maringá/PR.

**Introdução:** Os praguicidas são produtos químicos sintéticos utilizados para controlar e/ou eliminar pragas como insetos, larvas e fungos, sendo o Brasil um dos maiores consumidores a nível mundial. O país ainda possui uma legislação permissiva que juntamente com o uso inadequado e excessivo dos praguicidas, têm uma média anual de consumo de 7L de agrotóxicos por habitante. O mau uso dos praguicidas pode causar contaminação dos alimentos e dentre as consequências da exposição humana prolongada aos agrotóxicos, está o desenvolvimento de câncer. Ao considerar que para cada caso de intoxicação por praguicida notificado, há outros 50 não notificados, faz-se necessário uma avaliação dessas notificações e uma correlação com a legislação que a cada ano se torna mais permissível. **Objetivo:** Avaliar o número de notificações de intoxicação por agrotóxicos agrícolas nos últimos 5 anos. **Material e métodos:** Para busca de artigos foram utilizadas as plataformas Science Direct e Frontiers, enquanto para os dados oficiais de notificação de intoxicação e para os dados dos praguicidas mais vendidos no país, foram utilizadas a plataforma TabNet do DataSus e o site do IBAMA, respectivamente. **Resultados:** Os 10 agrotóxicos mais vendidos no ano de 2020 foram: glifosato, 2,4-D, mancozebe, atrazina, acefato, clorotalonil, malationa, enxofre, imidacloprido e clorpirifós. Do ano de 2017 a 2021 foram feitas 24.880 notificações de intoxicação por agrotóxico agrícola, das quais 129 provinham da ingestão de alimentos contaminados por praguicidas. Em 2021 o Brasil bateu recordes em liberações de praguicidas, terminando o ano com 562 agrotóxicos liberados e com 26 notificações de intoxicação por praguicida via alimentar. **Conclusão:** Diante destes dados oficiais, é necessária maior atenção nesse assunto, para que a população não tenha que arcar com as consequências patológicas que a intoxicação por praguicidas crônica e aguda podem causar.

**Palavras-chave:** epidemiologia; intoxicação; praguicidas.

**Financiador (es):** CAPES.

**Área temática:** Toxicologia



## RELATOS DE ACIDENTES OFÍDICOS NO PARANÁ EM 2021

Bruno Guidelli Tavechio<sup>1</sup>; Renata Sano Lini<sup>2</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmico de graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

<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 Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** Acidentes ofídicos são graves problemas no Paraná. Entre espécies de interesse médico destacam-se *Bothrops jararaca* (jararaca), *Crotalus durissus* (cascavel), *Micrurus corallinus* (coral) e *Lachesis muta* (surucucu). É importante conhecer os mecanismos fisiológicos das peçonhas, considerando-se a distribuição geográfica de cada serpente, para preconização da melhor terapia. **Objetivo:** Este resumo objetivou estudar a ocorrência de ofidismo, por espécie de serpente em 2021. **Material e métodos:** Foram obtidos dados do Sistema de Informação de Agravo de Notificação e realizada análise quantitativa referente aos casos com serpentes específicas, relacionados à faixa etária. **Resultado:** Foram registrados 13.740 casos com serpentes não identificadas, sendo 138 atribuídos a animais não peçonhentos. Foram relacionados 400 casos a *Bothrops jararaca*, 36 na faixa etária entre 1-14 anos, 22 entre 15-19 anos, 119 entre 20-39 anos, 143 entre 40-59 anos e 80 entre 60-80+. Para *Crotalus durissus* foram notificados 84 acidentes, sendo 5 entre 5-14 anos, 5 de 15-19 anos, 14 entre 20-39 anos, 39 entre 40-59 anos e 21 entre 60-80+ anos. Para *Micrurus corallinus* foram 4 casos, 1 entre 1-5 anos, 1 entre 20-39 anos e 1 entre 60-79 anos. Um caso foi relacionado à *Lachesis muta*, entre 1-5 anos. Os números para *Micrurus corallinus* e *Lachesis muta* relacionam-se aos seus hábitos crípticos, que reduzem o potencial para acidentes. A serpente mais relacionada a acidentes foi *bothrops jararaca*, o que está em conformidade com outros períodos, estados e regiões brasileiras, segundo o Ministério da Saúde. Fato relevante é o número de serpentes não identificadas, levando à soroterapia inespecífica, que pode dificultar o sucesso terapêutico e redução de óbito. **Conclusão:** Pessoas entre 20 e 59 anos possuem maior índice de acidentes, devido a concentração da atividade laboral, principalmente no campo, proporcionando maior exposição às serpentes. Além disso *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* possuem maior número de acidentes.

**Palavras-chave:** ofidismo; faixa etária; epidemiologia.

**Área temática:** Toxicologia



## DADOS EPIDEMIOLÓGICOS COLETADOS NA PLATAFORMA DATASUS: PERFIL DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR NO BRASIL DURANTE A PANDEMIA (2019, 2020 e 2021)

Natália Santos Pretes<sup>1</sup>, Nathali Miranda Piacquadio<sup>1</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>2</sup>, Juliana Cristina Castro<sup>2</sup>, Miguel Machinski Junior<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

<sup>2</sup> Docente, Departamento de Ciências Básica da Saúde (DBS), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

**Introdução:** O consumo de alimentos com presença de substâncias tóxicas conduz a má qualidade, riscos e intoxicações alimentares. Durante a pandemia, os brasileiros tiveram mais refeições preparadas em casa, o que acarretou em um registro inferior de intoxicações alimentares. Diante disto, o objetivo deste estudo é avaliar e apresentar os dados de intoxicação alimentar coletadas em plataformas de dados oficiais dos últimos 3 anos. **Material e métodos:** Os dados foram obtidos na plataforma do Departamento de Informática do SUS sobre notificação de casos de intoxicação por alimento e bebida no Brasil, no período de 2019 a 2021. As variáveis analisadas foram agentes tóxicos, tipo de exposição e a evolução da intoxicação. O presente trabalho enquadra-se como dados de domínio público, não havendo necessidade da submissão do estudo a um comitê de ética em pesquisa, respeitando o que é preconizado pela Resolução 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. **Resultados:** Segundo dados da plataforma DATASUS nos anos de 2019, 2020 e 2021 foram registradas 482.454 notificações de intoxicações, sendo 22.478 causados por alimentos e bebidas. Foi observado que as notificações de intoxicação por alimento e bebida em 2019 (9.247) é maior comparado com 2020 (7.072) e 2021 (6.159); O número de exposições crônicas em 2019 (473), 2020 (295) e 2021 (267) apresenta declínio. Seguindo a evolução da doença, em 2019, 7.562 intoxicações foram curadas sem sequelas, 5.727 em 2020 e 4.898 em 2021; dentro desse período analisado, 51 óbitos por intoxicação exógena foram registrados. **Conclusão:** A partir dos dados observados e avaliados durante a pandemia (2020 e 2021), as notificações de intoxicações por alimentos e bebidas, foram menores comparados com 2019, mesmo com o aumento de alimentos preparados em casa, possível resultado das práticas de higienização e cuidados pessoais adotados no período pandêmico a fim de evitar contaminação.

**Palavras-chave:** intoxicação; alimentos; pandemia.

**Financiador (es):** CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**Área temática:** Toxicologia



## CASOS NOTIFICADOS DE ACIDENTES CAUSADOS POR ESCORPIÕES NO ESTADO DO PARANÁ REFERENTE AO ANO DE 2021: LEVANTAMENTO DE DADOS DA PLATAFORMA DATASUS.

Adriano Bueno Machado<sup>1</sup>; Mariana Risson Bittencourt Moraes<sup>1</sup>, Rafaella Souza Cavallaro<sup>1</sup>, Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>2</sup>, Raul Gomes Aguera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista do projeto Universidade Sem Fronteiras, Universidade Estadual de Maringá e Discente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Ingá – UNINGÁ.

<sup>2</sup>Docente do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup>Aluno de Pós-Graduação (Doutorado) do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá e Docente do curso de Biomedicina, Centro Universitário Ingá – UNINGÁ.

**Introdução:** O aumento do número de escorpiões ao redor do país é uma realidade cada vez mais constante. Geralmente, a infestação desses animais ocorre em ambientes urbanos. Existem duas principais espécies de escorpiões no território brasileiro: o escorpião-marrom e o escorpião-amarelo. Esses dois tipos são responsáveis pela quase totalidade dos acidentes com esses animais peçonhentos. **Objetivo:** A pesquisa tem como objetivo investigar e analisar os casos notificados envolvendo acidentes por escorpião no Estado do Paraná no ano de 2021. **Material e métodos:** Pesquisa descritiva de análise sobre de dados extraídos da plataforma DATASUS, de notificação de acidentes com escorpião no Estado do Paraná no ano de 2021, as variáveis analisadas foram faixa etária, sexo, escolaridade, evolução de casos e gravidade. **Resultados:** Foram registrados um total de 3.973 casos notificados no Estado do Paraná em 2021. Nas notificações por faixa etária no período analisado, percebe-se que os casos ficaram concentrados na população com idades entre 20 e 39 anos (1.241 casos) e entre 40 e 59 anos (1.222 casos). Em relação ao nível de escolaridade dos registros, é possível observar que o maior número de casos é do ensino médio completo (803 casos). No que se refere as notificações por sexo foram apontados que a maioria das notificações ocorreram no sexo masculino (2.138 casos). Com relação a evolução dos casos e gravidade, foi observado que a maioria dos casos evoluíram para a cura (3.683 casos) e a maioria das ocorrências foram de natureza leve (3568 casos). **Conclusões:** Desta forma, diante das notificações no ano de 2021 podemos inferir um predomínio de casos envolvendo homens, com idade entre 20 e 59 anos, pode se verificar que a faixa etária mais atingida é economicamente ativa, podendo supor que boa parte dos acidentes podem ter ocorrido no ambiente de trabalho. Com o fato de escorpiões gostarem de se esconder debaixo de pedras, troncos de árvores e em entulhos, e como, em sua maioria, os homens são os responsáveis por realizar trabalhos braçais em áreas rurais ou em profissões que manuseiam tais objetos, como é o caso de marceneiros, é possível justificar o porquê do sexo masculino ter sido o mais afetado.

**Palavras-chave:** escorpiões; acidentes; gravidade.

**Financiador (es):** UGF - SETI

**Área temática:** Toxicologia.





## EFEITOS CLASTOGÊNICOS E ENEUGÊNICOS EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL DE AGRICULTORES EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS

Renata Sano Lini<sup>1</sup>; Carlos Roberto Bueno Junior<sup>2</sup>; Mariana Yumi Date<sup>2</sup>; Alice Maria de Souza Kaneshima<sup>3</sup>; Simone Aparecida Galerani Mossini<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

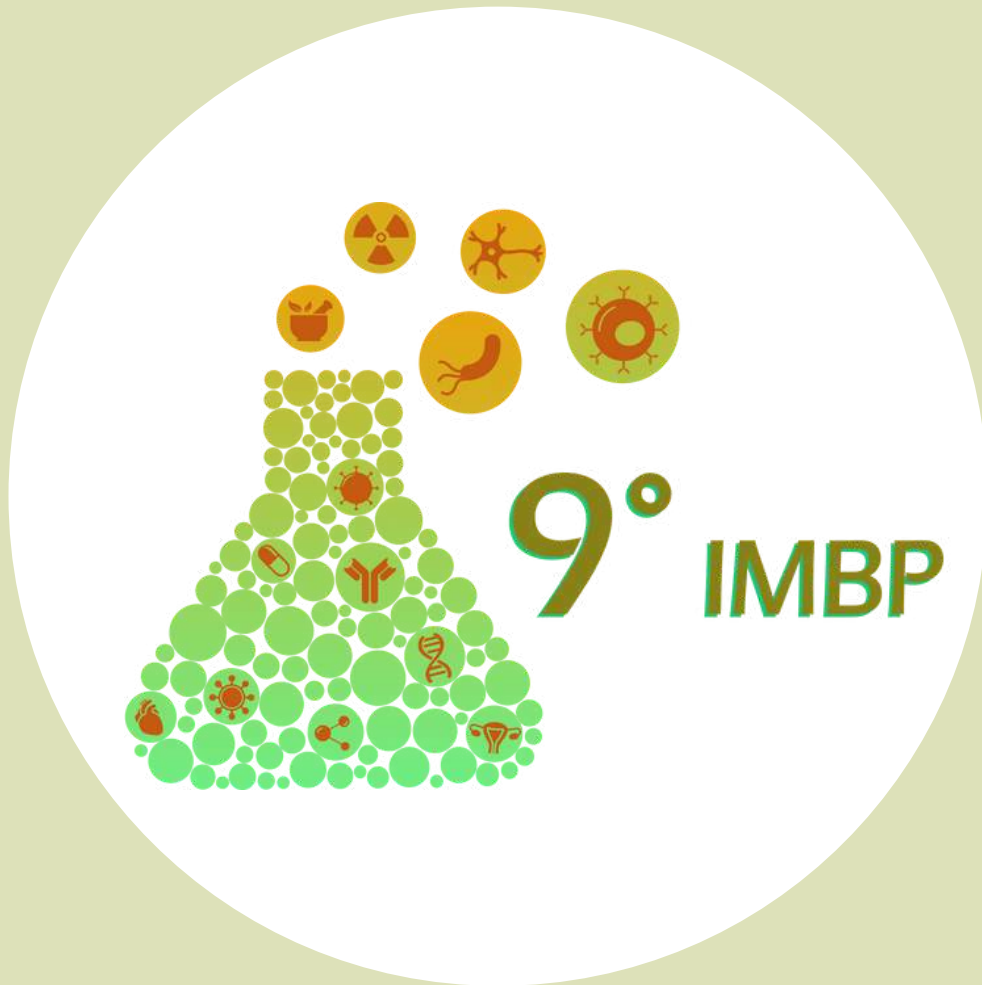
<sup>3</sup>Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

**Introdução:** A análise de micronúcleo em células bucais é um biomarcador alternativo que avalia o risco da exposição aos agrotóxicos com possível potencial carcinogênico. **Objetivo:** Determinar a ocorrência de micronúcleo em células bucais coletadas de agricultores expostos aos agrotóxicos para avaliar possíveis efeitos clastogênicos e aneugênicos. **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá sob parecer nº 4.254.657. O estudo foi realizado com 27 agricultores da região de Marialva-PR. A amostra foi coletada do epitélio jugal direito e esquerdo, com o auxílio de uma escova citológica, acondicionada em tubos cônicos contendo 5 mL de solução de NaCl a 0,9%, e encaminhadas sob refrigeração para serem processadas conforme o método descrito em Benedetti et al. (2013) com algumas modificações. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva. **Resultados:** 3 agricultores relataram o uso completo do Equipamento de Proteção Individual (EPI) recomendado, 7 relataram não utilizar EPI, e 17 fazem uso do EPI de forma parcial. A maioria (n=25) não é fumante, consumindo bebida alcoólica de forma moderada (n=24). Após a contagem de 2.000 células de cada agricultor, verificou-se a ocorrência de micronúcleo que variou de zero a sete. Deve ser ressaltado que 7 micronúcleos foram observados em amostras de dois agricultores expostos aos agrotóxicos por aproximadamente 30 anos, sendo que um já apresentou sintomas de intoxicação devido ao uso de agrotóxicos e o outro relatou que não faz uso dos EPI. **Conclusão:** Este estudo apresenta resultados parciais, mas já é possível perceber que há aumento da ocorrência do número de micronúcleos em agricultores que não utilizam o EPI e que foram expostos aos agrotóxicos por muitos anos, sendo um indicativo de que os agrotóxicos podem atuar como agentes aneugênicos e clastogênicos.

**Palavras-chave:** micronúcleo; genotoxicidade; agrotóxicos.

**Financiador (es):** CNPQ e Fundação Araucária

**Área temática:** Toxicologia



# ANAIS 2022

COMISSÃO ORGANIZADORA  
Fone: (44)3011-4805  
[simposiodopbf@uem.br](mailto:simposiodopbf@uem.br)



Programa de Pós-Graduação  
em Biociências e Fisiopatologia