

8th International Meeting of Biosciences & Physiopathology

12^o Simpósio de Biociências Aplicadas a Farmácia



Anais

2021

APRESENTAÇÃO

No Anais do 8th *International Meeting of Biosciences and Physiopathology* e 12^o Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia estão publicados os resumos expandidos e resumos simples de trabalhos científicos apresentados durante o evento. O mesmo foi organizado pelo Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, nos dias 15 a 17 de setembro de 2021.



PBF 
Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Fisiopatologia



Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., Brasil)

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

Anual

ISSN 2176-6045

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

CDD 21.ed. 796.07

ORGANIZAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

REITORIA

Prof. Dr. Júlio César Damasceno - Reitor

Prof. Dr. Ricardo Dias Silva - Vice-Reitor

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior - Diretor

Profa. Dra. Priscila Garcia Marques - Diretora Adjunta

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA

Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso - Chefe

Profa. Dra. Sandra Mara Alessi Aristisdes - Chefe Adjunta

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E FISIOPATOLOGIA

Profa. Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini - Coordenadora

Profa. Dra. Érika Seki Kioshima Cotica - Coordenadora Adjunta

COORDENAÇÃO GERAL

Profa. Dra. Simone Aparecida Galerani Mossini

Profa. Dra. Érika Seki Kioshima Cotica

Profa. Dra. Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo

Profa. Dra. Isis Regina Grenier Capoci

Profa. Dra. Jaqueline de Carvalho Rinaldi

Profa. Dra. Joana Maira Valentini Zacarias

Profa. Dra. Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli

Profa. Dra. Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça

COMISSÃO ORGANIZADORA

Aléia Harumi Uchibaba Yamanaka

Amanda Gubert Alves dos Santos

Anna Rebeka Oliveira Ferreira

Gisela Myrian de Lima Leite Dalla Rosa

Jean Eduardo Meneguello

Lilian Catarim Fabiano

Maria Natália Chimirri Peres

Renata Sano Lini

Vânia Azevedo Cardoso

STAFF

Bruna Lauton Simões

Lincoln Luís Silva

Sumário

Resumo expandido	12
Desafios das doenças virais emergentes	13
ISOLADOS EM URINA DE PACIENTES INTERNADOS POR COVID-19 EM UTI RESPIRATÓRIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DE MARINGÁ	14
NATURAL HISTORY OF EMERGING ZIKA AND SARS-COV-2 VIRUSES IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM: A SYSTEMATIC REVIEW.....	19
VALIDAÇÃO DA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM POOLS DE AMOSTRAS DE SWAB NASAL	24
Inovação e saúde	29
IDENTIFICATION OF PUTATIVE INHIBITORS OF 3-DEHYDROSHIKIMATE DEHYDRATASE FROM <i>Mycobacterium tuberculosis</i> BY <i>in silico</i> APPROACHES.....	30
PHTHALOCYANINE AS A PHOTOSENSITIZER FOR CERVICAL CANCER PHOTODYNAMIC THERAPY: PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES.....	36
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CANABINOIDES EM FLUIDO ORAL POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS	42
Novas tecnologias e Diagnóstico laboratorial.....	49
ANÁLISES <i>IN SILICO</i> COM FOCO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA	50
SAFETY OF THE NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY –NAT ASSOCIATED WITH THE SEROLOGICAL TESTS FOR THE DETECTION OF BLOOD DONORS WITH HBV/HCV/HIV IN THE DIAGNOSTIC WINDOW PERIOD OR THE PRESENCE OF OCCULT INFECTIONS: A SYSTEMATIC REVIEW	56
TECHNOLOGY DEVELOPMENT IN THE GENETIC IDENTIFICATION OF ERYTHROCYTE BLOOD SYSTEMS FOR PRACTICAL PROBLEMS IN TRANSFUSION THERAPY	65
Antimicrobianos – uma luta incansável!.....	69
COMBINAÇÃO <i>in vitro</i> CONTRA <i>Mycobacterium tuberculosis</i> DE FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE COM SUBSTÂNCIAS QUE TEM SIDO AMPLAMENTE UTILIZADAS EM PACIENTES COM COVID-19 DURANTE A PANDEMIA.....	70
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO CARVACROL E DERIVADOS EM <i>Mycobacterium</i> spp.– REVISÃO SISTEMÁTICA.....	77
ATIVIDADE DA POLIMIXINA B COMBINADA COM DERIVADOS 3,5-DINITROBENZOILHIDRAZÔNICOS E COM <i>N</i> -ACILHIDRAZONAS DERIVADOS DA ISONIAZIDA CONTRA GRAM-NEGATIVOS MULTIRRESISTES	83

Estudos em Parasitologia e Neurogastroenterologia	90
DIFFERENT STRAINS OF <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> IMPAIRS ILEUM MORPHOLOGY IN HAMSTERS	91
RESPOSTA TECIDUAL DO ÍLEO À INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) E AO TRATAMENTO COM <i>Echinacea purpurea</i> EM RATOS	98
RESPOSTA TECIDUAL DA PRÓSTATA À INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) E AO TRATAMENTO COM <i>Echinacea purpurea</i> EM RATOS	105
IMMUNOSTIMULATION WITH <i>Echinacea purpurea</i> : JEJUNAL RESPONSE TO CHRONIC TOXOPLASMOSIS IN <i>Rattus norvegicus</i>	111
ANÁLISE DO DUODENO DE <i>Rattus norvegicus</i> SUBMETIDOS A INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> (CEPA RH) E TRATADOS COM <i>Echinacea purpurea</i>	118
Resumos simples.....	123
Bioquímica clínica.....	124
EFEITOS DO BOLDINE SOBRE A GLICONEOGÊNESE A PARTIR DE LACTATO EM FÍGADO DE RATOS EM PERFUSÃO	125
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTATIONA NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NO TECIDO CARDÍACO DE RATOS DIABÉTICOS	126
INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS: VALORIZAÇÃO DO LAUDO LABORATORIAL DE HEMOCULTURA	127
Epidemiologia.....	128
O PERFIL SOCIOECONÔMICO DE ADOLESCENTES DE UMA ESCOLA PRIVADA NO MUNICÍPIO DE IVATUBA (PR)	129
ESTUDO RETROSPECTIVO DE CASOS DE TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARANÁ: 20 ANOS DE NOTIFICAÇÃO	130
OPENDATA: O AVANÇO DA VACINAÇÃO CONTRA A COVID-19 NO BRASIL	131
PERFIL DOS ATENDIMENTOS AMBULATORIAIS RELACIONADOS A DERMATOFITOSSES NO PARANÁ ENTRE 2016 E 2020	132
TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN ANIMALS NATURALLY INFECTED IN BRAZIL: SYSTEMATIC REVIEW	133
INTOXICAÇÃO EXÓGENA POR TRAZODONA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS NOTIFICADOS EM UM CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES	134
ANÁLISE GEOESPACIAL DAS INTERNAÇÕES POR DOENÇAS DO APARELHO CIRCULATÓRIO POR REGIONAL DE SAÚDE NO BRASIL	135
PERFIL DE SONO DE ADOLESCENTES DE UMA ESCOLA PARTICULAR DO NOROESTE DO PARANÁ	136
DEPRESSÃO EM ADOLESCENTES: ESTUDO GEOESPACIAL ENTRE A DISTÂNCIA DE ESCOLAS E ÁREAS PARA PRÁTICA ESPORTIVA DE UMA CIDADE DE PEQUENO PORTE	137
FREQUÊNCIA ALIMENTAR DE ADOLESCENTES DE UMA REDE DE ENSINO ADVENTISTA	138

ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS PSICOEMOCIONAIS E USO DE MEDICAMENTOS POR ADOLESCENTES	139
NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA EM ADOLESCENTES	140
TAXA DE INTERNAMENTO POR TRANSTORNOS NEURÓTICOS, RELACIONADOS COM STRESS E SOMATOFORMES ANTES E DURANTE A PANDEMIA DO COVID-19	141
Farmacognosia.....	142
EFEITO DA LUZ UV-C NA PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES EM CULTURAS <i>in vitro</i> DE <i>Cereus hildmannianus</i> (K.) Schum.	143
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO APOLAR DAS FLORES DE <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	144
CAPACIDADE DE QUELAÇÃO DOS ÍONS FERRO A PARTIR DO EXTRATO OBTIDO DE RESÍDUO DE CAULE DE <i>Stevia rebaudiana</i>	145
Farmacologia.....	146
EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DE TRÊS CUMARINAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS EM UM MODELO DE PLEURISIA EM RATOS.....	147
PLANEJAMENTO MOLECULAR DE AZA-HETEROCICLOS ANÁLOGOS DO ANTIVIRAL X77 COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DO SARS-CoV-2.....	148
Fisiologia	149
MALNUTRITION DURING ADOLESCENCE INDUCES CHANGES IN CARDIOVASCULAR SYSTEM IN RATS	150
RATOS ADOLESCENTES TRATADOS COM RITALINA® SÃO MAIS RESPONSIVOS À INSULINA NA IDADE ADULTA	151
FEMALE WISTAR RATS SUBMITTED TO PROTEIN-CALORIC RESTRICTION DURING THE LACTATIONAL PERIOD PRESENT ALTERATIONS IN BIOMETRIC PARAMETERS WITHOUT ALTERING THE GLUCOSE METABOLISM.....	152
Imunogenética.....	153
ALELOS HLA RAROS E BEM DOCUMENTADOS NA POPULAÇÃO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA ATENDIDA PELO LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA DA UEM	154
POLIMORFISMO DE DELEÇÃO APOBEC3A/B NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	155
Imunologia	156
COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DENGUE EM AMOSTRAS DE PACIENTES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO PARANÁ.....	157
EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E INTERAÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 COM VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR <i>Trypanosoma cruzi</i>	158
Microbiologia.....	159
HYP-P123 INTRACELLULAR UPTAKE ON <i>Fusarium solani</i>	160

STANDARDIZATION OF PROTEIN EXTRACTION AFTER ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY FOR PROTEOMIC APPROACH.....	161
EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF A PRENYLATED FLAVONOID ISOLATED FROM GREEN PROPOLIS: A SYSTEMATIC REVIEW	162
TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA SOLÚVEL EM ÁGUA ASSOCIADA A ÁCIDOS ORGÂNICOS FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i>	163
EXPRESSÃO DE GLUTATIONA REDUTASE DE <i>Aspergillus fumigatus</i> COMO ALVO PARA NOVOS ANTIFÚNGICOS.....	164
ATIVIDADE DE DERIVADOS DE TIOSSEMICARBAZONAS EM <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	165
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA SOLÚVEL EM ÁGUA PARA CONTROLE DE <i>Staphylococcus aureus</i>	166
COINFECTION OF SARS-CoV-2 AND HIV IN A PATIENT IN MARINGÁ CITY, BRAZIL	167
MUDANÇAS NOS HÁBITOS NAS COMPRAS E USO DE DELIVERY DURANTE A COVID-19	168
DIABETIC HOST SUSCEPTIBILITY TO FUNGAL INFECTIONS: MURINE MODEL OF <i>TINEA CAPITIS</i> .	169
ANÁLISE DAS DOSAGENS SÉRICAS DE VITAMINA D E B12 NA EVOLUÇÃO DO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM COVID-19.....	170
FREQUÊNCIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ISOLADOS DA SECREÇÃO OROTRAQUEAL EM PACIENTES COM COVID-19.....	171
MUDANÇAS NAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO DE ALIMENTOS DURANTE A COVID-19	172
ANALYSIS OF THE HIPERICIN+P123 PHOTOTREATMENT TOLERANCE OF <i>Candida albicans</i> AFTER FIVE-CONSECUTIVE EXPOSURES	173
PHOTOINACTIVATION OF <i>Candida albicans</i> BY CURCUMIN-SCAFFOLD: PRELIMINARY RESULTS	174
INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS: VALORIZAÇÃO DO LAUDO LABORATORIAL DE HEMOCULTURA.....	175
ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY HYPERICIN IN P-123 ON CLINICAL ISOLATE OF <i>Trichophyton rubrum</i>	176
TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE: REVISÃO SISTEMÁTICA	177
BIOFILME MISTO POR LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTE COM ONICOMICOSE.....	178
RECOMBINANT PROTEIN OF THIOREDOXIN SYSTEMS FROM <i>Aspergillus fumigatus</i>	179
CO-INFECÇÃO BACTERIANA EM PACIENTES COM COVID-19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.....	180
SELEÇÃO DE EPÍTOPOS PARA DIAGNÓSTICO DA COVID-19 E REAÇÕES CRUZADAS.....	181
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO COMPOSTO SINTÉTICO LMM6	182
Morfologia.....	183
TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE REDUZ O PESO DO FÍGADO DE RATOS DE DIFERENTES IDADES SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA	184

IMPACT OF NEONATAL METFORMIN AND ADULTHOOD HIGH-FAT DIET ON FIBERS OF THE PROSTATIC EXTRACELLULAR MATRIX.....	185
HIPERTROFIA DOS NEURÔNIOS DO PLEXO PROSTÁTICO DE RATOS WISTAR ADMINISTRADOS COM 5-FLUOROURACIL	186
ANÁLISE DESCRITIVA DE ESTRUTURAS CELULARES DA ARTICULAÇÃO DE JOELHO SUBMETIDA A UM PROCESSO ACELERADO DE DESCALCIFICAÇÃO COM ETDA	187
AÇÃO DO <i>Limonium brasiliense</i> NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL: ESTUDO HISTOLÓGICO.....	188
IMPACTOS DA SUPEREXPRESSION DA APOLIPOPROTEÍNA CIII HUMANA NA ALTURA EPITELIAL DA PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS C57BL/6.....	189
AVALIAÇÃO DE NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO PLEXO MIENTÉRICO DO JEJUNO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> E TRATADOS COM <i>Echinacea purpurea</i>	190
A INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> NÃO ALTERA A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA PRÓSTATA DE RATOS WISTAR	191
A INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> PROMOVE ALTERAÇÕES EPITELIAIS NA PRÓSTATA DE RATOS WISTAR.....	192
EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DE TRÊS CUMARINAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS EM UM MODELO DE PLEURISIA EM RATOS.....	193
ALTERAÇÕES CAUSADAS PELA INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>TOXOPLASMA GONDII</i> NA DISTRIBUIÇÃO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	194
IMPACT OF QUERCETIN-LOADED-MICROCAPSULES TREATMENT ON THE TOTAL LEUCOCYTE POPULATION OF THE JEJUNUM OF RATS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS.....	195
Neurociências.....	196
ALTERATIONS IN PERINEURONAL NET IN EXTRINSIC INNERVATION OF MICE DISTAL COLON IN CHRONIC ULCERATIVE COLITIS	197
Parasitologia.....	198
PREVALENCE STUDY OF <i>Giardia duodenalis</i> IN DOMESTICS DOGS FROM A RECREATIONAL CENTER FOR ANIMALS, MARINGÁ-PR.....	199
ANÁLISE DO NÚMERO DE NEURÔNIOS nNOS IMUNORREATIVOS NO PLEXO MIEONTÉRICO DO DUODENO DE <i>Rattus norvegicus</i> SUBMETIDOS A INFECÇÃO CRÔNICA POR <i>Toxoplasma gondii</i> E TRATADOS COM <i>Echinacea purpúrea</i>	200
ROSUVASTATINA REVERTE O DÉFICIT DE MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA ME-49 CRÔNICA DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	201
INFECÇÃO POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ALTERA QUANTITATIVAMENTE AS CÉLULAS PRODUTORAS DE SULFOMUCINAS DO DUODENO DE HAMSTERS	202
ELIMINATION OF <i>Giardia muris</i> IN NATURALLY INFECTED MURINE EXPERIMENTAL MODEL: COMPLEMENTARY TREATMENT	203
CONTAGEM DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO DUODENO DE HAMSTERS INFECTADOS POR <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	204

Patologia	205
TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BUCAIS: OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA A EXECUÇÃO DA TÉCNICA.....	206
AVALIAÇÃO DO CÓLON DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INDUÇÃO DO CÂNCER COLORRETAL COM 1,2-DIMETILHIDRAZINA, TRATADOS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA E ARTEPILLIN C	207
A IMPORTÂNCIA DA ULTRASSONAGRAFIA PARA O DIAGNÓSTICO E O ACOMPANHAMENTO DA COVID-19: REVISÃO INTEGRATIVA	208
Pesquisa clínica	209
REVISÃO NÃO-SISTEMÁTICA SOBRE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O TRATAMENTO DE HIPÓXIA	210
EVENTOS ADVERSOS A MEDICAMENTOS EM PACIENTE COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE ...	211
Saúde pública	212
DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA SOBRE CIÊNCIAS DA SAÚDE EM MÍDIA SOCIAL.....	213
FATORES ASSOCIADOS À FALHA TERAPÊUTICA EM CRIANÇAS INTERNADAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL NO BRASIL	214
AVALIAÇÃO DA ANTIBIOPROFILAXIA CIRÚRGICA EM UM HOSPITAL DO PARANÁ NO ANO DE 2018.....	215
ANSIEDADE COMO CONSEQUÊNCIA DA VIOLÊNCIA SOFRIDA PELOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19	216
Toxicologia	217
DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONADO PARA OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA DE COCAÍNA EM FLUÍDO ORAL	218
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Citrus limonia</i> , <i>Citrus sinensis</i> E <i>Citrus limon</i> CONTRA <i>Aspergillus flavus</i>	219

Resumo expandido

Desafios das doenças virais emergentes

ISOLADOS EM URINA DE PACIENTES INTERNADOS POR COVID-19 EM UTI RESPIRATÓRIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DE MARINGÁ

Carlos José Martins Pena¹, Bruno Buranello da Costa², Danielle Rosani Shinohara³, Daniela Renata Faria³, Erika Seki Kioshima Cotica⁴, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁴, Maria Cristina Bronharo Tognim⁵

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

²Bioquímico, Hospital Universitário Regional de Maringá, Maringá, PR

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

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

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

e-mail: carlosjmpena@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Desde o primeiro caso de COVID-19, doença causada pelo coronavírus 2019 (SARSCoV-2), a doença já afetou mais de 197,8 milhões de pessoas e causou mais de 4 milhões de mortes em todo o mundo (1). Devido à gravidade do comprometimento pulmonar, muitos pacientes precisaram de hospitalização em unidades de terapia intensiva (UTI), aumentando em vários países, incluindo o Brasil, a demanda de leitos especializados no atendimento de síndrome respiratória grave. Assim, na maioria dos países, incluindo o Brasil, a demanda por um leito de UTI especializado em pacientes com síndrome respiratória grave aumentou (2).

O cenário emergencial trouxe vários desafios incluindo a demanda por profissionais da saúde especializados no tratamento do paciente crítico. A inclusão de novos leitos exigiu a contratação de recursos humanos especializados, e este é um ponto de destaque como uma das fragilidades para o aumento da mortalidade, inclusive atribuída às infecções secundárias à COVID-19 (2). A necessidade emergencial, tanto para a abertura de novos leitos de UTI, quanto para a contratação de pessoal, pode ter levado à contratação de equipe não especializada, o que tem sido determinado como um dos fatores responsáveis pelo aumento e disseminação de infecções bacteriana e fúngicas secundárias ao COVID-19 (3).

A implementação de diversos sistemas de controle de infecção e medidas de prevenção, incluindo uso de máscara, boas práticas de higiene das mãos, distanciamento social, identificação dos ativos e quarentena de contatos próximos foram medidas agressivas de manejo em resposta ao COVID-19 e que trouxeram benefícios adicionais em termos de redução de outras infecções. Além disso, o uso de múltiplos medicamentos, incluindo os agentes antimicrobianos e o uso de dispositivos médicos para os pacientes críticos, pode contribuir para o aumento da incidência de resistência antimicrobiana, que pode ser atribuída ao uso excessivo de agentes antimicrobianos durante a pandemia COVID-19 (4).

Entre as infecções secundárias mais comuns nos pacientes com COVID-19, destacam-se as infecções respiratórias seguidas das infecções de corrente sanguínea, sendo principalmente as respiratórias abordadas inclusive em artigo de revisão (3). Adicionalmente, o acometimento renal e o uso de sondas vesicais, são fatores de risco para infecções secundárias no trato urinário, aspecto este pouco avaliado na literatura (2). Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as principais infecções secundárias no trato urinário de pacientes positivos para SARS-CoV-2 hospitalizados na Unidade de Terapia Intensiva Respiratória do Hospital Universitário de Maringá (HUM) e, também avaliar o desfecho destas infecções nos pacientes afetados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No período de junho de 2020 a junho de 2021 foram internados na UTI Respiratória do HUM 524 pacientes críticos adultos (≥ 18 anos) por COVID-19, dos quais 44 apresentaram positividade

microbiológica na urina (bactérias e/ou fungos). Todos os pacientes foram diagnosticados para COVID-19 através de teste *Xpert Xpress SARS-CoV-2*, um teste de RT-PCR (reação da cadeia da polimerase) em tempo real que se destina à detecção qualitativa de ácido nucléico do SARS-CoV-2 colhido por swab nasofaríngeo. Caso crítico COVID-19 foi definido por insuficiência respiratória como frequência respiratória ≥ 30 por minuto, oximetria de pulso $\leq 93\%$ ou $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg, necessidade de ventilação invasiva, sinais de choque circulatório ou falência de outros órgãos em que seria necessário cuidados em UTI. Infecção secundária foi diagnosticada quando o paciente tinha sintomas clínicos infecciosos 48 horas após a admissão na UTI ou evidência radiológica pulmonar positiva ou cultura com agente etiológico identificado.

Os isolados clínicos recuperados das urinas foram identificados no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do HUM. Para isolados bacterianos, a identificação e o teste de sensibilidade aos agentes antibacterianos foram feitos pelo sistema automatizado BD *Phoenix*TM. Em relação aos isolados fúngicos, a identificação da espécie das leveduras foi também realizada pelo sistema automatizado BD *Phoenix*TM, porém, a identificação dos fungos filamentosos assim como o antifungograma (quando solicitados pelo médico) foi realizado pelo setor de Micologia clínica da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI).

Variáveis incluídas foram idade, sexo, necessidade de hemodiálise, Proteína C Reativa (PCR), dois escores de gravidade, *Sequential Organ Failure Assessment Score* (SOFA) e *Simplified Acute Physiology Score 3* (SAPS3), Diabetes e Hipertensão Arterial foram identificadas como doença pré-existente. Todos os pacientes receberam cateterismo vesical de demora. O desfecho primário foi óbito ou alta da UTI para enfermaria. Pacientes pediátricos foram excluídos deste estudo. O presente 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

Um total de 524 pacientes com COVID-19 foram admitidos na UTI em virtude por falência respiratória. Destes, apenas 44 (8,3%) pacientes apresentaram patógenos isolados em urina. O coeficiente de prevalência de isolados em urina em pacientes críticos por COVID-19 foi de 8,3 pacientes para cada 100. Metade dos pacientes eram do sexo feminino com idade média 59,5 anos (29 a 81 anos), 65% eram hipertensos e 54% diabéticos, 32% necessitaram de hemodiálise.

Odds Ratio (OR) e Razão de Prevalência (RP) foram calculadas para as variáveis Diabetes, Hipertensão Arterial e Diálise comparadas para desfecho alta e óbito e todas obtiveram valores semelhantes e baixos mostrando que são variáveis independentes e não tem relação com óbito.

Entre os microrganismos identificados nestes pacientes destacamos as espécies de *Candida*, seguida do *Enterococcus faecium*. Os pacientes que apresentaram apenas um microrganismo isolado somente em urina (Tabela 1), constatamos quatro pacientes com *Candida albicans* (50% de mortalidade, 2 homens, 58 e 29 anos), três com *C. tropicalis* (média de idade 67.4 anos, 100% de mortalidade), três com *C. tropicalis* (média de idade 67.6 anos, 2 diabéticos, 100% de mortalidade), um com *C. glabrata* (feminina, diabética, hipertensa, necessitou diálise, óbito), dois com *E. faecium* (média de idade 69 anos, 1 diabético, alta da UTI) e um *Klebsiella pneumoniae* (masculino, 71 anos, hipertenso, necessitou diálise, óbito). No entanto, a análise de critérios de gravidade (SOFA e SAPS 3 %) não mostrou correspondência entre os desfechos.

Para os pacientes que apresentaram associação de dois patógenos apenas na urina, constatamos um *Acinetobacter baumannii* + *Trichosporon sp* (masculino, 43 anos, diabético, necessitou de diálise e óbito), um *C. albicans* + *C. krusei* (feminina, 30 anos, sem comorbidades, óbito), dois *C. albicans* + *C. tropicalis* (2 óbitos, masculino, 61 anos, hipertenso e diabético e feminino, 49 anos, sem comorbidades), três *C. albicans* + *E. faecium* (1 masculino, 63 anos, diabético, hipertenso, necessitou de diálise e alta e dois femininos, 72 e 65 anos, ambos diabéticos, ambos óbitos), dois *C. albicans* + *C. glabrata* (1 feminina 61 anos hipertensa, diabética e óbito e 1 masculino 55 anos hipertenso, diabético e alta da UTI), um *E. faecium* + *Klebsiella pneumoniae* (feminina 81 anos, hipertensa, diabética, necessitou de diálise e óbito), um *C. glabrata* + *E. faecium* (feminino, 63 anos, hipertensa e alta), dois *C. glabrata* + *K. pneumoniae* (feminina, 81 anos, óbito e feminina, diabética, 61 anos e alta), um *K. pneumoniae* + *E. faecium* + *A. baumannii* (62 anos, feminina, hipertensa e alta). Nesta condição, a análise de critérios de gravidade (SOFA e SAPS 3 %) também não mostrou correspondência entre desfechos.

Tabela 1. Patógenos isolados em urina (únicos ou múltiplos) conforme características clínicas, critérios de gravidade e desfecho

Urocultura	Desfecho	Nº de isolados	Sexo (N)	Idade (Média)	Comorbidade (N)	DI (Média)	PCR (Média)	SOFA (Média)	SAPS3% (Média)
<i>C. albicans</i>	Alta	2	F (2)	59	DM (1)	39,5	34,5	13	46
	Óbito	2	M (2)	43,5	DM (1), HAS (1)	18,5	6,5	5,5	3,6
<i>C. albicans</i> <i>C. krusei</i>	Óbito	1	F(1)	30	-	27	16	10	46,2
<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	Óbito	2	F(1) M (1)	55	DM (1), HAS (1)	30,5	13,3	7	19,9
<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Alta	1	M (1)	55	DM (1), HAS (1)	43	38	37	20,5
	Óbito	1	F(1)	61	DM (1), HAS (1)	12	12	9	12,1
<i>C. albicans</i> <i>E. faecalis</i>	Alta	1	M (1)	63	DM (1), HAS (1)	46	8	9	70,7
	Óbito	2	F(2)	68,5	DM (2), HAS (1)	21,5	29,5	11	30,1
<i>C. glabrata</i>	Óbito	1	F(1)	71	DM (1), HAS (1)	28	8	16	94,1
<i>C. glabrata</i> <i>E. faecalis</i>	Alta	1	F(1)	63	HAS (1)	61	5	3	9,9
<i>C. glabrata</i> <i>K. pneumoniae</i>	Alta	1	F(1)	66	DM (1), HAS (1)	27	5	6	33,5
	Óbito	1	F(1)	81	-	17	3	9	50,4
<i>C. tropicalis</i>	Óbito	3	F(2) M (1)	67,7	DM (2), HAS (3)	28,3	19	9	39,5
<i>E. faecalis</i>	Alta	2	F(1) M (1)	69	DM (1), HAS (2)	19	24	6	16,1
<i>E. faecalis</i> <i>K. pneumoniae</i>	Óbito	1	F(1)	81	DM (1), HAS (1)	28	8	16	94,1
<i>K. pneumoniae</i>	Óbito	1	M (1)	48	HAS (1)	15	36	2	4,5
<i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i> <i>E. faecalis</i>	Alta	1	F(1)	62	HAS (1)	19	20	7	31,5
<i>Trichosporun</i> <i>A. baumannii</i>	Óbito	1	M (1)	43	DM (1)	37	24	7	77,6

F: feminino; M: masculino; DM: diabetes melito; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DI: dias de internação; SOFA e SAPS3 (%): critérios de gravidade; PCR: proteína C reativa; para N > 1, valores serão médias.

Na tabela 2 é possível observar os patógenos isolados de dois sítios anatômicos: urina e/ou traquéia com uma coorte de 19 pacientes. Dos OITO que apresentaram desfecho óbito, SETE possuíam fungo na urina (2 com *C. glabrata*, 2 com *C. tropicalis* e 3 com *C. albicans*) e apresentaram altos valores de proteína C reativa e SAPS 3.

Dos QUINZE pacientes que apresentaram isolados em sangue e urina, e quanto ao desfecho 9 apresentaram alta e 6 foram a óbito. Somente três pacientes apresentaram o mesmo microrganismo em sangue e urina: a) uma mulher diabética de 54 anos, com 81 dias internada na UTI e apresentou *A. baumannii* com desfecho alta; b) um homem hipertenso de 61 anos com 44 dias na UTI e apresentou somente *C. albicans* no sangue e, mas que possuía *C. tropicalis* associada a *K. pneumoniae* no sangue e na urina, com desfecho: óbito e c) homem de 74 anos com *Candida glabrata* no sangue e na urina. Um paciente apresentou patógenos nos três sítios: mulher idosa de 71 anos, hipertensa, que necessitou de hemodiálise e isolados *C. glabrata* na urina, *Staphylococcus epidermidis* no sangue e *Burkholderia cepacia* + *K. pneumoniae* na traquéia e, após 71 dias de UTI, apresentou desfecho alta.

Tabela 2. Patógenos isolados em urina, sangue e/ou aspirado traqueal conforme característica clínica, laboratorial e desfecho.

Urocultura	Hemocultura	Aspirado traqueal	Sexo	Idade	COM	HM	DI	PCR	SOFA	SAPS3	Desfecho
<i>A. baumannii</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	M	35	-	-	19	2	12	49	Alta
<i>A. baumannii</i>	-	<i>A. baumannii</i>	M	36	-	SIM		16	3	24	Alta
<i>A. baumannii</i> <i>C. albicans</i>	<i>A. baumannii</i>	-	F	54	DM	-	81	3	7	40	Alta
<i>C. albicans</i>	<i>S. haemolyticus</i>	-	M	62	-	-	50	21	8	49	Óbito
<i>C. albicans</i>	-	<i>A. baumannii</i> <i>Chriseobacterium</i>	F	47	HAS	SIM	11	30	9	69	Óbito
<i>C. albicans</i>	-	<i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S aureus</i>	F	33	HAS	-	41	20	4	29	Óbito
<i>C. albicans</i> <i>E. faecalis</i>	<i>S. capitis</i>	-	M	47	HAS, DM	SIM	47	35	3	42	Alta
<i>C. glabrata</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cepacia</i> <i>K. pneumoniae</i>	F	71	HAS	SIM	71	29	2	45	Alta
<i>Ctropicalis</i>	<i>A. baumannii</i> <i>K. pneumoniae</i>	-	M	58	HAS, DM	SIM	104	17	4	37	Alta
<i>Ctropicalis</i>	<i>A. baumannii</i>	-	M	81	-	SIM	24	2	3	52	Óbito
<i>C. tropicalis</i> <i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	-	M	61	HAS	-	44	33	12	77	Óbito
<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	-	M	58	DM	SIM	8	8	4	44	Óbito
<i>C. glabrata</i>	<i>S. aureus</i>	-	M	66	HAS, DM	-	53	40	14	80	Óbito
<i>C. glabrata</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-	F	64	HAS, DM	SIM	48	14	11	66	Alta
<i>C. glabrata</i> <i>E. faecalis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	F	70	HAS, DM	-	7	9	6	64	Alta
<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. glabrata</i>	-	M	74	HAS, DM	-	21	8	16	86	Óbito
<i>P. aeruginosa</i>	-	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i>	M	70	HAS, DM	SIM	104	30	13	83	Alta
<i>P. aeruginosa</i> <i>C. glabrata</i>	<i>E. faecium</i>	-	M	69	HAS	SIM	41	8	8	49	Alta
<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	-	M	49	-	-	70	7	10	78	Alta

F: feminino; M: masculino; DM: diabetes melito; HAS: hipertensão arterial sistêmica; COM: comorbidades; HM: necessidade de hemodiálise; DI: dias de internação; SOFA e SAPS3 (%): critérios de gravidade; PCR: proteína C reativa.

4. DISCUSSÃO

A pandemia da COVID-19 foi responsável por sobrecarregar o sistema de saúde do mundo todo uma vez que casos graves necessitam de cuidados em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). A sobreposição de imunossupressão, existência de co-morbidades e a exposição ao ambiente hospitalar tornam o paciente crítico propenso a infecção e/ou co-infecção por diferentes patógenos oportunistas.

Avaliar as infecções secundárias por bactérias ou fungos em pacientes COVID-19 são de extrema importância uma vez que podem impactar no tratamento, manejo e desfecho para esses pacientes. Desta forma, aqui reportamos, de maneira inédita, os microrganismos envolvidos em infecções urinárias em pacientes hospitalizados com COVID-19 bem como suas consequências.

Durante a pandemia muitos hospitais tiveram que lutar com limitações de espaço físico, disponibilidade restrita de pessoal, escassez de equipamentos de proteção individual e um afluxo de grande número de pacientes comprometendo a qualidade do trabalho (2). De maneira similar nossa UTI específica para pacientes COVID-19 positivos, foi criada de modo emergencial com aproveitamento de uma área isolada do hospital, onde novos equipamentos foram instalados e novos profissionais contratados. O treinamento inicial ocorreu de forma rápida e os profissionais visavam muito a autoproteção e não estavam preparados e atentos para a possibilidade de disseminação de outros patógenos diferentes do SARS-CoV-2 que pudessem estar presente nos pacientes infectando ou colonizando ou no ambiente. Todos estes fatores aliados a carga de trabalho exaustiva, medo de se contaminarem fizeram com que os trabalhadores desta unidade aplicassem medidas para se proteger principalmente, reduzindo o cumprimento das precauções de higiene e aumentando o risco de contaminação cruzada. No entanto, mais investigações serão necessárias para quantificar o impacto dos fatores discutidos acima.

Neste estudo retrospectivo de coorte, relacionado aos cuidados críticos de internados por COVID-19, encontramos uma prevalência de aproximadamente 8% de microrganismos isolados em urina. Um ponto interessante observado foi uma maior prevalência de fungos e bactérias Gram-positivas. Ramadan et al. estudou 260 pacientes com COVID-19, e aproximadamente 10,7% dos pacientes apresentaram infecções bacterianas ou fúngicas, entre os quais a *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae* e a *Acinetobacter baumannii* foram as bactérias predominantemente isoladas, seguidos de *Candida glabrata* e a *C. albicans*, corroborando os resultados encontrados neste estudo (5). É importante destacar, que o predomínio de leveduras isoladas da urina dos pacientes COVID-19 foi um dado surpreendente obtido neste estudo.

Os dados apontam que não apenas as espécies da microbiota residente, como a *C. albicans*, estiveram presentes nestes pacientes, mas também importantes espécies como a *C. tropicalis*, que se destaca por seu alto perfil de virulência e capacidade de formação de biofilmes em superfícies abióticas. A *C. glabrata*, que apesar de possuir baixa virulência, possui baixa sensibilidade ao fluconazol, o azólico mais utilizado em hospitais de maneira profilática ou terapêutica. Apesar das análises não correlacionarem a presença da *Candida* na urina com o desfecho óbito, é possível observar que dos 7 pacientes, que foram a óbito neste estudo, apenas 1 não apresentava infecção por *Candida* spp. Hughes et al., reportaram três episódios de candidemia em uma coorte de 836 pacientes com COVID-19, sendo todos causados pela *C. albicans* (6). Assim, o nosso estudo é relevante, uma vez que com uma pequena coorte foi possível relatar um caso de Candidemia por *C. glabrata*, um patógeno oportunista que vem ganhando destaque. Um destaque também deve ser dado a alta mortalidade nos pacientes que apresentaram *C. tropicalis* em infecções do trato urinário sem uma outra co-infecção em outro sítio, falando a favor da grande virulência desta espécie.

Temos, no entanto, que citar algumas limitações como tamanho da amostra, a falta de dados clínicos que poderiam influenciar no desfecho desses pacientes. No entanto, é possível concluir a elevada mortalidade verificada nestes pacientes com infecções urinárias por fungos e/ou bactérias pode ter sido devido à presença destas co-infecções que impactaram vários pontos do manejo e desfecho desses pacientes COVID-19.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos pelo estudo nos permitem concluir que a pandemia causada pelo COVID-19 trouxe desafios aos serviços de saúde inclusive para o hospital avaliado neste estudo, onde a falta de treinamento do pessoal contratados para a UTI-COVID-19 no controle de infecções associadas pode ter impactado no número de co-infecções, incluindo as do trato urinário, e que o grande número de infecções fúngicas dificultaram o tratamento, manejo e desfecho dos pacientes COVID-19 com estas co-infecções.

FINANCIADORES

CAPES

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Coronavirus disease (COVID-19) weekly epidemiological update. [Acesso em 4 ago 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>
2. Westblade LF, Simon MS, MS, Satlin MJ. Bacterial coinfections in coronavirus disease 2019. Trends Microbiol. 2021 Apr.
3. Yang S, Hua M, Du C, Pu L, Xiang P et al. Bacterial and fungal co-infections among COVID-19 patients in intensive care unit. Microbes Infect. 2021;23(4-5):104806.
4. Lai CC, Chen SY, Ko WC, Hsueh PR. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic, Int J Antimicrob Agents. 2021 Apr; 57(4):106324.
5. Ramadan HK, Mahmoud MA, Aburhama MZ, Elkhawaga AA, El-Mokhtar MA, Sayed IM et al. Predictors of Severity and Co-Infection Resistance Profile in COVID-19 Patients: First Report from Upper Egypt. Infect Drug Resis. 2020 Oct; 13:3409-22.
6. Hughes S., Troise O., Donaldson H., Mughal N., Moore L.S.P. Bacterial and fungal coinfection among hospitalised patients with COVID-19: A retrospective cohort study in a UK secondary care setting. Clin Microbiol Infect. 2020 Oct;26(10):1395-99.

Palavras-chave: co-infecções; COVID-19; infecções do trato urinário.

NATURAL HISTORY OF EMERGING ZIKA AND SARS-COV-2 VIRUSES IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM: A SYSTEMATIC REVIEW

Fabricio Morelli¹, Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles¹, Maria Vitória Felipe de Souza², Natalia Lourenço Mari², Cristiane Suemi Shinobu-Mesquita⁴, Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke³, Edilson Damke³, Vânia Ramos Sela da Silva⁴, Raquel Pantarotto Souza⁴, and Marcia Edilaine Lopes Consolaro⁴

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

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

³Doutores, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

e-mail:fahmorelli@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Viral diseases are a colossal threat to the human and animal populations. Outbreaks of emerging viral diseases have grown rapidly in recent years and have had a major impact on human life, leading to sudden increases in mortality rates (1). Unimaginable just a few months ago, the ongoing COVID-19 pandemic has rocked our entire planet, quickly challenging past assumptions and future certainties (2). In this context, the causes of acute febrile illness (AFI) in Latin America are diverse and include emerging viruses. Among the viruses transmitted by arthropods, also known as arboviruses, they are among the main etiological agents responsible for AFI in Latin America (3). Zika flavivirus (ZIKV) is predominantly transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. It quickly spread for the first time across the Western Hemisphere, being present in over 40 countries (4). Due to its relationship with microcephaly and other neurological syndromes, the World Health Organization (WHO) declared on 02/01/2016 that the ZIKV outbreak in the Americas represented an emergency of international importance in Public Health (5, 6). This tropical disease was neglected before 2015 and its natural history remains poorly understood. A growing body of evidence points to the sexual transmission of ZIKV. In this sense, on 07/15/2016, the first case of sexual transmission of ZIKV infection from women to men was documented in New York City/USA (7, 8). However, little is known about the pathophysiology of vaginal ZIKV infection. Thus, more studies are necessary to help answer the following questions: How long does the vaginal secretion remain infectious? What is the prevalence of ZIKV in the cervix and vagina? Can asymptomatic women transmit the virus? What are the consequences on the female genital system for women who have had ZIKV infection? Answers to these questions are crucial to establishing recommendations for the management of pregnant and non-pregnant women with ZIKV.

Additionally, as a major complicator to determine the etiology and possible complications of AFI in Latin America, SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), responsible for the COVID-19 pandemic, arrived in the region on February 25, 2020 (9). Clinically, COVID-19 presents a myriad of possible symptoms, from asymptomatic, mild flu-like symptoms including cough, fever, general weakness, myalgia, to pneumonia-like symptoms and respiratory failure may require mechanical ventilation (10). SARS-CoV-2 has a strong ability to interact with the angiotensin 2 converting enzyme (ACE2) that is present in the testes, ovaries, uterus and vagina, raising the urgent issue of potential sexual transmission of COVID-19 and possible consequences of the infection for reproductive health (11). Reinforcing these issues, SARS-CoV-2 RNA was also detected in blood, urine, anal swabs, semen and vaginal secretions, as well as in oropharyngeal materials, showing other potential means of transmission (10-13). However, despite being a plausible hypothesis, so far, there are no reports of sexual transmission of SARS-CoV-2.

Together, ZIKV and SARS-Cov-2 represent emerging viruses of great importance for Latin America and the world. Therefore, studying the pathophysiology, viral load and duration of two important emerging causes of acute febrile illness including ZIKV and SARS-Cov-2 in the male and female

reproductive system at different stages of infections will contribute to the elucidation of viral kinetics, the possibility of sexual transmission and the influence of these infections on reproductive health. We have therefore focused this review on two narratives that have been little reported, the first on the FGT of non-pregnant women and animals regarding positivity, persistence and the influence of ZIKV infections on health and fertility and the second narrative an overview of the potential threat of SARS-CoV-2 in the non-pregnant male and female reproductive tract with COVID-19 threat to fertility and sexual transmission.

2. METHODS

Two systematic reviews based on the PRISMA statement were performed, a first study to identify the studies "Zika virus" and "non-pregnant female" and a second review focused on "Coronavirus" and "male and female genital tract", conducted in PubMed, Embase, Scopus Scholar and Web of Knowledge (WOK) databases. The inclusion criteria for the articles were publications in English, excluding reviews, with no restrictions as to the starting date, the first article being publications until August 2019, and the second article, until July 2020. Exclusion criteria were used from reading the titles, abstract and full peer-reading. The first review resulted in 36 articles that met the inclusion criteria, while the second review resulted in a total of 28 studies selected for this study.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. ZIKV

3.1.1. ZIKV kinetics in FGT of non-pregnant women

Prisant et al. (2016) (13) showed positive real time polymerase chain reaction (PCR-RT) results for vaginal, cervical and endocervical samples 3 days after the onset of symptoms, on the eleventh day of symptoms it was positive only in cervical mucus, and negative for blood and urine. According to the authors, the persistence of viral RNA in the vaginal and endocervical samples is of major importance in view of the risk of mother-to-fetus vertical transmission. Penot et al. (2017) (14) followed a patient and on the third day after the onset of symptoms plasma, urine, and vaginal secretion samples were positive for ZIKV, with the highest viral load in the urine. Ten days after the onset of symptoms all samples were negative. This suggests a short period of ZIKV infection present in the female genital tract. Cruz et al. (2019) (15) described a case report in which a patient tested positive 31 days after infection, both in vaginal secretion and in the endocervical sample. Filho et al. (2019) (16) reported a case of upper genital tract, a patient submitted to *in vitro* fertility, with symptoms of ZIKV, the oocytes were aspirated, and 2 oocytes were positive for ZIKV. It is unanimous that FGT is the place in which ZIKV RNA has been mostly detected, and in some cases for relatively long periods, even after the clearance from blood and urine. Thus, it is possible that FGT can also act as a sanctuary for ZIKV survival, allowing and extending the risk of sexual transmission. However, regarding upper genital tract (UGT), further studies are needed to determine the current infection rate, as well as the kinetics of ZIKV infection.

3.1.2. *In vivo* ZIKV models in FGT of non-pregnant non-human primates (NHPs)

Haddow et al. (2017) (17) developed a sexual transmission risk model to study infection after intercourse by inoculating ZIKV into the vaginal and rectal canal of adult monkeys. This study demonstrated that sexual transmission of ZIKV intravaginally and intrarectally is possible, indicating sexual intercourse as a mechanism of viral transmission in the absence of mosquitoes can possibly introduce the disease into non-epidemic areas. However, this study did not contribute to the understanding of ZIKV infection in FGT, as the presence of the virus in both lower genital tract (LGT) and UGT was not assessed.

3.1.3. *In vivo* ZIKV in FGT of non-pregnant small animals

In studies using *in vivo* non-pregnant small animal model, they used immunocompetent mice to facilitate ZIKV infection. Scott et al. (2018) (18) was able to detect from day one to day nine after infection, the virus in the lower and upper tract of the rats, mainly in the cervical region, and after day ten the virus was all eliminated. Caine et al. (2019) (19) observed no excessive damage and persistence in the ovaries of mice infected with ZIKV, nor long-term effects on fertility.

3.1.4. *In vitro* ZIKV cellular models in FGT studies

In vitro studies by Chen et al. (20), demonstrated the susceptibility of uterine fibroblast cells to ZIKV infection, thus the uterus may act as a viral pathway during sexual intercourse. Amerson-Brown et al. (21) used a multilayered cell culture model of the human vaginal microbiota and after infection the cells supported replication of the virus before it even reached the basal layer and was systematically released.

3.2. SARS-CoV-2

3.2.1. Different models of SARS-CoV-2 transmission

In addition to the most common spreads the possibility of spread through other modes is continually being explored, with some studies suggesting spread through the sexual transmission route, vertical transmission from mother to fetus, and asymptomatic carriers. In these contexts, a likely route of transmission could be through sexual intercourse (22). In support of this hypothesis, coronaviruses are known to have caused damage to multiple organs, including inflammation of the testicles/human orchitis. Coronaviruses are also known to cause defects in spermatogenesis, and SARS-CoV-2 RNA has been detected in semen and vaginal secretion. In addition to the impact of sexual transmission of SARS-CoV-2, the possible influence of sexual transmission to pregnant women should also be considered (23). The authors concluded that vertical transmission of COVID-19 could not be ruled out, and further studies should be conducted on this topic.

3.2.2. SARS-CoV-2 and its human host receptor

SARS-CoV-2 has four structural proteins, the main one being spike (S), which is required to fuse to the host cell through the receptor-binding domain, is indispensable for virus receptor-cell interactions during viral entry. SARS-CoV-2 through the S protein, binds to the human ACE2 receptor and utilizes the cellular transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) for S protein Priming, and invades the host cell. In theory, organs with high expression of ACE2 or TMPRSS2 are more vulnerable to infection. Currently, the respiratory, cardiovascular, digestive, and urinary systems have been reported as potential target organs for SARS-CoV-2 infection. Organ- and cell-specific expression of ACE2 implies its regulatory role in cardiovascular, kidneys and fertility. Regarding fertility, ACE2 expression in ovaries and testes suggests that it plays a regulatory role in steroidogenesis, thus affecting germ cells and reproductive health (24).

3.2.2.1. SARS-CoV-2 and the human male Reproductive tract - Angiotensin-converting enzyme 2 in the human male reproductive tract.

The presence of ACE2 receptors in the testis was already known ten years ago, in the Leydig cells, being highly expressed, other sites have been studied, such as the Sertoli cells, the spermatogonia, and the seminiferous duct. Stanley et al. (2020) (12) found no direct expression of ACE2 and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection, ACE2 expression alone is sufficient for the testis to become susceptible. Song et al. (2020) (25) on the high expression of TMPRSS2 and low expression of ACE2 in accessory glands, hypothesizing that the prostate may be a second site of Coronavirus infection in the male reproductive tract. Shen et al. (2020) (11) evaluated the pathophysiology of germ and somatic cells (Leydig, Sertoli, stem and spermatogenic cells) and ACE2 expression, noting that infertile men or those with some disorder would be more likely to become infected by SARS-CoV-2. ACE2 has an important relationship with age, ACE2 expression decreases in cells as age increases, indicating that young men are more likely to be infected with SARS-CoV-2.

3.2.2.2. SARS-CoV-2 and the human male Reproductive tract - SARS-CoV-2 positivity in the human male reproductive tract.

A previous study suggested that SARS-CoV could cause orchitis, however, little is known about the presence of SARS-CoV-2 in biological fluids and tissues of the male genital tract and its possible relationship to reproductive health. Some studies have shown the virus in semen, Yang et al. (2020) (26) observed significant seminiferous tubular lesions, reduced Leydig cells, and mild lymphocytic inflammation, but only in some patients in a "post-mortem" study. Other authors did not detect the presence of the virus in any of the tests performed, but the studies varied according to COVID-19 stage and severity of infection. Regarding studies involving semen parameters, Holtmann et al. (2020) (27) did not detect the virus but observed a decrease in sperm concentration per ejaculate, decreased motility compared to the control group.

3.2.2.4. SARS-CoV-2 and the nonpregnant female Reproductive tract - Angiotensin-converting enzyme 2 in the reproductive tract of nonpregnant women.

Correlation between SARS-CoV-2 infection and the non-pregnant female reproductive tract, Reis et al. (2020) (28) found ACE2 mRNA transcripts in the ovary of reproductive and postmenopausal women, Jing et al. (2020) (29) found ACE2 in the uterus and vagina, abundantly expressed in the ovary and oocytes, and the only study that evaluated ACE2 expression in the lower reproductive tract of non-pregnant women. Other authors found ACE2 mRNA in the uterus (epithelial and stromal cells), more in the secretory than in the proliferative phase. SARS-CoV-2 is able to invade these cells and cause pathological manifestations. ACE2 varies greatly in its expression in cells throughout the cycle, whereas TMPRSS2 does not change. Regarding ACE2 and age, the expression of ACE2 increases as age increases. In general, most of the studies discussed in this section indicated that the upper reproductive

tract of nonpregnant women is vulnerable to SARS-CoV-2 infection mainly because of its ACE2 expression in the ovary and uterus, albeit its role needs to be better clarified.

3.2.2.5. SARS-CoV-2 and the nonpregnant female Reproductive tract - SARS-CoV-2 positivity in the reproductive tract of nonpregnant women.

Investigation on vaginal samples, Scorzoloni et al. (2020) (22) followed up a patient who traveled to Wuhan city at the beginning of the pandemic period, and after two previous negative results, a vaginal swab was positive for PCR-RT on days 7 and 20 after the onset of symptoms (cycles 32.9 and 37.2). Qiu et al. (2020) (30) followed the patients between days 17 and 40 after the onset of symptoms and no virus was detected. In addition, the finding about the SARS-CoV-2 detection in the vaginal secretion increases the possibility that sexual intercourse could be an additional direct vector of infection.

4. CONCLUSION

There are variations regarding the presence and persistence of the virus in genital samples. However, it is consensual that FGT is the place in which ZIKV RNA has been detected, even after clearance from blood and urine and so far little is known about the effect of ZIKV on female reproductive health. There is no consensus regarding the presence of the ACE2 receptor and the virus in the male and non-pregnant female reproductive tracts and new studies are necessary to establish the natural history of SARS-CoV-2 transmission, pathogenesis, and detection in the reproductive tracts.

FINANCIADORES

CAPES, CNPq and Fiocruz

AGRADECIMENTOS

We are grateful to the collaborators of the Laboratory of Clinical Cytology and ISTs at the State University of Maringá

REFERENCES

1. Jansi RS, Khusro A, Agastian P, Alfarhan A, Al-Dhabi NA, Arasu MV, et al. Emerging paradigms of viral diseases and paramount role of natural resources as antiviral agents. *Science Total Environment* 2020; Nov 7:143539.
2. Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HÁ. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. *Pathogens* 2020 .9: 186.
3. Moreira J, Bressan CS, Brasil P, Siqueira AM. Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. *Clin Microb Infection* 2018; Aug;24:827-35.
4. Brasil P, Pereira Jr JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375:2321-34.
5. Pan American Health Organization. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015 - 2018: cumulative cases - [cited 2021 July 20]. Available from: <https://www.paho.org/en/node/60231>
6. Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:653-60
7. D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N Engl J Med*. 2016;374:2195-8.
8. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika virus in body fluids: final report. *N Engl J Med*. 2018;379:1234-43.
9. World Health Organization, 2021. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Edition 49. Geneva, Switzerland: WHO. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-july-2021>. Accessed July 23, 2021.
10. Kim GU, Kim MJ, Ra SH, Lee J, Bae S, Jung J, Kim SH. Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. *Clin Microbiol Infect* 2020.26: 948–951.
11. Shen Q, Xiao X, Aierken A, Liao M, Hua J. The ACE2 expression in sertoli cells and germ cells may cause male reproductive disorder after SARS-CoV-2 infection. *J Cell Mol Med* 2020.24: 9472–9477
12. Stanley KE, Thomas E, Leaver M, Wells D. Coronavirus disease (COVID-19) and fertility: viral host entry protein expression. in male and female reproductive tissues. *Fert Steril* 2020.114: 33–43.

13. Prisant N, Bujan L, Benichou H, Hayot PH, Pavili L, Lurel S, et al. Zika virus in the female genital tract. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:1000-1.
14. Penot P, Brichler S, Guilleminot J, Lascoux-Combe C, Taulera O, Gordien E, et al. Infectious Zika virus in vaginal secretions from HIV-infected woman. *Euro Surveill*. 2017;22:30444.
15. Cruz TE, Souza RP, Pelloso SM, Morelli F, Suehiro TT, Damke E, et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in vaginal and endocervical samples from a Brazilian woman, 2018. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100:183-6.
16. Filho EA, Facio CL, Machado-Paula LA, Oliveira MA, Martinhago CD, Araujo LP, et al. Case report of Zika virus during controlled ovarian hyperstimulation: results from follicular fluid, cumulus cells and oocytes. *JBRA Assist Reprod*. 2019;23:172-4.
17. Haddow AD, Nalca A, Rossi FD, Miller LJ, Wiley MR, Perez- Sautu U, et al. High infection rates for adult macaques after intravaginal or intrarectal inoculation with Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:1274-81.
18. Scott JM, Lebratti TJ, Richner JM, Jiang X, Fernandez E, Zhao H, et al. Cellular and humoral immunity protect against vaginal Zika virus infection in mice. *J Virol*. 2018;92:e00038-18.
19. Caine EA, Scheaffer SM, Broughton DE, Salazar V, Govero J, Poddar S, et al. Zika virus causes acute infection and inflammation in the ovary of mice without apparent defects in fertility. *J Infect Dis*. 2019;220:1904-14.
20. Chen JC, Wang Z, Huang H, Weitz SH, Wang A, Qiu X, et al. Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. *Int J Infect Dis*. 2016;51:139-40.
21. Amerson-Brown MH, Miller AL, Maxwell CA, White MM, Vincent KL, Bourne N, et al. Cultivated human vaginal microbiome communities' impact Zika and herpes simplex virus replication in ex vivo vaginal mucosal cultures. *Front Microbiol*. 2019;9:3340.
22. Scorzolini L, Corpolongo A, Castilletti C, Lalle E, Mariano A, Nicastrì E. Comment on the potential risks of sexual and vertical transmission of coronavirus disease-19 infection 2. *Clin Infect Dis* 2020;16: ctaa445.
23. Mukhra R, Krishan K, Kanchan T. Possible modes of transmission of novel coronavirus SARS-CoV-2: a review. *Acta Biomed* 2020;91: e2020036
24. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020;181: 271–280.e8.
25. Song H, Seddighzadeh B, Cooperberg MR, Huang FW. Expression of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor, and TMPRSS2 in prostate epithelial cells. *Eur Urol* 2020;78: 296–298.
26. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Resp Med*. 2020;8: 475–481.
27. Holtmann N, Edimiris P, AndreeM, Doehmen C, Baston-Buest D, Adams O. Assessment of SARSCoV-2 in human semen-a cohort study. *Fert Ster* 2020;114: 233–238
28. Reis FM, Bouissou DR, Pereira VM, Camargos AF, dos Reis AM, Santos RA. Angiotensin-(1–7), its receptor mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertil Steril* 2011;95: 176–181.
29. Jing Y, Run-Qian L, Hao-Ran W, Hao-Ran C, Ya-Bin L, Yang G, Fei C. Potential influences of COVID-19/ACE2 on female reproductive system. *Mol Hum Reprod* 2020;26: 367–373.
30. Qiu L, Liu X, Xiao M, Xie J, Cao W, Liu Z, Morse A, Xie Y, Li T, Zhu L. SARS-CoV-2 is not detectable in the vaginal fluid of women with severe COVID-19 infection. *Clin Inf Dis* 2020;71: 813–817.

Palavras-chave: arbovírus; covid-19; reproductive system; reproductive health.

VALIDAÇÃO DA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM POOLS DE AMOSTRAS DE SWAB NASAL

Natalia Teles Pereira¹; Quirino Alves de Lima Neto²; Jeane Eliete Laguila Visentainer².

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

²Docente, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: ntelesp@outlook.com

1. INTRODUÇÃO

O Coronavírus 2 da Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS-CoV-2) é um vírus encapsulado de fita simples (1), sendo o agente causador da doença do coronavírus de 2019 (COVID-19), responsável pelo atual cenário pandêmico representando uma preocupação de saúde pública. A transmissão de humano a humano por meio de gotículas de secreção mucosa e contato direto com a membrana mucosa tornou a contaminação facilitada para a dispersão da doença (2). Em função da evolução técnica na capacidade de detectar a presença do vírus em secreções biológicas, por meio de técnicas de biologia molecular, atualmente é possível monitorar os indivíduos em uma população, quanto a presença do vírus. Essa avaliação é importante tratando-se em fornecer parâmetros técnicos, para que os agentes públicos de saúde possam tomar medidas mais eficientes, quanto às medidas de contenção do vírus (3).

Até o momento, a Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (RT-qPCR), é o método mais apropriado para o diagnóstico de infecções virais, através da detecção do RNA viral em amostras (4,5). No entanto, devido à alta demanda de testes a serem realizados em resposta ao cenário de pandemia, uma vez que, o número de pessoas possivelmente infectadas pelo SARS-CoV-2 é muito grande, torna-se inviável o teste de diagnóstico em todos os indivíduos possivelmente infectados através da técnica de RT-qPCR, seja pela falta de reagentes, equipamentos ou mão de obra qualificada (6). Desta forma, torna-se necessária a busca de uma estratégia que possa suprir as necessidades do diagnóstico em relação à alta demanda de diagnósticos, ao tempo necessário para a testagem das amostras e para o uso limitado de reagentes utilizados.

Estudos demonstram que a metodologia de *group-testing* ou testagem em *pool* de amostras torna-se uma alternativa bastante promissora diante deste cenário, trazendo a possibilidade de testar um número de indivíduos em uma população maior ao mesmo tempo, amenizando o tempo de realização do teste (6–8). Este estudo tem como objetivo validar a metodologia de *group-testing* ou testagem em *pool* de amostras para a detecção do RNA viral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de amostras

Este estudo incluiu 170 indivíduos provenientes do Núcleo Diagnóstico durante o mês de junho de 2020. Para o teste das amostras em *pool*, optou-se pelo anonimato, nenhuma idade, sexo ou qualquer outro identificador pessoal correspondente às amostras foi acessado ou usado durante o teste ou análise. Este estudo não necessitou de comitê de ética por não envolver nenhum dado ou identificador pessoal, apenas amostras totais de RNA. Foram coletados *swab* nasofaríngeos de pacientes por profissionais de saúde capacitados em lugares que participam da rotina de análise do Núcleo Diagnóstico, armazenados em salina e transportados em caixas isotérmicas com gelox ao Núcleo Diagnóstico para a confecção do *pool* de amostras, a realização da extração de DNA e o diagnóstico prévio por meio de RT-qPCR. Após estas etapas, todas as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

2.2. Extração do DNA genômico e confecção do *pool* de amostras

Para confecção dos *pools*, as 10 amostras foram misturadas (mesmo volume de cada amostra) antes do processo de extração do RNA, assim, houve uma extração de RNA para cada amostra individual e uma extração de RNA para a mesma amostra em um *pool* com 10 amostras de *swab* nasofaríngeo (1 positivo e 9 negativos) (Figura 1). Após a extração individual de cada amostra e a análise do diagnóstico, as amostras tiveram o RNA total novamente extraído para a confecção do *pool*

para evitar qualquer risco de degradação do RNA viral em amostras já extraídas, devido ao congelamento e descongelamento de amostras. Foram extraídos um volume de 200µL do *pool* das amostras utilizando o kit QiaAmp Mini Viral RNA (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras positivas foram divididas em três grupos, de acordo com o Ciclo do Threshold (Ct) de cada uma delas, o que reflete diretamente a carga viral, sendo elas: Low (Ct ≥ 24), baixa carga viral; Medium (Ct > 18 e < 24), média carga viral e High (Ct ≤ 18), alta carga viral. As amostras extraídas foram armazenadas no freezer -20°C no Núcleo Diagnóstico até o seu uso, sendo posteriormente transportadas em uma caixa de isopor com gelox ao Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá (LIG-UEM) para a análise.

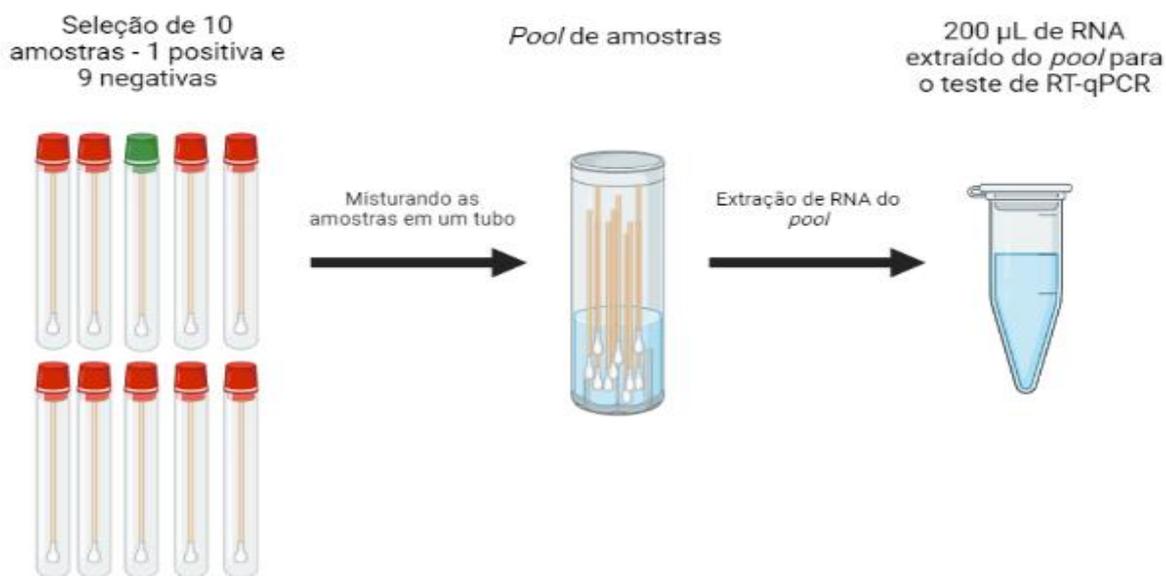


Figura 1. Confeção do *pool* de amostras.

Esquema da confecção do *pool* de amostras. Foram selecionadas 10 amostras previamente diagnosticadas, sendo 1 positiva e 9 negativas. Os *swabs* nasofaríngeos das amostras foram misturados em um tubo e o RNA foi extraído novamente para evitar risco de degradação. Com o RNA extraído do *pool* foi, então, realizado o teste de RT-qPCR para análise de diagnóstico. Fonte: autoral, criando com o BioRender.

2.3. PCR em Tempo Real

A validação foi avaliada através da técnica de RT-qPCR. A reação foi realizada utilizando o reagente QuantiNova Probe RT-PCR Kit (QIAGEN®) e os primers e sondas (Tabela 1), desenvolvidos e propostos pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention) (9), órgão norte-americano responsável pelo controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos. De acordo com o protocolo, a reação de RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2 em *swab* nasofaríngeo utiliza duas sondas (sonda N1 e sonda N2) para partes diferentes do mesmo gene, que codifica a proteína N. Desta forma, sempre são realizadas duas reações por amostra de paciente para detecção do vírus.

Tabela 1. Primers e sondas utilizados na análise de RT-qPCR.

Nome	Descrição	Sequência
2019-nCoV_N1-F	Forward Primer	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'
2019-nCoV_N1-R	Reverse Primer	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'
2019-nCoV_N1-P	Probe	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-3'
2019-nCoV_N2-F	Forward Primer	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'
S 2019-nCoV_N2-R	Reverse Primer	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'
2019-nCoV_N2-P	Probe	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-3'

Nome, descrição e sequência dos *primers* e sondas utilizados na análise de RT-qPCR.

2.4. Análise e validação

As amostras foram analisadas individualmente e misturadas em *pools* de 10 amostras, sendo apenas 1 delas positiva para o SARS-CoV-2. Tanto as amostras individuais quanto os *pools* foram avaliados utilizando duas reações de RT-qPCR, uma com a sonda N1 e outra com a sonda N2. Com a amostra extraída individualmente, podemos considerar que ela passa por um processo de diluição quando misturada em um *pool*. Com a confecção do *pool* misturando 1 amostra positiva a outras 9 amostras negativas, podemos dizer que a amostra positiva foi diluída 10x ou 1:10. Quando realizamos esse tipo de diluição seriada (1:10) em amostras que são analisadas por RT-qPCR, espera-se um valor de 3,3 Ct de diferença de uma diluição para outra, um conceito conhecido matematicamente como *slope* (10,11).

Desta forma, os *pools* foram avaliados em dois aspectos: 1) a possibilidade de detectar o vírus em uma amostra analisada individualmente e em um *pool* com 10 amostras; 2) a diferença de Ct entre a amostra analisada individualmente e a mesma amostra em um *pool* com 10 amostras. Com essas análises, pode-se garantir não apenas a detecção do vírus, mas um valor de Ct para *cut-off* que seja seguro o suficiente, para a obtenção da menor quantidade de falsos negativos possível. A análise de sensibilidade na performance do teste diagnóstico foi calculada por meio do teste qui-quadrado com o auxílio de uma tabela de contingência 2x2.

3. RESULTADOS

Os dados resultantes do RT-qPCR estão descritos na tabela 2. Foram realizadas um total de 340 reações, sendo 170 de amostras individuais (85 com a sonda N1 e 85 com a sonda N2) e 170 dessas mesmas amostras em um *pool* de 10 amostras (85 com a sonda N1 e 85 com a sonda N2). No total, 292 reações tiveram sucesso (146 com a sonda N1 e 146 com a sonda N2), sendo 34 amostras com baixa carga viral (*Low*, Ct \geq 24), 21 amostras de média carga viral (*Medium*, Ct > 18 e < 24) e 19 amostras de alta carga viral (*High*, Ct \leq 18).

A sensibilidade total dos grupos *Low*, *Medium* e *High* foram: 0.87 (%) para a sonda N1 e 0.84 (%) para a sonda N2. A sensibilidade entre os três grupos possuem probabilidades relativamente próximas, sendo a sensibilidade da sonda N1 para o grupo *Medium* de 0.1.

Tabela 2. Resultados obtidos com a validação da detecção do SARS-CoV-2 através de RT-qPCR com o uso de sondas.

	<i>Low</i>				<i>Medium</i>				<i>High</i>			
	Sonda N1		Sonda N2		Sonda N1		Sonda N2		Sonda N1		Sonda N2	
	Acerto	Falha	Acerto	Falha	Acerto	Falha	Acerto	Falha	Acerto	Falha	Acerto	Falha
Teste 1	10	4	10	4	14	0	14	0	10	4	10	4
Teste 2	12	2	12	2	14	0	12	2	14	0	12	2
Teste 3	2	12	2	12	14	0	14	0	14	0	14	0
Teste 4	44	0	44	0								
TOTAL	68	18	68	18	42	0	40	2	38	4	36	6
	n (%)		n (%)		n (%)		n (%)		n (%)		n (%)	
Sensibilidade	0.79		0.79		1.00		0.95		0.90		0.85	
a/(a+c)	0.79		0.79		1.00		0.95		0.90		0.85	

As reações que falharam por motivos diversos estão em VERDE. Em AMARELO está marcada a reação que poderia resultar em um resultado falso negativo, quando uma amostra com uma carga viral muito baixa fosse analisada.

A diferença entre os valores de CT observados entre o *pool* de amostras e as amostras individuais é demonstrada no gráfico 1. As amostras em *pool* tiveram um CT variando de 15.92 à 36.18 ciclos enquanto as amostras individuais variaram de 13.21 à 37.05 ciclos (P=0.92).

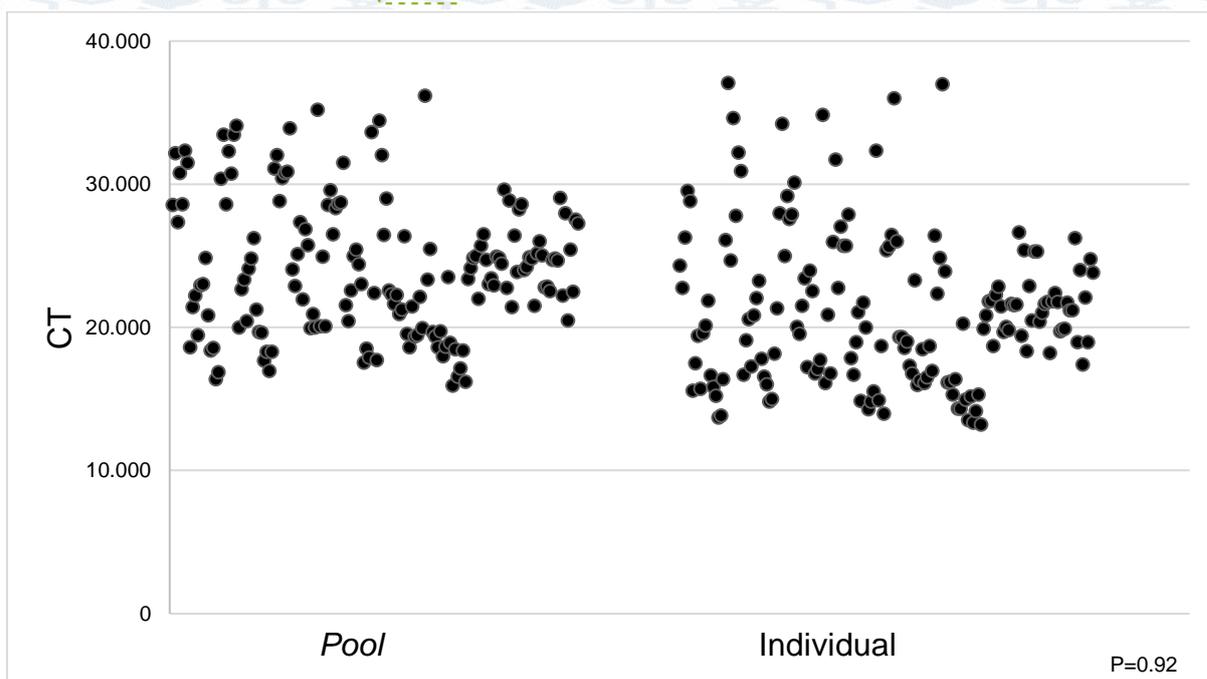


Gráfico 1. Diferença dos valores de CT entre o pool de amostras e as amostras individuais.

4. DISCUSSÃO

A doença do coronavírus 2 se tornou um problema de saúde pública com grande destaque devido ao quadro de infecção emergente ter se tornado uma pandemia. Os testes de PCR, os mais indicados para detecção e monitoramento do número de indivíduos infectados, auxiliam na indicação da taxa de crescimento de infecções. Entretanto, devido à grande demanda de testes em resposta ao cenário pandêmico, a capacidade dos laboratórios não é suficiente para atender à demanda necessitada, seja pela ausência de uma infraestrutura necessária para os testes diários, seja pela produção de equipamento por parte das indústrias, cuja produção é direcionada para os mercados internos, tendo a exportação proibida em alguns países. Além disso, grandes companhias se voltam para uma busca contínua de profissionais de saúde capacitados para a realização dos testes e interpretação das análises (12).

Diante este cenário, os testes de diagnóstico demandam métodos mais efetivos que exigem a análise de uma alta carga de amostras, no entanto as taxas de positividade são baixas ou apresentam uma grande variação de um local para outro (13). A metodologia de *group-testing* ou testagem em *pool* de amostras pode, então, ser considerada uma opção viável para testar um grande número de amostras, reduzindo o tempo de análise e a quantidade de reagentes utilizados.

Das 340 reações, um total de 46 reações falhou por motivos diversos, tais como: falha da pipetagem dos reagentes ou da amostra, problemas na extração do RNA, degradação do material armazenado, entre outros, sendo que essas falhas não refletem na validação da detecção do SARS-CoV-2 em *pools*. Essas falhas foram desconsideradas, e as análises foram repetidas com novas amostras. Em todos os testes que não houve falha na reação foi possível detectar o vírus nas amostras analisadas individualmente e nas mesmas amostras em *pools*. Em apenas uma reação, com a sonda N2, houve uma diferença > 4 Ct entre a amostra analisada individualmente e no pool, o que poderia levar a um resultado falso negativo em uma amostra com uma carga viral muito baixa.

Nossos resultados utilizando o método de testagem em *pool* demonstrou eficiência utilizando uma amostra positiva entre amostras negativas, demonstrando uma sensibilidade 0.87 para a sonda N1 e 0.84 para sonda N2, podendo ser utilizado em laboratórios de análises clínicas para o diagnóstico de SARS-CoV-2. Além disso, os níveis de CT entre o pool de amostras e as amostras individuais foram similares, sem diferença estatisticamente significativa ($P=0.92$), demonstrando uma preservação de CT ao realizar o método de testagem em *pool*. Vale ressaltar que para o *pool* cujo teste dê resultado negativo, a indicação é que as amostras são provavelmente negativas, mas quando o teste dê positivo, isso indica que, pelo menos, uma amostra é positiva, tornando necessária a testagem de cada amostra daquele *pool* separadamente para identificar a amostra infectada (12).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que é válida e segura a realização da técnica de validação de uma análise em um *pool* de 10 amostras tendo apenas uma amostra detectável no meio, para detecção e diagnóstico do SARS-CoV-2. No entanto, sugere-se que o laboratório aumente o Ct para o *cut-off* em 4 unidades (de 32 para 36), podendo adotar como norma, repetir as reações em que os Cts caíssem entre 36 e 37.

FINANCIADORES

CAPES, CNPq e Núcleo Diagnóstico (termo de convênio com a UEM).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colaboradores do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá e ao Núcleo Diagnóstico.

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. doi:10.1097/CM9.0000000000000722.
2. Habas K, Nganwuchu C, Shanzad F, Gopalan R, Haque M, Rahman S, et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(12):1201–11. doi:10.1080/14787210.2020.1797487.
3. Yelin I, Aharony N, Tamar ES, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR Test in Multi sample Pools. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2073–8. doi:10.1093/cid/ciaa531.
4. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol*. 2020;26;58(6):e00512-20. doi:10.1128/JCM.00512-20.
5. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020;14(4):3822–35. doi:10.1021/ACSNANO.0C02624.
6. Prahara I, Jain A, Singh M, Balakrishnan A, Dhodapkar R, Borkakoty B, et al. Pooled testing for COVID-19 diagnosis by real-time RT-PCR: A multi-site comparative evaluation of 5- & 10-sample pooling. *Indian J Med Res*. 2020;152(1 & 2):88–94. doi:10.4103/IJMR.IJMR_2304_20.
7. Anderson C, Castillo F, Koenig M, Managbanag JR. Pooling Nasopharyngeal Swab Specimens to Increase Testing Capacity for SARS-CoV-2. *Med J (Fort Sam Houston, Tex)*. 2020;(PB 8-21-01/02/03):8–11. doi:10.1101/2020.05.22.110932.
8. Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA. Sample Pooling as a Strategy to Detect Community Transmission of SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020;323(19):1967–9. doi:10.1001/JAMA.2020.5445.
9. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel: For Emergency Use Only: Instructions for Use. Atlanta GA: CDC; 21 Jul 2021. 80 p.
10. Van TT, Miller J, Warshauer DM, Reisdorf E, Jernigan D, Humes R, et al. Pooling nasopharyngeal/throat swab specimens to increase testing capacity for influenza viruses by PCR. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):891–6. doi:10.1128/JCM.05631-11.
11. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015;11;3:9–16. doi:10.1016/J.BDQ.2015.01.005.
12. Gil A, Neves M, Rios-neto ELG, Carvalho F, Dickman R. Uma Alternativa para o Aumento da Escala da Testagem para a Covid-19. 2020. [Acesso em: 06 Ago 2021]. Disponível em: https://ufmg.br/storage/0/9/0/e/090e386563b14bec680ca07f7c9ff5c4_15892829037837_827145161.pdf
13. Thermofisher. Poor Efficiency of PCR. [Acesso em 04 Ago 2020]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>

Palavras-chave: COVID-19; SARS-CoV-2; diagnóstico.

Inovação e saúde

IDENTIFICATION OF PUTATIVE INHIBITORS OF 3-DEHYDROSHIKIMATE DEHYDRATASE FROM *Mycobacterium tuberculosis* BY *in silico* APPROACHES

João Vítor Souza¹, Erika Kioshima², Letícia Murase³, Diego Lima⁴, Flavio Seixas⁵, Bernard Maigret⁶ and Rosilene Cardoso²

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

² Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

⁴ Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Programa de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵ Docente, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR

⁶ Université de Lorraine, CNRS, Inria, LORIA, F-54000 Nancy, France

e-mail: jvperezsouza@gmail.com

1. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) stands as a relevant infectious disease in low- and middle-income countries. Although curable, the disease is difficult to treat and requires multi-drug therapy for long periods (1). Treatment success rates drop steeply from around 85% in susceptible TB to less than 60% in drug resistant cases while treatment time grows from 6 months to up to 2 years (2).

The search for alternative drugs and especially new drug targets is a pivotal strategy for controlling TB and overcoming drug resistance (3). In the past decade, research focused on the expansion of an array of new targets and their crystallographic coverage (4). An optimal drug target against TB should be essential for mycobacterial growth while being absent in mammals, and be part of different pathways other than those already targeted by available anti-TB drugs (3).

Recent evaluations show that the development of a new drug can take up to 15 years and cost around 1 billion dollars (5). At the same time, resistance to one of the most recently approved drugs to treat TB, bedaquiline, has been reported within a few years of market release (6). Chemoinformatic tools and approaches such as pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics have been applied to overcome some of the issues tackled in conventional wet lab drug design campaigns. Among other advantages, the application of *in silico* methods allows researchers to screen thousands of compounds in a cost- and time-saving manner. These tools have been previously applied for drug design against TB and have shown promising results (7).

Considering the limited arsenal of drugs available to treat TB, especially considering the drug-resistant scenario, the objective of this work was to apply a combination of ligand- and target-based *in silico* methods to: i) select a high-priority drug target against *Mycobacterium tuberculosis* and ii) perform an *in silico* virtual screening for hit prioritization against this target.

2. MATERIAL AND METHODS

Target and structure-based approaches

Target search

Possible *M. tuberculosis* drug targets were screened using the TDR Targets database (8). Targets were filtered according to: i) any evidence of essentiality for *M. tuberculosis*; ii) absence in mammals; iii) resolved crystallographic structures in Protein Data Bank (PDB); iv) less than 100 kDa of molecular weight; and v) described inhibitory assays. Initial hits were further scrutinized considering function, cell location and expression in different replication states and the final target was selected based on expert opinions.

Target exploratory analysis – crystal structure analysis and molecular dynamics simulation

Every crystal structure available for *M. tuberculosis* 3-dehydroquinate dehydratase (MtDHQ) (EC:4.2.1.10) was retrieved from the RCSB PDB database (9) and analyzed individually. Structures

were superimposed and flexibility, ligand position (if available) and amino acid interactions were evaluated. Visual inspection was performed using VMD (10) and UCSF CHIMERA (11).

After analysis, MtDHQ without ligands (MtDHQ-APO, pdbid: 1h05) model was chosen as the reference structure for molecular dynamics (MD) simulations in this study. Briefly, the structure was downloaded from RCSB PDB and missing residues, side chains and hydrogens were added if necessary. Protein was solvated in a TIP3P water box, with the addition of Cl⁻ ions to neutralize the system at pH 7.0. The state for dynamics was generated from the model after a conjugate gradient minimization of 64,000 steps, followed by 500 ps equilibration stage. Systems were kept at constant 300 K, 1 atm and pH 7.0. The MD simulations were carried out in NAMD (12). The trajectories' flexibility and stability were analyzed by root mean-square deviation (RMSD) and root mean-square fluctuation (RMSF). Pocket volume variation was analyzed using fpocket (13). Interpretation of MtDHQ-APO trajectory results guided the selection of three protein conformations for ensemble docking protocol in GOLD (14).

Ligand-based approaches

Chemical libraries, pharmacophore model and pharmacophore screening

Ligands co-crystallized with MtDHQ were downloaded from the RCSB PDB database (9) and fed to PharmaGist (15) web server for pharmacophore model development. The resulting pharmacophore was downloaded and used to screen chemical libraries using the Pharmit (16) web server. The chemical libraries used in this study were selected from the Pharmit chemical collection or from other sources. The resulting files from Pharmit were processed by DataWarrior 5.5.0 (17) software and filtered according to predicted mutagenic, tumorigenic, reproductive effects and molecular weight characteristics (150 to 750). In addition, molecules were further screened regarding cLogP (-16.01 to 13.87), cLogS (-12.29 to 7.98) using cutoff values displayed by the DrugBank chemical library (18).

Ensemble virtual screening in GOLD

Molecules were then protonated to pH 7 at 35 °C, converted to .mol2 and their compatibility was checked for GOLD virtual screening. After necessary preparations, the optimized chemical library was fed to an Ensemble docking protocol in GOLD (14) software. Three protein conformations were selected based on the results from the MD experiment. The search radius was set to 10 Å from the center position at 5.37, -15.87 and 7.13 X, Y and Z coordinates, respectively. Molecules were ranked using the standard goldscore ranking function. The 300 best-ranked molecules were selected for further analysis.

3. RESULTS

Target and structure-based approaches

The search for possible *M. tuberculosis* targets revealed 26 protein candidates (data not shown) that met the criteria established. The targets were then prioritized based on literature evidence and finally authors selected MtDHQ based on expert opinions.

Initial target analysis was performed by evaluating available crystal structures of MtDHQ deposited in the Protein Data Bank. Superposition of protein structures in VMD revealed how active site residues occupy similar positions with little deviation, except for the active-site loop (residues 18 to 25). In fact, ligand size and the presence of aromatic groups greatly impact the opening or closing of the active-site loop.

Next, we performed a 500 ns MD simulation with MtDHQ-APO in NAMD. The protein remained folded during the whole process and the system reached equilibrium at around 80 ns of simulation (Figure 1A). RMSD analysis revealed that the whole system had an average of 3.25±0.28 Å throughout the simulation, while the active-site site loop showed greater flexibility with an average RMSD of 4.57±0.52 Å. Figure 1A shows the RMSD fluctuations across the simulation.

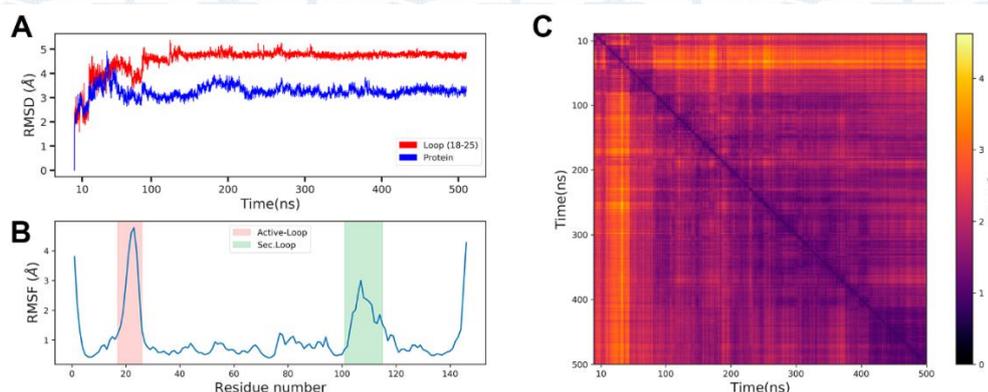


Figure 1. Exploratory molecular dynamics simulation of MtDHQ APO. (A) RMSD values for the whole system (blue) and active-site loop residues (red) across simulation time. (B) RMSF values for individual amino acid residues throughout the trajectory. Red and green-filled areas represent essential regions for catalysis and inhibition (namely the active-site loop and a secondary loop that comprises the active site), which show greater flexibility. High flexibility is also observed in terminal regions. (C) pairwise RMSD analysis of the trajectory.

RMSF analysis agreed with the results above, showing that the active-site loop displayed high flexibility and the remaining protein regions were quite rigid (RMSF of 3.11 ± 1.36 and 1.06 ± 0.85 , respectively) (Figure 2B). Important flexibility was also observed for a secondary loop (RMSF of 1.88 ± 0.58) that contains essential residues (His101, Ile102, Ser103 and Arg112) and terminal regions (RMSF of 2.22 ± 1.2) of MtDHQ-APO. 2D RMSD plot (Figure 1C) of the trajectory also demonstrates that MtDHQ-APO displays stable conformations throughout the simulation after stabilization is achieved. In fact, MtDHQ-APO seemed to adopt an even more stable conformation in the last 100 ns of simulation, represented by the darker square in Figure 1C.

Finally, the authors analyzed the pocket volume dynamics of MtDHQ-APO. Analysis shows that the pocket remains open across the simulation, with a slight increase trend towards the end of simulation (Figure 2A). Maximum and minimum rates observed for pocket volume were respectively 1565.57 and 72.39 Å³. With the above data, we selected three representative conformations adopted by the protein to run an ensemble docking protocol in GOLD: i) conformation with highest pocket volume; ii) lowest pocket volume; iii) a conformation adopted in the last 50 ns of the simulation and depicted in the 2D RMSD analysis. Figure 2B provides the three conformations.

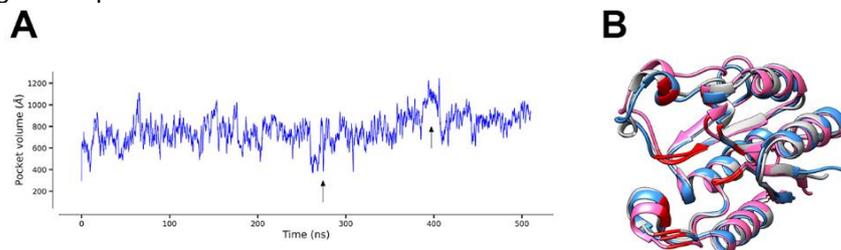


Figure 2. Pocket volume variation and protein conformations selected for ENSEMBLE virtual screening. (A) Pocket volume variations across the 500ns simulation. Black arrows represent the lowest and highest volumes displayed throughout the simulation, respectively. (B) Protein conformations selected for ensemble docking protocol. In gold, conformation that showed maximum pocket volume in mdpocket; In pink, conformation that showed minimum pocket volume in mdpocket; In blue, conformation adopted towards the last 100 ns of the trajectory; In red, essential protein residues required for catalysis.

3.1 Ligand-based approaches

A set of 28 inhibitors that were co-crystallized with MtDHQ, available in the RCSB PDB was used to generate a pharmacophore model. The final model was composed of 4 features, namely one aromatic and three hydrogen bond donors. The model was then used to screen chemical libraries in Pharmlt. Starting number of compounds summed approximately 216 million and pharmacophore screening resulted in 900 thousand molecules. Next, molecules were filtered according to molecular weight, clogP, clogS, predicted mutagenicity, tumorigenicity or reproductive effects in the DataWarrior 5.5.0 program, reducing the hit count to 635 thousand. Preparation for GOLD virtual screening protocol removed duplicates, molecules with missing information and corrected molecule charges to a final number of 462,548 molecules.

The final library was then submitted to an Ensemble docking protocol in GOLD, using the three previously selected protein conformations. Search radius was set at 10 Å from the center position at 5.37, -15.87 and 7.13 for X, Y and Z coordinates, respectively. Molecules were ranked using the standard goldscore ranking function and the 300 best-ranked candidates were selected for further

analysis. The docking of GOLD hits (GHITS) was validated by applying the same docking protocol to the set of 28 molecules used for pharmacophore model building.

Our virtual screening protocol selected molecules with different scaffolds compared to those of known inhibitors. GHITS displayed an average 0.38 ± 0.08 similarity to XNW (a reference ligand), while known inhibitors reached 0.57 ± 0.19 . Further, GHITS presented average docking scores of 109.43 ± 7.39 , well above the scores displayed by known inhibitors of MtDHQ (63.78 ± 9.26). The best-ranked molecule, MOL17229 showed a goldscore of 117 (Figure 3).

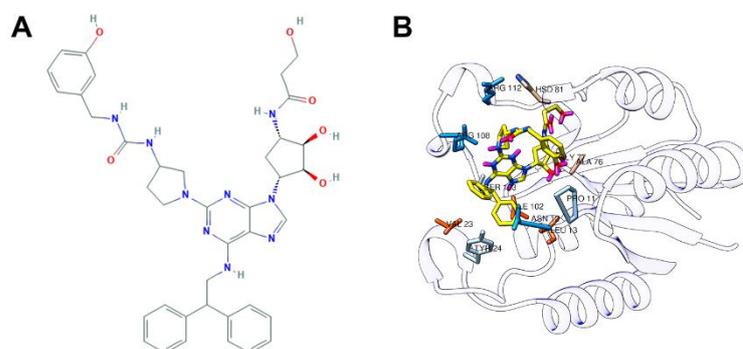


Figure 3. Molecular structure and docking of MOL17229 to MtDHQ.

4. DISCUSSION

In silico methods have been applied to speed up the search for new drug candidates and these approaches pose as valuable tools for anti-TB drug development (7). In this work we applied a new *in silico* pipeline to select new putative inhibitors of MtDHQ.

MtDHQ is the third enzyme in the shikimic acid pathway and converts 3-dehydroquinate (3DHQ) into 3-dehydroshikimate (19). The pathway is responsible for the biosynthesis of aromatic compounds such as essential amino acids (Phe, Tyr and Trp) and vitamins E and K (20). Whilst vital for bacteria, fungi and some parasites, MtDHQ is absent in mammals. Consequently, it reduces the possibility of serious side effects in future therapy. To the best of our knowledge, no drug targeting this enzyme, let alone the shikimic acid pathway has been approved for TB therapy.

Previous efforts on drug design for MtDHQ focused on inhibitors that derived from the anhydroquininate core present in 3DHQ. While relevant for substrate recognition and catalysis (20), the electrostatic interactions made by 3DHQ and corelate molecules are not strong enough to inhibit the enzyme effectively. Efforts towards inhibitors with ramifications from the anhydroquininate core have been more successful, achieving astoundingly better K_i values (26 nM vs 200000 nM for ligands XNW and FA1, respectively) (21,22). This marked improvement in activity was accounted for by extra hydrophobic interactions made by aromatic groups present at the ramifications (either at C2 or C3) of such molecules (23). These groups interact with the essential tyrosine in the active site loop (Tyr24) and maintaining it in a closed conformation.

The building of the pharmacophore model and the chemical libraries used in this study aimed at leveraging available knowledge as well as focusing on a diverse set of compounds in hope to find new inhibitor classes. Through the filters applied, molecules with undesirable features were eliminated and hits with chemical groups important for inhibitors were selected. The compounds selected in our virtual screening campaign displayed better scores than those of known inhibitors and the highest ranked molecule makes strong interactions with the active-site loop and we believe that this might be indicative of stable binding to the target.

5. CONCLUSION

This virtual screening work presents MOL17229 as a valuable compound that could be a seed for developing innovative inhibitors of MtDHQ. Further, we show how MtDHQ displays high flexibility in essential regions and molecules that bind to these might be effective inhibitors. Finally, it is important to highlight that the best-ranked molecule violates the Lipinski's Rule of Five. In this sense, optimizations in this lead compound will be necessary to ensure a safe and active drug in the future.

FUNDING

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

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the team of the Laboratory of Medical Bacteriology at the State University of Maringá. We are further thankful to CAPES and CNPq.

REFERENCES

- Rabahi MF, Silva JLR da, Ferreira ACG, Tannus-Silva DGS, Conde MB. Tuberculosis treatment. *J Bras Pneumol* [Internet]. 2017 Jul 5;43:472–86. Available from: <http://www.scielo.br/j/jbpneu/a/fr4LscGzFpJFSm6P4Hd5gXL/?format=pdf&lang=en>
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>
- Singh V, Mizrahi V. Identification and validation of novel drug targets in Mycobacterium tuberculosis. *Drug Discov Today* [Internet]. 2017;22(3):503–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.010>
- Baugh L, Phan I, Begley DW, Clifton MC, Armour B, Dranow DM, et al. Increasing the structural coverage of tuberculosis drug targets. *Tuberc* [Internet]. 2015;95(2):142–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2014.12.003>
- Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA*. 2020 Mar;323(9):844–53.
- Vezeris N, Bernard C, Guglielmetti L, Le Du D, Marigot-Outtandy D, Jaspard M, et al. Rapid emergence of Mycobacterium tuberculosis bedaquiline resistance: lessons to avoid repeating past errors. *Eur Respir J* [Internet]. 2017 Mar 1;49(3):1601719. Available from: <http://erj.ersjournals.com/content/49/3/1601719.abstract>
- Macalino SJY, Billones JB, Organo VG, Carrillo MCO. In Silico Strategies in Tuberculosis Drug Discovery. *Molecules* [Internet]. 2020 Jul 7;25(3):665. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/665>
- Urán Landaburu L, Berenstein AJ, Videla S, Maru P, Shanmugam D, Chernomoretz A, et al. TDR Targets 6: driving drug discovery for human pathogens through intensive chemogenomic data integration. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Nov 4; Available from: <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkz999/5611677>
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 4;28(1):235–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-pdf/28/1/235/9895144/280235.pdf>
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* [Internet]. 1996 Feb 4;14(1):33–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](http://dx.doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5) LB - Ys7PU
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* [Internet]. 2004;25(13):1605–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro J V, Bernardi RC, et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys* [Internet]. 2020;153(4):44130. Available from: <http://dx.doi.org/10.1063/5.0014475>
- Guilloux V Le, Le Guilloux V, Schmidtke P, Tuffery P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection [Internet]. Vol. 10, *BMC Bioinformatics*. 2009. p. 168. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-10-168> LB - Y9GNE
- Cole J, Willem M, Nissink J, Taylor R. Protein-Ligand Docking Virtual Screening with GOLD. In: *Virtual Screening in Drug Discovery* [Internet]. 2005. p. 379–415. Available from: <http://dx.doi.org/10.1201/9781420028775.ch15> LB - C6bU2
- Schneidman-Duhovny D, Dror O, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008;36(Web Server issue):W223-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn187>
- Sunseri J, Koes DR. Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016;44(W1):W442-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw287>
- López-López E, Naveja JJ, Medina-Franco JL. DataWarrior: an evaluation of the open-source drug discovery tool. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2019;14(4):335–41. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2019.1581170>
18. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006;34(Database issue):D668-72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj067>
 19. Gourley DG, Shrive AK, Polikarpov I, Krell T, Coggins JR, Hawkins AR, et al. The two types of 3-dehydroquinase have distinct structures but catalyze the same overall reaction. *Nat Struct Biol* [Internet]. 1999;6(6):521–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/9287>
 20. Lence E, van der Kamp MW, González-Bello C, Mulholland AJ. QM/MM simulations identify the determinants of catalytic activity differences between type II dehydroquinase enzymes. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2018;16(24):4443–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c8ob00066b>
 21. Peón A, Otero JM, Tizón L, Prazeres VF V, Llamas-Saiz AL, Fox GC, et al. Understanding the key factors that control the inhibition of type II dehydroquinase by (2R)-2-benzyl-3-dehydroquinic acids. *ChemMedChem* [Internet]. 2010;5(10):1726–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201000281>
 22. Dias MVB, Snee WC, Bromfield KM, Payne RJ, Palaninathan SK, Ciulli A, et al. Structural investigation of inhibitor designs targeting 3-dehydroquinase dehydratase from the shikimate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 2011 Jun 15;436(3):729–39.
 23. Peón A, Robles A, Blanco B, Convertino M, Thompson P, Hawkins AR, et al. Reducing the Flexibility of Type II Dehydroquinase for Inhibition: A Fragment-Based Approach and Molecular Dynamics Study. *ChemMedChem* [Internet]. 2017;12(18):1512–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201700396>

Keywords: Drug design; virtual screening; drug resistance.

PHTHALOCYANINE AS A PHOTSENSITIZER FOR CERVICAL CANCER PHOTODYNAMIC THERAPY: PRECLINICAL AND CLINICAL STUDIES

Lucimara Rodrigues Carobeli¹; Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles²; Maria Vitória Felipe de Souza³; Natália Lourenço Mari³; Edilson Damke⁴; Renato Sonchini Gonçalves⁵; Cristiane Suemi Shinobu Mesquita⁶; Raquel Pantarotto Souza⁶; Vânia Ramos Sela da Silva⁶; Marcia Edilaine Lopes Consolaro⁶

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

²Postgraduate student (Doctoral degree), Program of Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá.

³Master in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá.

⁴Doctor in Biosciences and Physiopathology, State University of Maringá.

⁵Professor, Department of Chemistry, State University of Maringá.

⁶Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá.

e-mail: lucimaracarobeli@gmail.com

1. INTRODUCTION

Cervical cancer is the fourth most frequently diagnosed cancer and the fourth leading cause of cancer death in women, with an estimated 604 000 cases and 342 000 deaths in 2020 worldwide (1). The Human papillomavirus (HPV) is detected in 99% of cervical tumors, the most prevalent type is HPV-16, followed by HPV-18. However, they are not sufficient causes of cervical cancer (2). Other important cofactors to the persistence of HPV infection and carcinogenesis are immunosuppression, smoking, number of full-term pregnancies, oral contraceptive use (3), and other sexually transmitted infections (4).

The treatment of cervical cancer will depend on factors such as disease stage, tumor size and personal factors such as age and desire to have children (5). Surgery or radiation combined with chemotherapy can be used, but these treatments often lead to obstetric problems in a subsequent pregnancy (6), cause many side effects, and are not effective for advanced disease.

Photodynamic therapy (PDT) is an attractive treatment modality for cervical cancer because its therapeutic agents, a photosensitizer (PS), light and oxygen, are safe by themselves and lead to selective tumor destruction. PS is excited by light and reacts with biomolecules transferring charges, resulting in radicals that react with molecular oxygen, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS), including singlet oxygen (1O_2) (7). The short lifetime of ROS can be enough to generate oxidative damage to endogenous biomolecules, leading to cell death via apoptosis, necrosis or autophagy-associated mechanisms (8). PDT targets include tumor cells, tissue microvasculature and the host's inflammatory and immune systems (9).

The Phthalocyanines (Pcs) belong to the second generation of PSs, and have photosensitizing properties, with activation in the range from 600 to 680 nm, with a well-defined tissue penetration in the target cells (10). However, Pcs exhibit high hydrophobicity and aggregation tendency, which affects their photochemical and photophysical properties. Thus, the choice of adequate substituents and use of drug delivery systems (DDSs) is decisive to increase solubility and bioavailability of Pcs (11). Despite many strengths, Pcs have not been approved as PS for cervical cancer PDT yet.

This work aimed to review the results obtained *in vivo* and in clinical tests in the last five years with different formulations of Pcs for PDT of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive cervical cancer, evaluating the improvement of their physicochemical properties, efficacy and potential for clinical application.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Search strategy

This systematic review was conducted between March and April 2021 and followed the guidelines of the PRISMA Statement (12). The electronic databases Pubmed, Web of Science, Scopus

and Embase were searched using the combinations of Medical Subject Heading (MeSH) organized on following groups: Group 1: “Uterine Cervical Neoplasms” OR “Cervical Intraepithelial Neoplasia” AND Group 2: “Phthalocyanine” AND Group 3: “Photochemotherapy” OR “Photochemistry” OR “Photosensitizing Agents”.

The references list was checked to recover additional publications. Literature reviews, book chapters, patents, guidelines, and interviews were excluded and original articles in English from 2016 to 2021 were evaluated to belong to the criteria of inclusion. The coverage period was chosen so that we could retrieve a viable number of articles to be evaluated, keeping the focus on the most recent advances in the study area.

2.2. Study selection

After excluding duplicate studies, titles and abstracts were selected by six independent reviewers and in a consensual analysis, the papers most closely related to the descriptors and question of the study were selected. Then, the full articles were reviewed by two experts who selected the articles for data extraction.

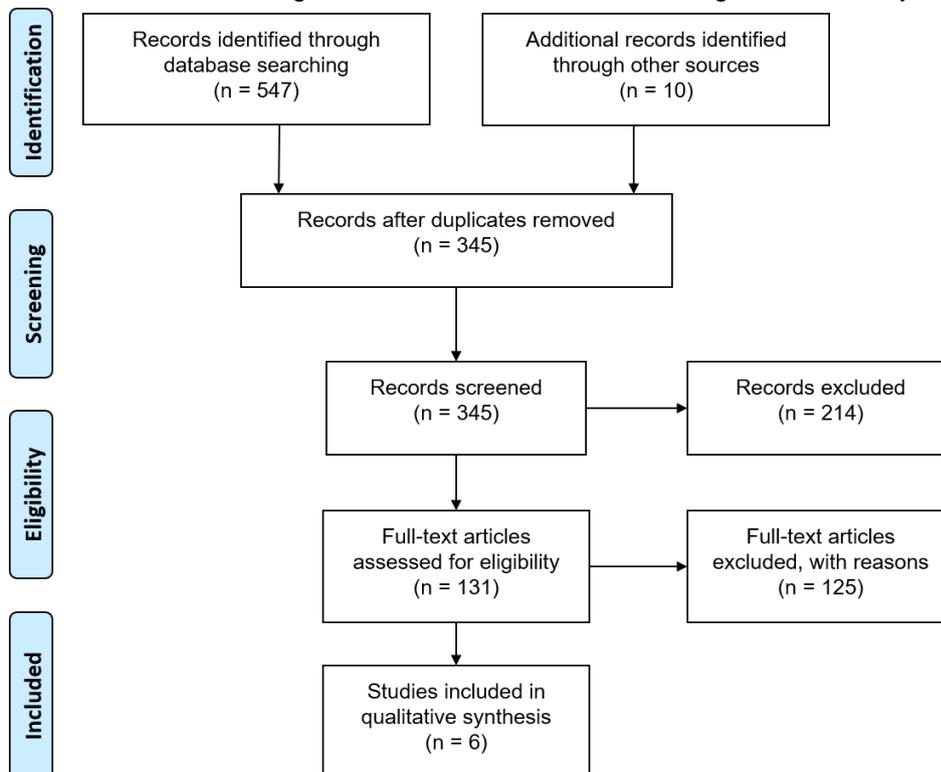
2.3. Data extraction

Because of heterogeneity among the studies, mainly concerning light sources and protocols of photodynamic treatment, was performed a qualitative systematic review and the relevant data were extracted, including the following topics: the model of study, photosensitizer formulation, light source, wavelength, density/power, analyzed parameters, and main results obtained.

3. RESULTS

Figure 1. Flow diagram of studies selected for the systematic review.

The search strategy used enabled the identification of 557 titles. After removing duplicates (N = 212), of the remaining 345 articles, 214 were excluded for not meeting the inclusion criteria (type of study, year of publication, language and subject of interest) and 131 were evaluated by title and abstract, of which 125 were excluded for being *in vitro* studies and/or not meeting the review objectives and 6



were selected for inclusion of full texts and qualitative analysis (Figure 1).

Of the 6 selected studies, 5 evaluated Pcs in an animal model (13–17) and only 1 study evaluated it in humans (18). The most used phthalocyanines were Metallophthalocyanines (MPcs), represented by zinc Pc (ZnPc) and aluminum Pc (AlPc). Other studies used silicon Pc (SiPc) as a PS for cervical cancer PDT. Regarding light sources, several technologies were developed and most of the irradiations were carried out at 670 nm. The treatment regimens were very varied, with irradiation times between 4 and 30 minutes. All these data are detailed in table 1.

In mice, Pcs showed low toxicity in the dark, high photochemical efficiency at low concentrations and short incubation time under illumination, tumor growth inhibition, tissue necrosis with low systemic effect and high survival rate.

In the clinical study with nanocapsules containing Chlorocyan- AlPc, 91.7% of patients progressed to negative oncotic cervical cytology after treatment and one did not obtain therapeutic benefit even after reapplication. Two patients with an initially positive response had a recurrence, a new round of PDT was performed, and both evolved with cytological remission three weeks later, remaining negative until the last follow-up (18).

About the DDSs used in the latest Pcs studies reported in this review, the emphasis was on conjugates with biotin, targeting to folate receptors, use of chitosan nanocapsules, mesoporous, gold or titanium dioxide nanoparticles. The application of these DDSs allowed an increase in the efficacy of PDT and a reduction in the side effects associated with the administration of Pc.

Table 1. Recent (2016-2021) studies evaluating different formulations of Pcs for cervical cancer

Autor, year	Study model	PS, route of administration, concentration, time of exposure	Light source, wavelength, fluence, potency, time of exposure	Main outcomes
Liang et al. 2021 (13)	Female BALB/c nude mice inoculated subcutaneously with HeLa cells (1×10^7)	TiO ₂ nanoparticle conjugated with folic acid and AlPc, intravenous, 0.52 μ mol/kg, 6 h	150-W Xe lamp, 420–800 nm, 0.75 W/cm ² , 10 min	High targeted photodynamic therapeutic activity, excellent biocompatibility, good antitumor ability with low dose therapeutic drug, and low light irradiation.
Li et al. 2019 (14)	Female BALB/c nude mice inoculated subcutaneously with Hela cells (1×10^7)	Biotin receptor-targeted SiPc, intravenous, 2 μ mol/kg, 2 h	Red laser, 670 nm, 10 mW/cm ² , 30 min	Accumulation in the tumor tissue, tolerable signals in other organs, inhibition of tumor progression, low aggregation tendency.
Li et al. 2019 (15)	Male NOD-SCID mice inoculated subcutaneously with HeLa cells (2×10^7)	ZnPc in mesoporous silica nanoparticles, intravenous, 200 μ M, 24 h	670 nm, 0.5 W/cm ² , 20 min	Accumulation in tumor cells, inhibition of tumor growth, time-modulated activation process and fast excretion.
Wang et al. 2019 (16)	Nude mice inoculated subcutaneously with HeLa cells	Sulfonated AlPc loaded by gold nanobipyramids, intratumoral, 5 nM, 2 h	Fs laser, 800 nm 2.8 W/ cm ² , 30 min	Suppression of tumor growth, minimal adverse effects, improves the treatment depth and precision
Gadzinski et al. 2016 (17)	Female CB17 SCID mice inoculated subcutaneously or intracervically with CaSki or ME-180 cells (1×10^5)	SiPc, intravenous, 2 mg/kg, 2 days	Diode laser, 670 nm, 50mW, 75 J/cm ² , 4 min intravaginally and 150 J/cm ² , 16 min subcutaneous	Widely tissue distribution and retention in tumors, necrosis of intracervical tumors, low survival rate after 5 days.

Vendette et al. 2020 (18)	Female patients with a diagnosis of CIN1 or CIN2	Chlorocyan-AIPc in chitosan nanocapsules, 1mL on the surface of the cervix, 30 min	Red laser light, 650 nm, 200-300 J, 1.20-2.00 W, 0.40-0.70 W/cm ² , 50-80 J/cm ²	Good efficacy in 91.7% of cases, no toxicity or complications in the anatomical and tissue structure of the cervix.
---------------------------	--	--	--	---

PS: photosensitizer; AIPc: aluminum phthalocyanine; SiPc: silicon phthalocyanine; ZnPc: zinc phthalocyanine; CIN: cervical intraepithelial neoplasia

4. DISCUSSION

The main topics in Pcs for cervical cancer are the balance between phototoxic effect, good solubility and bioavailability, selectivity for tumor cells, keeping adjacent tissues healthy, with adequate distribution and elimination, featuring an ideal therapeutic efficiency. The most frequently used Pcs, MPcs, have been identified as strong inducers of cell damage and preferentially accumulate in tumor cells, where they stimulate photodamages in many *in vitro* and *in vivo* tumor models (13,15,16,19,20). The photophysical properties of Pcs are strongly influenced by the presence and nature of the central metal ion. Co-ordination of diamagnetic transition metal ions (such as zinc, aluminum, and gallium) usually results in MPcs with high singlet oxygen quantum yields (21,22).

The *in vivo* study methodology developed in the studies reported here, based on mice with tumor- induced by subcutaneous or intracervical inoculation of cell lines derived from human cervical cancer are extremely important since so far there is no specific animal model for HPV infection (23), therefore, this is the main way to evaluate tumors triggered by human HPV in animal studies. It is noteworthy that in most of the studies that tested different formulations of Pcs in tumors induced by HeLa cells (adenocarcinoma cell line, HPV 18-positive), the main objective was not to evaluate their efficacy against cervical cancer, but against cancer as a whole. This is because this cell line is extremely durable, prolific and widely used in scientific studies (24). However, these studies indirectly assess the activity of these PCs against cervical adenocarcinoma, which have shown great promise for cervical cancer PDT *in vivo* and have great potential for future use in clinical trials.

Using cervical cancer cell lines CaSki (squamous cell carcinoma unit cell line, HPV-16 about 600 copies per cell and HPV-18) and ME-180 (squamous cell carcinoma booster squamous cell line, HPV DNA with greater homology with HPV-68 than HPV-18) to induce tumor in mice, Gadzinski et al 2016 (17) highlighted the metastatic nature of these cells, allowing a good understanding of tumor growth characteristics when cells were injected intracervically. In addition, the importance of this study is given by the revelation of the potential of PDT with Pcs against invasive cervical cancer due to HPV-16, associated with squamous cell carcinoma, the most common type of cervical cancer worldwide (approximately 70% of the total) (25). Although the mice survived the initial irradiation and the tumor regressed, the attempt at laser irradiation through the vaginal opening to treat the intracervical lesions was unsuccessful, as 4 of the 5 mice with intracervical tumors had to be sacrificed or died between 2 and 5 days after irradiation, which caused intestinal lesions and resulted in this low survival rate. In this case, it is important to consider the slow release and redistribution of Pc in other tissues and to ensure the irradiation only enters the site affected by the tumor.

Unfortunately, there are few studies in humans with formulations of Pcs, with only one study relating this class of PS to the treatment of CIN in the last 5 years. In this clinical study, an effective device for applying light to the cervix was developed. A significant differential of the method used in this research is the absence of toxicity and side effects when compared to the use of systemic photosensitizers, in addition to the shorter time for application, absorption and illumination, which reduces the patient discomfort. Therefore, this modality of treatment proved to be promising and safe, however, the authors suggested large randomized clinical trials to establish the efficacy (18).

The present study has some limitations: most studies evaluated the activity of Pcs against cervical adenocarcinoma and not squamous cervical cancer, which is the most common type of cervical cancer; the heterogeneity of *in vivo* treatment protocols makes it difficult to compare results obtained with PDT; few preclinical studies in animals and no clinical studies with Pcs in invasive cervical cancer have been performed to date. Despite these limitations, there are indications that formulations based on Pcs can be effective for the development of photosensitizing compounds against different types of cervical cancer, which encourages further studies to fill these gaps.

5. CONCLUSION

Current evidence indicates that Pcs are promising as pharmaceutical agents for PDT for cervical cancer. It is necessary to encourage studies that evaluate Pcs in models with other cervical cancer cell lines, aimed at cervical squamous cancer; increase preclinical animal studies and clinical trials

evaluating Pcs against CIN and invasive cervical cancer; understand the exact mode of action of Pcs in different types of cervical cancer and maintain the optimization of formulations and delivery systems, aiming to improve selectivity and therapeutic efficiency.

FINANCIAL SUPPORT

CAPES.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank collaborators of the Laboratory of Clinical Cytology and STIs of the State University of Maringá.

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):209-249.
2. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12–9.
3. Herrero R, Murillo R. Cervical cancer. In: Thun M, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, editors. *Cancer Epidemiology and Prevention.* 4th ed. New York: Oxford University Press; 2018. p. 925-946.
4. de Abreu ALP, Malaguti N, Souza RP, Uchimura NS, Ferreira EC, Pereira MW, et al. Association of human papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. *Am J Cancer Res.* 2016;6(6):1371–83.
5. American Cancer Society. Cervical Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging. 2009. [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8601.00.pdf>
6. Tao XH, Guan Y, Shao D, Xue W, Ye FS, Wang M, et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia: A systemic review. Vol. 11, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* Elsevier; 2014. p. 104–12.
7. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016 Feb 15;473(4):347–64.
8. Andrzejak M, Price M, Kessel DH. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. *Autophagy.* 2011;7(9):979–84.
9. Mfouo-Tynga I, Abrahamse H. Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2015 May 6;16(5):10228–41.
10. Reddi E, Lo Castro G, Biolo R, Jori G. Pharmacokinetic studies with zinc(II)-phthalocyanine in tumour-bearing mice. *Br J Cancer.* 1987;56(5):597–600.
11. Rak J, Pouckova P, Benes J, Vetvicka D. Drug delivery systems for phthalocyanines for photodynamic therapy. Vol. 39, *Anticancer Research.* International Institute of Anticancer Research; 2019. p. 3323–39.
12. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2009 Jul;6(7).
13. Liang X, Xie Y, Wu J, Wang J, Petković M, Stepić M, et al. Functional titanium dioxide nanoparticle conjugated with phthalocyanine and folic acid as a promising photosensitizer for targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2021;215.
14. Li K, Dong W, Liu Q, Lv G, Xie M, Sun X, et al. A biotin receptor-targeted silicon(IV) phthalocyanine for in vivo tumor imaging and photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019;190:1–7.
15. Li X, Fan H, Guo T, Bai H, Kwon N, Kim KH, et al. Sequential Protein-Responsive Nanophotosensitizer Complex for Enhancing Tumor-Specific Therapy. *ACS Nano.* 2019;13(6):6702–10.
16. Wang J, Zhuo X, Xiao X, Mao R, Wang Y, Wang J, et al. AIPcS-loaded gold nanobipyramids with high two-photon efficiency for photodynamic therapy: In vivo. *Nanoscale.* 2019;11(7):3397.
17. Gadzinski JA, Guo J, Philips BJ, Basse P, Craig EK, Bailey L, et al. Evaluation of Silicon

Phthalocyanine 4 Photodynamic Therapy against Human Cervical Cancer Cells *in Vitro* and in Mice. *Adv Biol Chem.* 2016;06(06):193–215.

18. Vendette ACF, Piva HL, Muehlmann LA, de Souza DA, Tedesco AC, Azevedo RB. Clinical treatment of intra-epithelia cervical neoplasia with photodynamic therapy. *Int J Hyperth.* 2020;37(3):50–8.

19. Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, Grossmann J, Mulvihill JW, Mukhtar H, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):2021–7.

20. Vieira NV, Muehlmann LA, Longo PF, Rodrigues Da Silva J, Zancanela DC, Tedesco AC, et al. Aluminum-Phthalocyanine Chloride-Based Photodynamic Therapy Inhibits PI3K/Akt/Mtor pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells *In Vitro*. *Chemotherapy.* 2012;2012:5.

21. Ogura SI, Tabata K, Fukushima K, Kamachi T, Okura I. Development of phthalocyanines for photodynamic therapy. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2006 May 2;10(9–10):1116–24.

22. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Borisova E, Avramov L, Schnurpfeil G, et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. *Bioorganic Med Chem.* 2007 Jul 15;15(14):4829–35.

23. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.* 2002 Nov 1;89(2):249–61.

24. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RAF, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 2010 Jul 1;127(1):1–8.

25. Hu K, Wang W, Liu X, Meng Q, Zhang F. Comparison of treatment outcomes between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix after definitive radiotherapy or concurrent chemoradiotherapy. *Radiat Oncol.* 2018 Dec 17;13(1):1–7.

Keywords: phthalocyanine; photochemotherapy; uterine cervical neoplasms.

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE CANABINOIDES EM FLUIDO ORAL POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRIA DE MASSAS

Paula Pessoa Moreira e Souza¹; Mariana Aparecida Oliveira Madia²; Deborah Thais Palma Scanferla³; Nicole Santos Baccule⁴, Mylena Domiciano Martins⁴, Camila Marchioni⁵; Simone Aparecida Galerani Mossini⁶.

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

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

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

⁴Acadêmica de Graduação em Farmácia, Laboratório de Toxicologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Docente, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

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

e-mail: paula.pessoam@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Escritório das Nações Unidas para Drogas e Crimes (UNODC), informou em seu último Relatório Mundial sobre Drogas que aproximadamente 500 mil pessoas foram a óbito em decorrência ao uso de drogas, em 2019. Nesse mesmo ano, por volta de 200 milhões de pessoas usaram somente maconha. Por ser uma das drogas de abuso mais utilizada no mundo, o número de adolescentes que não a consideram prejudicial à saúde está diminuindo constantemente, podendo resultar em um impacto negativo para gerações futuras. O Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC), principal componente da *Cannabis sativa*, pode causar dependência e é responsável pelo desenvolvimento de transtornos mentais, em usuários a longo prazo. Projetos demonstram que em 2030 o número de usuários poderá aumentar 11% em todo o mundo (1).

Métodos analíticos para quantificação de canabinoides em amostras biológicas são necessários para programas de teste de drogas (2). Para a análise dessas amostras métodos de extração dos analitos de interesse são necessários. A técnica miniaturizada DXP (*Disposable Pipette Extraction*) é uma alternativa frente à *Solid Phase Extraction* (SPE) tradicional, que utiliza cartuchos para fazer a extração. Desenvolvida no ano de 2003, a DPX vem sendo empregada por utilizar menor volume de amostra e solvente orgânico, corroborando com a química verde (3).

Amostras como: urina, suor e cabelo vem sendo estudadas e utilizadas para essa finalidade (2). O fluido oral vem sendo analisado por ser uma amostra obtida facilmente, não invasiva e de difícil adulteração, além de conter uma concentração maior das drogas originais do que seus metabólitos, quando comparado com o sangue. Porém, há desvantagens como o pequeno volume de amostra, baixa concentração dos analitos, mudança do pH da cavidade oral e a contaminação por outras drogas ilícitas de uso oral ou intranasal (4).

Considerando o tempo de detecção dos analitos e seus metabólitos em amostras biológicas, a ordem de identificação é sangue, fluido oral, urina, suor e mechas de cabelo. Porém, é importante salientar que essa disposição das amostras é preciso levar em consideração as propriedades farmacocinéticas e físico-químicas dos analitos (5).

O fluido oral é um composto complexo, que corresponde à saliva e outras secreções obtidas na cavidade bucal, como restos de alimentos, bactérias, restos celulares. Já a saliva é excretada por glândulas salivares presentes na boca, e é composta basicamente por proteínas e água, podendo ser liberado até 1,5L por dia (5).

Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) é o principal analito incluído na maioria das publicações para detecção de canabinoides em fluido oral (6,7). O THC presente na fumaça emitida durante o ato de fumar *Cannabis* penetra a cavidade oral resultando em altas concentrações de THC no fluido oral (8,9). Outros compostos canabinoides, considerados como canabinoides menores, como canabidiol (CBD) e

canabinol (CBN), podem ser utilizados para verificar o consumo recente de *Cannabis* (8, 10, 11). Dessa forma, a inclusão de um ou mais desses analitos em métodos de detecção para o uso de maconha pode auxiliar a interpretação dos resultados. Neste contexto o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método quantitativo, simples e rápido e de menor custo para detectar canabinoides em fluido oral utilizando um método de extração até o momento não descrito em outras publicações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e padrões

Metanol (grau HPLC) (Sigma- Aldrich), ácido clorídrico, hidróxido de sódio, acetato de etila P.A. (Sigma- Aldrich), acetonitrila (Sigma- Aldrich), agente derivatizante *N*, *O*-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida com 1% trimetilclorosilano (BSTFA-1% TMCS – Supelco) foram utilizados nas análises. Os padrões de THC, CBD e THC-COOH foram adquiridos da Cerilliant a Sigma Aldrich Company, Round Rock, Texas, EUA.

2.2 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo a gás TRACE 1300 GC System acoplado ao detector seletivo de massa quadrupolo (MSD) Thermo Scientific® ISQ Series (Thermo Fisher Scientific, Milão, Itália), com o auxílio do analisador automático AI 1310. A separação dos analitos foi realizada utilizando uma coluna capilar (30m x 0,25µm x 0,25µm) com 5% de fenilpolisilfenilenosiloxano (TR-5MS), fornecido pela ThermoScientific (Milão, Itália).

Modo de injeção: splitless

Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,7 mL/min.

Temperatura do injetor: 280°C.

Temperatura do detector: 300°C.

Programação da temperatura do forno: 120°C (1 min), 30°C/min até 300°C (3 min).

Tempo total de corrida: 14 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado nas seguintes condições:

Modo de ionização: ionização eletrônica (EI).

Modo de operação: SIM.

Temperatura da fonte de ionização: 230°C

2.3 Amostra biológica

Amostras de fluido oral isentas das drogas em estudo foram fornecidas por voluntários. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/UEM), CAAE nº 56482016.1.0000.0104, sob o parecer nº 3.466.244. As amostras foram coletadas em frascos de polipropileno e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da análise.

2.4 Otimização da extração por DPX

A extração em ponteira descartável – *Disposable Pipette Extraction* (DPX), técnica recente, refere-se a uma ponteira de pipeta, modificada. A extração acontece em fase sólida dispersiva, em que a amostra líquida entra em contato com o sorvente por meio de aspiração de ar, misturando as fases de forma apropriada (3).

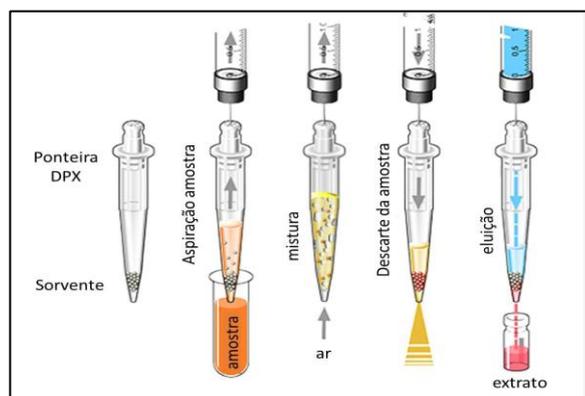


Figura 1. Representação esquemática da extração por ponteira DPX, adaptado (12).

A DPX compreende diversas fases para extrair o analito pretendido, como condicionamento, aspiração da amostra, lavagem e eluição. Uma ponteira modificada, contendo sorvente entre dois filtros em seu interior é acoplada a uma seringa comum de polipropileno, sendo esta o instrumento para extração (3).

Inicialmente é feito o condicionamento da fase extratora, com um solvente específico, para ativar os sítios das ligações. Para a extração de algumas drogas ou fármacos, essa etapa não se faz necessária. Posteriormente, a amostra adicionada dos padrões é aspirada para o interior da ponteira e misturada ao sorvente por meio da entrada de ar e, após 1 minuto, a amostra já pode ser dispensada. Em seguida é realizada a lavagem da fase extratora, utilizando um solvente baseado no tipo ou natureza química do sorvente, dos analitos de interesse e dos interferentes, descartando a amostra logo após. Após essa etapa, finalmente é realizada a eluição do sorvente com um solvente adequado para que seja feita a completa dessorção dos analitos adsorvidos. O eluato pode ser injetado diretamente em um cromatógrafo ou evaporado e reconstituído para maior e melhor detectabilidade analítica (3).

A otimização dos parâmetros da DPX visa avaliar a eficácia, a sensibilidade e a seletividade da extração, verificando o que pode ou não influenciar o método e a identificação dos analitos, com o objetivo final de obter melhores resultados. Foram manipuladas ponteiras de 1mL, conectadas a uma seringa de polipropileno de 10 mL da BD Plastipak®, empregada como dispositivo para a extração.

Para a metodologia, foram utilizados 200µL de água ultrapura para o condicionamento do sorvente aminopropil ligado quimicamente à sílica, pipetagem seguida de descarte; posteriormente foi aspirado 40µL de amostra negativa, acrescido de 40µL de cada padrão (THC, CBD e THC-COOH) na concentração de 200ng L⁻¹ cada, aspirando ar e mantendo dentro da DPX por 1 minuto, dando leves batidas para completa mistura dos analitos com o sorvente para melhor aderência, desprezando logo após; em seguida aspirou o solvente de lavagem 90:10 v/v (água ultrapura:acetonitrila), aspira/dispensa; e, por último, foi feita a eluição da amostra com 200µL de acetonitrila, sendo dispensada em um vial e evaporada em banho-maria (Evlab – Londrina-PR) a 40°C na capela coberta com papel Kraft®, pois o THC é foto e termo lábil, sendo necessário cuidados para reduzir a perda desse analito por degradação. Após seco, o eluato foi reconstituído com 50µL de agente derivatizante BSTFA + 1% de TMCS, agitado no vórtex por 1 minuto e colocado em estufa a 90°C por 30 minutos para derivatizar e posterior injeção no Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas (CG-EM) no modo SIM para identificação, sendo a corrida feita em 14 minutos. Para o THC foram observadas as massas de 303, 371 e 386; do CBD massas de 301, 337 e 390; e do THC-COOH massas de 371, 473 e 488.

O tipo de estudo foi a otimização analítica dos parâmetros da DPX, realizada de forma univariada, ou seja, avaliando um processo de cada vez. A análise estatística dos dados foi efetuada no software Microsoft Office Excel 2013®, observando a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação das áreas dos analitos pretendidos, no cromatograma.

2.4.1 Otimização da massa de sorvente

Com a finalidade de verificar com qual massa de sorventes analitos seriam melhores aderidos, as quantidades empregadas foram de 20mg, 40mg e 60mg e analisadas em triplicata.

No momento de preparo das ponteiras, foram adicionadas a fase extratora aminopropil ligados quimicamente à sílica e pesadas três com massa de 20mg, três com massa de 40mg e três com massa de 60mg. Após essa pesagem, a extração ocorreu conforme detalhado e posterior injeção no CG-EM para a identificação dos analitos.

2.4.2 Otimização do pH da amostra

Considerando que os analitos de interesse possuem características ácidas ou básicas, foi necessário avaliar a influência do pH. Para o preparo das amostras, foram utilizados HCl (6 mol.L⁻¹) para acidificar a amostra em pH 5,0, NaOH (8 mol.L⁻¹) para basificar a amostra em pH 8,0 e para o pH neutro foi usada a amostra de fluido oral sem alterações. No processo de extração, a DPX foi condicionada com solução tampão acetato com pH 5,0, solução tampão fosfato com pH 8,0 e água ultrapura para o pH neutro. As soluções tampão são utilizadas por resistirem a modificações de pH, tanto ácidas quanto básicas, e, por esse motivo, foram empregadas na metodologia a fim de não alterar a forma molecular dos analitos e o pH da amostra, e o resultado ser fidedigno.

A otimização do pH da amostra foi feita em triplicata, realizando o condicionamento da ponteira com as respectivas soluções tampão, modificando o pH da amostra para ácido (pH 5,0) ou básico (pH 8,0) e a extração seguiu de acordo com o que foi explicado.

3. RESULTADOS

No processo de otimização da ponteira DPX, foi avaliado a quantidade de fase extratora utilizada. Nessa etapa, os analitos ionizados, devido ao condicionamento realizado, interagem fortemente com os sítios iônicos do sorvente, em que ficam ligados, possibilitando fazer uma limpeza adequada, eficiente e sem grandes perdas.

Na figura 2 podem-se verificar as áreas médias dos picos do cromatógrafo dos respectivos analitos de interesse e as massas do sorvente aminopropil sílica empregadas, ou seja, de 20mg, 40mg e 60mg visando aumentar a eficácia da extração.

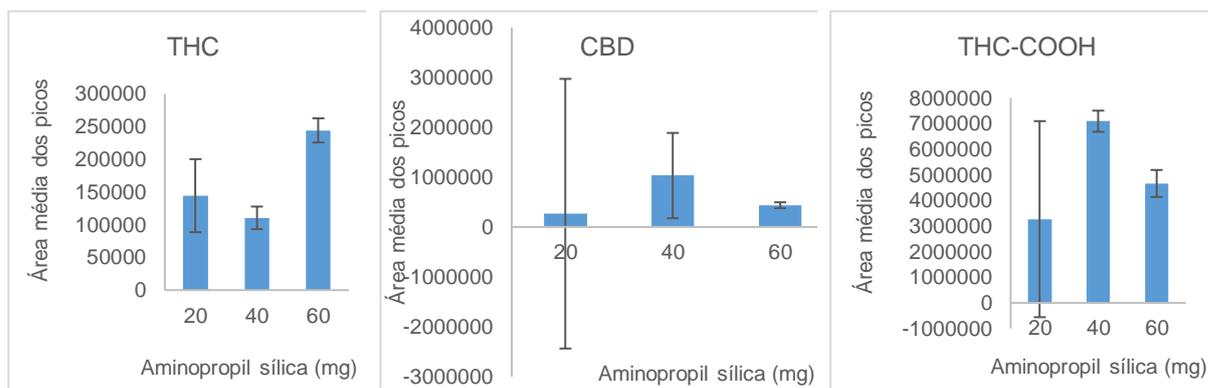


Figura 2. Médias das áreas dos picos e respectivos íons dos analitos de interesse das massas do sorvente aminopropil sílica 20mg, 40mg e 60mg, obtidas conforme a otimização da quantidade de fase sortiva.

CBD – Canabidiol; THC – Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; THC-COOH – 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxílico

O ajuste do pH da amostra e do solvente de condicionamento da fase extratora é importante, com o propósito de garantir interações compatíveis entre os analitos e o sorvente. Foram estudados o pH 5,0, neutro e pH 8,0, com suas respectivas soluções tampão. A figura 3 mostra com detalhes a influência do pH da amostra na extração.

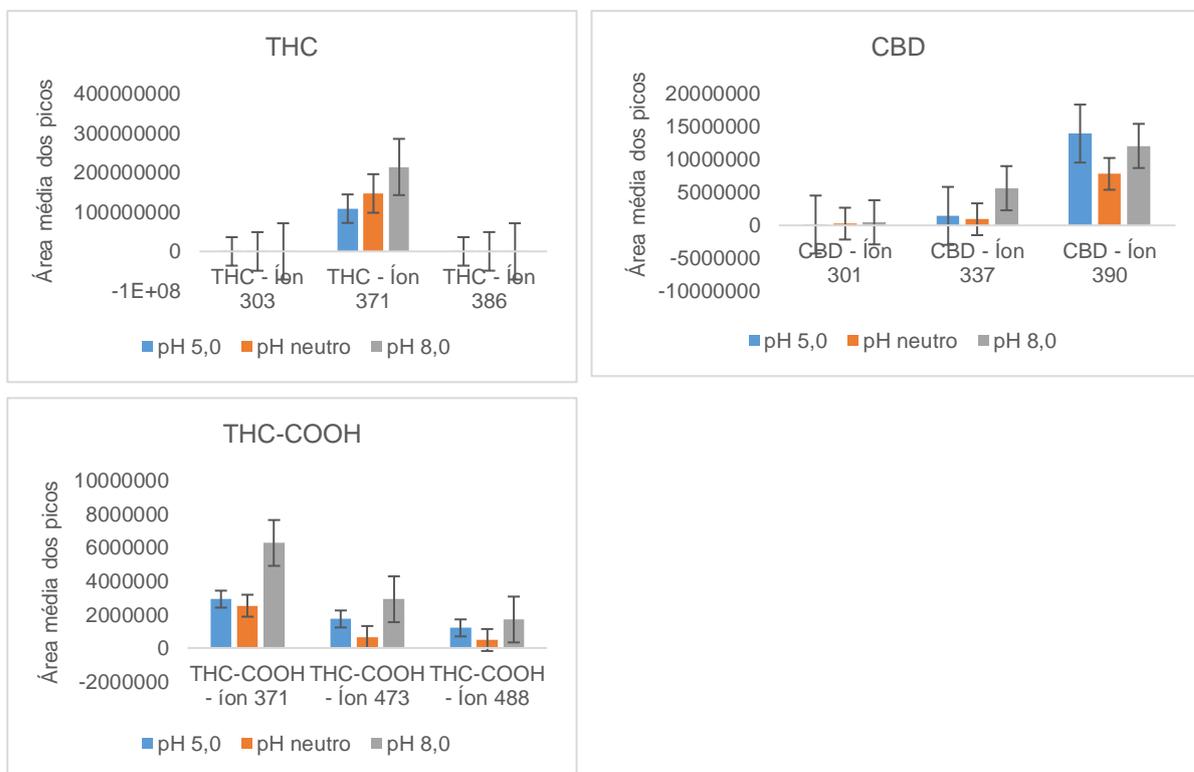


Figura 3. Médias das áreas dos picos e respectivos íons dos analitos de interesse, de acordo com a otimização do pH da amostra.

CBD – Canabidiol; THC – Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; THC-COOH – 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxílico

Na figura 4 pode-se observar o cromatograma obtido a partir da extração por DPX, comprovando a presença dos analitos de interesse da pesquisa. Na parte superior encontram-se os picos obtidos pela cromatografia gasosa com os seus respectivos tempos de retenção, e abaixo o espectrômetro de massas com todos os valores dos analitos estudados, injetados no modo SIM.

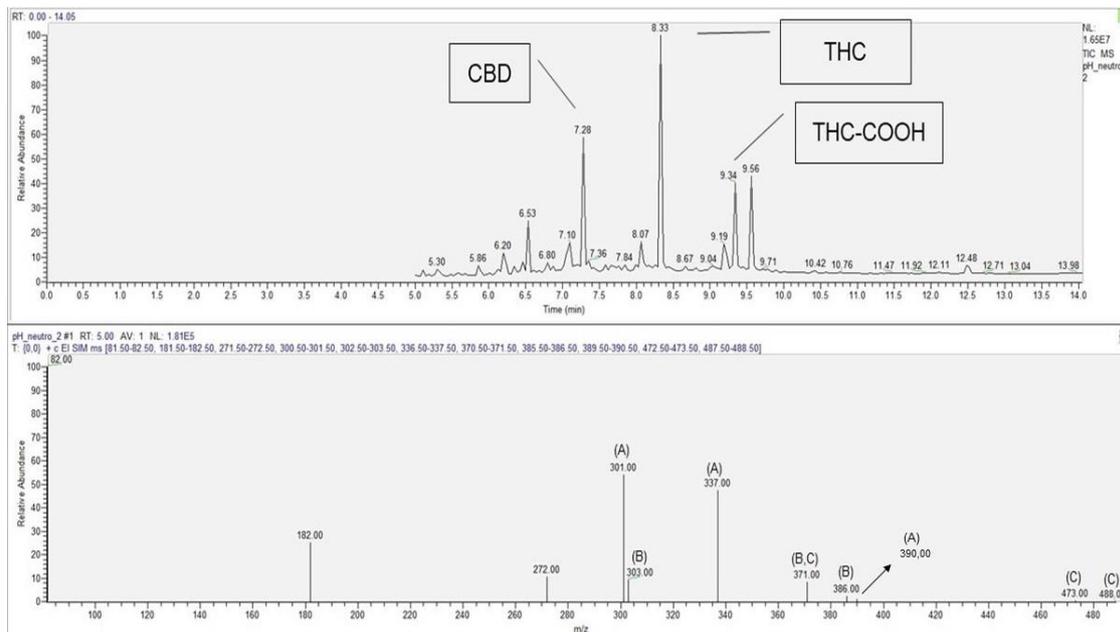


Figura 4. Cromatograma obtido pela extração dos analitos no fluido oral por DPX/CG-EM com adição de padrões na concentração de 200ng/mL

(A): CBD – Canabidiol; (B): THC – Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; (C): THC-COOH – 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxílico

4. DISCUSSÃO

A extração por DPX é uma variável da extração em fase sólida tradicional, que utiliza pouca quantidade de solvente orgânico, além de ser um método simples. Por ser uma metodologia de extração miniaturizada, a DPX possui vantagens de promover rápida sorção entre a amostra e o sorvente, em que os sítios ativos ficam ligados, tornando-se rápida, baixo uso de solventes e amostra, gerando alta recuperação e eficiência da extração (13).

4.1 Otimização da massa de sorvente

Sorventes ligados a reagentes organossilanos, utilizando a sílica como base, possuem cadeia carbônica hidrofóbica longa e maior seletividade e eficiência, pois retém analitos não polares (14). Compostos de polímero hidrofílicos, como é o caso do aminopropil, são adicionados a esses sorventes para reter grupos polares por possíveis interações secundárias, considerando a composição química dos analitos de interesse e dos solventes utilizados (15).

A quantidade de fase extratora utilizada na extração por DPX pode ser observada na figura 3, a medida que a quantidade de sorvente foi aumentada, a extração se mostrou mais eficiente, para a maioria dos analitos. Portanto, ficou definido a massa de 60mg de fase sorvente para prosseguir a extração.

4.1 Otimização da do pH da amostra

A análise do pH da amostra em uma extração em fase sólida é essencial, visto que os compostos possuem características físicas e químicas variadas, como por exemplo valores de pKa, podendo estar fracamente ionizados quando ligados a fase extratora, denotando menor retenção (16).

Estudando a figura 4, verificou-se que a otimização do pH foi favorável ao pH neutro para a maioria dos analitos pesquisados, no qual houve sorção satisfatória para a maioria dos metabólitos. Nesse pH encontra-se menor quantidade de espécies ionizadas, favorecendo a interação com a fase apolar. Assim sendo, ficou definido o uso da amostra “*in natura*”, ou seja, sem adição de ácido ou base, e a utilização da água ultrapura para o condicionamento do sorvente.

A literatura científica sobre o uso da DPX na bioanálise de drogas é limitada; quando comparada a SPE tradicional, que utiliza maior quantidade de sorvente e, conseqüentemente, de solvente orgânico; a eficiência da extração por DPX depende do tempo de equilíbrio de sorção entre a fase extratora e a amostra. Além disso, por ser uma técnica miniaturizada, uma das vantagens é a

utilização de menor volume de solventes, podendo ser adaptada durante o processamento da amostra paralelo ao alto rendimento, flexibilizando sorventes e solventes (17,18).

5. CONCLUSÃO

A utilização da DPX para extração de canabinoides em fluido oral é uma excelente alternativa de custo reduzido, fácil coleta e identificação, que permite a rápida detecção para uso recente dessa droga.

A otimização dos parâmetros da DPX auxilia em melhor extração e identificação das drogas de abuso e seus analitos, para obter resultados efetivos e satisfatórios. É importante realizar essa etapa para definir os procedimentos adequados e auxiliar em uma validação de metodologias de extração e identificação, para futura análise de amostras reais.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

1. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report, 2021. [Acesso em: 27 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html>.
2. Dorta DJ, Yonamine M, Costa JL da, Martinis BS de. Toxicologia forense. São Paulo: Blucher; 2018.
3. Pinto MAL, Queiroz MEC. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. Scientia Chromatographica. Ribeirão Preto, SP, 2016.
4. UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. Guideline for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid. United Nations. New York, 2014.
5. Bombana, HS. Análise de anfetamina, cocaína e tetrahydrocannabinol em fluido oral de motoristas de caminhão que trafegam em rodovias do estado de São Paulo. [Dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2016.
6. Wille SM, Fazio V.Di, Ramirez-Fernandez MM del, Kummer N, Samyn N. Driving under the influence of cannabis: Pitfalls, validation, and quality control of a UPLC-MS/MS method for the quantification of tetrahydrocannabinol in oral fluid collected with StatSure, Quantisal, or Certus collector. Ther Drug Monit. 2013; 35 (1): 101-111.
7. Molnar A, Lewis J, Doble P, Hansen G, Prolov T, Fu S. A rapid and sensitive method for the identification of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Forensic Sci Int. 2012;215(1-3):92-96.
8. Newmeyer MN, Derosiers NA, Lee D, Mendu DR, Barnes AJ, Gorelick DA, Huestis MA. Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled cannabis smoking in frequent and occasional smokers. Drug Test Anal. 2014, DOI: 10.1002/dta.1632.
9. Moore C, Coulter C, Uges D, Tuyay J, Linde Svan der, Leewen A van, et al. Cannabinoids in oral fluid following passive exposure to marijuana smoke. Forensic Sci Int. 2011;212(1-3):227-230.
10. Lee D, Schwoppe DM, Milman G, Barnes AJ, Gorelick DA, Huestis MA. Cannabinoid disposition in oral fluid after controlled smoked cannabis. Clin. Chem. 2012;58(4):748-756.
11. Anizan S, Milman G, Desrosiers N, Barnes AJ, Gorelick DA, Huestis MA. Oral fluid cannabinoid concentrations following controlled smoked cannabis in chronic frequent and occasional smokers. Anal Bioanal Chem. 2013;405(26):8451-8461.
12. Gerstel [Internet]. Disposable Pipette Extraction DPX. [Acesso em 02 de ago 2021]. Disponível em: <http://www.gerstel.com/en/dpx-scheme.htm>.
13. Bordin DCM. Exposição fetal: determinação de drogas de abuso em mecônio empregando a técnica de extração em fase sólida modificada e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. [Dissertação]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2013.
14. Novais AS, Filho JFR, Amaral EMF, Faria AM. Novo sorvente de hidrofobicidade reduzida para extração em fase sólida: preparação e caracterização. Quim Nova. 2015;38(2):274-279.
15. Li Y, Xie X, Lee ML, Chen J. Preparation and evaluation of hydrophilic C18 monolithic sorbents for enhanced polar compound retention in liquid chromatography and solid phase extraction. J Chromatogr A. 2011;1218(48):8608-8616.
16. Junior CASA, Silva NTM, Soares DF, Faria AM. Extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos de água superficial, empregando um sorvente de menor retenção. Quim Nova. 2018;41(6):641-647.

17. Chaves AR, Moura BHF, Caris JÁ, Rabelo D, Queiroz MEC. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. *JChromatogr A*. 2015;1399:1-7.
18. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr*. 2011;25(1-2):199-217.

Palavras-chave: canabinoides; saliva; cromatografia gasosa-espectrometria de massas.

Novas tecnologias e Diagnóstico laboratorial

ANÁLISES *IN SILICO* COM FOCO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA

Amauri Donadon Leal Junior¹; Flávio Augusto Vicente Seixas²; Erika Seki Kioshima³.

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

²Docente, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama/ PR

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

e-mail: amaurilealjunior@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses causadas pelos vírus da Dengue (DENV, do inglês), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) são problemas de saúde pública em vários países tropicais (1). No Brasil, estas viroses sustentam números alarmantes mesmo em anos atípicos, com mais de 500.000 casos prováveis de dengue até meados de abril (2). O boletim da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA) de 20/07/2021, apontou 27.170 casos confirmados e 32 óbitos ocasionados pela dengue (3). A principal forma de transmissão é pela picada dos mosquitos do gênero *Aedes* infectados, sendo a espécie *Aedes aegypti* a mais frequente no Brasil (4). Esta espécie também é capaz de carrear outros vírus como ZIKV e CHIKV, que tem sido responsáveis por complicações como a microcefalia em recém-nascidos (5) e dores incapacitantes com sequelas crônicas (6), respectivamente.

O diagnóstico diferencial das infecções causados por arbovírus tem sido um desafio. Alguns fatores podem estar contribuindo nesta problemática: (I) Os sintomas são inespecíficos e comum a todas elas, impossibilitando a diferenciação clínica; (II) Estes vírus muitas vezes cocirculam nas mesmas regiões geográficas; e (III) A fase virêmica é curta: de 5 a 7 dias (7). Neste intervalo em que o vírus circula no sangue (viremia), seu RNA pode ser pesquisado em amostras sorológicas. O padrão-ouro, neste período, é a PCR por transcriptase reversa (RT-PCR) (8), mas esta é uma técnica cara, bem como o equipamento necessário, além de exigir profissionais capacitados, dificultando sua aplicação em larga escala e em regiões de baixa-renda (9). Após o período de viremia, os diagnósticos laboratoriais objetivam outra estratégia, a detecção de anticorpos circulantes por sua complexação a epítopos virais: princípio da pesquisa de IgG e IgM em ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Apesar do desafio da reatividade cruzada (10) e da incapacidade de distinguir entre os sorotipos de dengue sugeridas como mais virulentas, como os sorotipos 2 e 3 (6), os testes sorológicos exigem um menor custo, tempo e treinamento profissional, elencando-os como boas ferramentas de sorovigilância e diagnóstico precoce.

Diversos métodos computacionais, conhecidos como análises *in silico*, vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos e têm se mostrado uma ferramenta muito útil e com boa acurácia na predição de novos epítopos para o avanço de vacinas e diagnósticos (11, 12). A eficiência da bioinformática se reflete também no curso do processo científico, já que as predições feitas por estas ferramentas elegem os resultados com maior potencial de sucesso experimental, economizando tempo e custos adicionais (13). Além disso, os constantes avanços e descobertas na área da biologia computacional bem como a expansão deste campo fornecem refinamentos contínuos em suas análises, conduzindo a cálculos mais robustos e melhores predições. Assim, essa vasta gama de técnicas de bioinformática pode ser útil na otimização de diagnósticos onerosos e laboriosos e solucionar o problema da falta de um único teste capaz de diferenciar as viroses acima. Diante deste cenário, o presente estudo como objetivo utilizar ferramentas *in silico* para obter antígenos específicos e estáveis para os vírus Dengue, Zika e Chikungunya, os quais serão empregados no diagnóstico sorológico diferencial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Alinhamento das sequências

As sequências de aminoácidos da poliproteína do DENV (quatro sorotipos) e ZIKV foram obtidas na plataforma *Virus Variation* (14), usando os filtros em hospedeiro (humano), localidade (América do Sul, do Norte e Europa) e data de depósito (de 2010 à agosto de 2019). Já as sequências de CHIKV foram obtidas na base de dados *UniProt* (15). Várias sequências obtidas do banco de dados para cada vírus e cada sorotipo foram alinhadas, com intuito de selecionar uma sequência consenso

da poliproteína de cada vírus e sorotipo. As cadeias com aminoácidos desconhecidos ou incompletas foram removidas. Um segundo alinhamento foi realizado para comparar entre os diferentes sorotipos e arbovírus. Os alinhamentos foram executados na própria base de dados e, a partir deles, foram selecionadas regiões específicas de cada vírus. As regiões selecionadas foram analisadas no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para avaliação de sua especificidade. Os critérios para considerar estas regiões específicas foram: cobertura total da sequência depositada e identidade de 100%. Para análise da conservação dos epítomos identificados como específicos, foi realizado um novo alinhamento, com um único filtro de localidade “América do Sul” para garantir a inclusão das cepas circulantes em nossa região. Este alinhamento foi conduzido para cada tipo viral, semelhante ao primeiro descrito nesta metodologia. As sequências foram consideradas conservadas quando os aminoácidos estavam presentes em todas ou na maioria das cepas contempladas neste terceiro alinhamento. As sequências aprovadas nesta etapa seguiram para os próximos passos do estudo.

2.2. Análise estrutural dos epítomos selecionados

Uma análise tridimensional das regiões selecionadas anteriormente foi realizada para avaliar a exposição dos epítomos na superfície da partícula viral. Para tal foi utilizada a base de dados PDB (16) para obtenção dos modelos 3D das proteínas e o programa VMD (17) para visualização.

2.3. Predição de epítomos

Uma análise das sequências foi realizada em preditores de epítomos computacionais para avaliar a imunogenicidade dessas regiões. Os servidores BepiPred 2.0 (18), Discotope 2.0 e EliPro foram utilizados para predição de epítomos lineares, o primeiro, e conformacionais, os outros dois, além da base de dados Immune Epitope Database (IEDB) para pesquisa de epítomos já identificados na literatura. Foram considerados os epítomos identificados por pelo menos uma destas ferramentas.

2.4. Predição da proteína quimérica e análise estrutural

As proteínas recombinantes quiméricas para cada vírus foram desenhadas utilizando os epítomos específicos selecionados. Várias estratégias foram avaliadas, variando a posição e quantidade dos fragmentos até se atingir a estabilidade proteica, calculada pela ferramenta ProtParam ExPASy (19). A predição da estrutura tridimensional das quimeras foi realizada através do servidor I-Tasser (20) e os modelos resultantes comparados com os modelos da base PDB. O dobramento proteico das quimeras calculado pelo I-Tasser foi visualizado no software VMD. As predições que apresentaram a conformação estrutural mais globular ou condensada possível foram eleitas para serem sintetizadas. Os modelos obtidos foram submetidos à dinâmica molecular para avaliação da estabilidade da estrutura.

2.5. Simulações de dinâmica molecular (DM)

As coordenadas espaciais das estruturas (quimeras) foram submetidas a simulações de dinâmica molecular de equilíbrio, por meio do pacote de programas NAMD2/VMD (17, 21) com o campo de força Charmm36 (22). Inicialmente as estruturas foram imersas em uma caixa com água em condições de contorno periódicas, cujas extremidades estavam a 10 Å da superfície mais externa da molécula. Quantidade suficiente de contra íons Cl⁻ foram adicionados para neutralizar as cargas do sistema. Na primeira etapa da simulação, o sistema foi minimizado e posteriormente submetido a 100 ns de dinâmica molecular de equilíbrio em condições NPT (número de átomos, pressão -1 atm - e temperatura -300 K - constantes). As análises foram realizadas a partir do arquivo com a trajetória da dinâmica molecular, em termos de raiz quadrada média da distância dos átomos da cadeia principal (rmsd), raio de giro dos átomos da cadeia principal (rgyr), ambos em função do tempo e, raiz quadrada média da flutuação dos carbonos alfa de cada resíduo após 80 ns da dinâmica (rmsf). As figuras foram geradas com o programa CCP4mg(23) e o ponto isoelétrico teórico calculado por meio do servidor ProtParam (19).

3. RESULTADOS

As sequências identificadas na proteína do envelope (E) do DENV, ZIKV e CHIKV e de membrana (M) dos flavivírus foram selecionadas, pois compõem as proteínas estruturais mais externas da partícula viral. A busca na base de dados Virus Variation recuperou 103, 86, 55, 64 e 431 sequências relacionadas a proteína E e 243, 182, 121, 120 e 426 sequências relacionadas a proteína M de Dengue (1-4) e Zika vírus, respectivamente. Através da plataforma UniProt, 911 sequências foram recuperadas relacionadas ao envelope do CHIKV. A partir destes dados, as sequências P27909, C1KKG4, V9IRM0, B5LNI2, A0A0X1LH65 e A0A2211H9 (UniProt ID) foram eleitas representantes de DENV (1-4), ZIKV e CHIKV, respectivamente, para comporem o segundo alinhamento.

Epítomos com baixa identidade entre as arboviroses foram selecionados após a análise dos alinhamentos: um na proteína M de cada flavivírus, DENV e ZIKV; dois na proteína E dos DENVs 1, 3 e 4 e; três na proteína E de DENV2, ZIKV e CHIKV. Estas mesmas regiões foram analisadas para diferenciar os quatro sorotipos do DENV e foram consideradas específicas. Como o vírus Chikungunya não possui proteína de membrana e sua proteína de envelope tem mais que o dobro de aminoácidos

que a dos flavivírus, o alinhamento entre eles apresentou baixa resolução evidenciada por excessivos *gaps* devido à distância evolutiva. Assim, o processo de seleção dos epítomos seguiu o mesmo passo das outras arboviroses, porém adicionado um epítopo já determinado experimentalmente depositado na base de dados IEDB que apresentou baixa identidade com os outros vírus. Na análise estrutural dos epítomos, os fragmentos selecionados na proteína E se apresentaram mais expostos à superfície quando comparados aos identificados na proteína M. Quanto à análise de especificidade por BLAST, todas as regiões selecionadas apresentaram 100% de identidade e cobertura.

Na predição de epítomos tanto os lineares quanto os conformacionais foram considerados. Observamos que todos os fragmentos selecionados foram calculados como pertencentes a epítomos lineares e/ou conformacionais. Além disso, ao menos um epítopo para cada vírus foi determinado experimentalmente por trabalhos depositados na base IEDB, exceto para os sorotipos 1 e 4 de DENV. As análises estruturais *in silico* das quimeras desenhadas para cada arbovírus, qDENV1-4, qZIKV e qCHIKV, foram consideradas estáveis e seus dobramentos majoritariamente globulares (Figura 1). O terceiro epítopo da proteína E de DENV2 e ZIKV foi rastreado para ajudar a compor a estabilidade estrutural de suas respectivas quimeras, seguindo todos os métodos já descritos, porém, considerando suas cargas para equilibrar a estrutura.

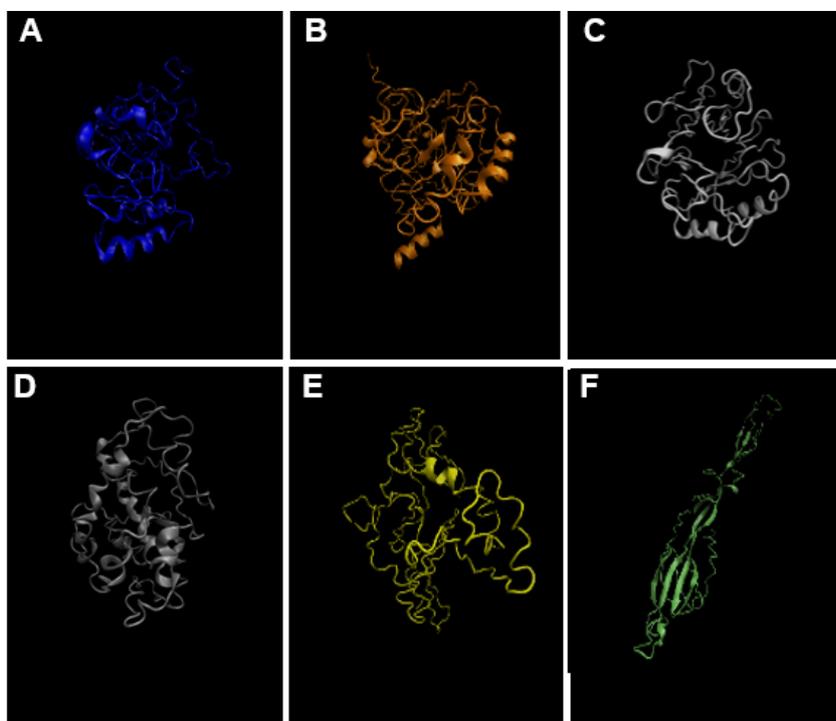


Figura 1. Representação do dobramento predito pelo *software* I-Tasser das quimeras qDENV1 (A), qDENV2 (B), qDENV3 (C), qDENV4 (D), qZIKV (E) e qCHIKV (F).

Nas análises de dinâmica molecular, observamos que após 80 ns, todas as estruturas entraram em equilíbrio termodinâmico, oscilando numa frequência constante, sendo que a proteína qZIKV foi a única que não atingiu este equilíbrio desde os 40ns de simulação (Figura 2). Também foram obtidas as análises dos raios de giro de cada estrutura, na qual observamos que as quimeras dos 4 sorotipos de dengue oscilaram numa frequência constante desde o início da simulação, enquanto que qZIKV e qCHIKV apresentaram uma diminuição desta métrica, indicando uma compactação da proteína ao longo da simulação (Figura 2). Como os raios de giro oscilaram numa frequência estável nos últimos 20ns de dinâmica, a estabilidade predita anteriormente foi reforçada por este resultado.

A análise da oscilação média dos carbonos alfa das quimeras mostrou um maior grau de liberdade nas porções terminais das proteínas. Também foi possível observar que regiões de alças (*loops*) apresentaram maior flutuação, como observado em qCHIKV, qDENV1, qDENV3 e qDENV4. Já as proteínas marcadoras qDENV2 e qZIKV apresentaram pouca mobilidade individual da cadeia principal. A análise do potencial eletrostático da superfície exposta ao solvente revelou que os pontos isoelétricos (pI) de apenas qDENV1, 3 e 4 são menores que 7, e que dentre as demais proteínas o maior pI foi de qZIKV. Também foi possível observar que na proteína marcadora qCHIKV a longa região de alça com alto grau de liberdade citada acima é composta por muitos resíduos apolares (neutros).

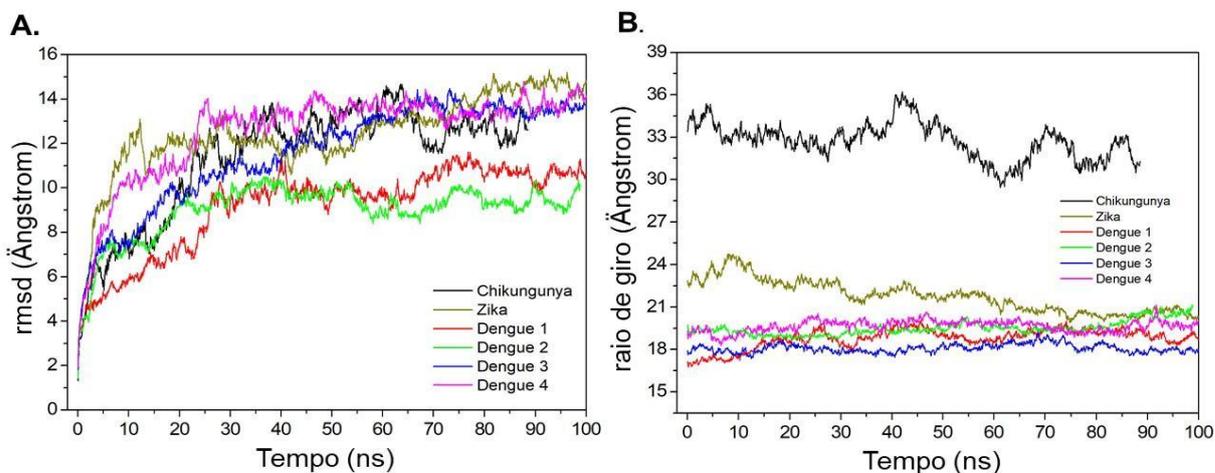


Figura 2. Principais resultados da dinâmica molecular: (A) frequência de vibração da cadeia principal das estruturas (rmsd) e (B) frequência de oscilação espacial entre o centro de massa e a borda externa de cada quimera.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico específico dos arbovírus têm sido um grande desafio não só pela sobreposição de sintomas e circulação entre eles, mas também pela característica de cada estratégia diagnóstica. A PCR, padrão-ouro, é altamente específica, porém, igualmente onerosa e laboriosa. Contrariamente, os testes sorológicos apresentam vantagens em sua execução, mas desvantagens quando tratamos de sua reatividade cruzada (10). Diante deste cenário, vimos na bioinformática uma alternativa para desenhar e analisar *in silico* potenciais proteínas marcadoras específicas para três grandes arboviroses, dengue, zika e chikungunya, aliando alta especificidade às vantagens em larga escala dos testes sorológicos.

Dentre as estratégias utilizadas, o alinhamento de sequências foi a primeira abordagem a indicar potenciais epítomos para o diagnóstico proposto. Honda, *et al*, usaram esta técnica para analisar a homologia entre os sorotipos de Dengue para selecionar bons epítomos para o diagnóstico sorológico (24). Em nosso estudo, também, utilizamos o alinhamento como recurso para rastrear resíduos de baixa identidade entre os diferentes sorotipos e vírus. Isto porque objetivamos a especificidade presente na composição das proteínas e suas conseqüentes interações bioquímicas.

Devido à alta homologia entre os arbovírus, as regiões selecionadas (exceto de CHIKV) se mostraram curtas, menores que 15 aminoácidos da maioria dos epítomos observados em outros estudos (25). Selecionar uma região pequena pode influenciar na força de ligação entre as quimeras e seus respectivos anticorpos, porém, com nossa estratégia de repetir epítomos nas proteínas marcadoras apresentamos mais sítios de ligação a uma maior quantidade de anticorpos, o que pode ser favorável quando realizados os imunoenaios.

O direcionamento do estudo à proteína de envelope dos vírus é uma estratégia com bons resultados presentes na literatura. Chávez, *et al*, evidenciaram vantagens no uso desta proteína em diagnósticos diferenciais de flaviviroses através de um compilado de resultados promissores, incluindo uma especificidade de 100% para Dengue (26). Resultados semelhantes foram observados por Khan, *et al*, em testes sorológicos utilizando proteínas recombinantes do envelope de Chikungunya (27). Estes achados corroboram com o uso desta proteína, visado no rastreo de epítomos, e conservação funcional destes antígenos através da produção heteróloga, conforme planejamos em nossos próximos passos. Além disso, adicionamos uma porção da proteína de membrana como potencial marcador para o diagnóstico diferencial, podendo aumentar ainda mais a sensibilidade de testes sorológicos.

Os epítomos selecionados aqui compõem regiões de alças (*loops*), na superfície viral. Rubinstein, *et al*, associaram esta conformação estrutural à presença de epítomos, substanciando nossos resultados, porém, os autores ainda observaram uma baixa conservação neste tipo de estrutura (25). Contrariamente, verificamos uma alta conservação destas regiões nas cepas sul-americanas e uma alta taxa de correspondência na análise por BLAST, sugerindo alta especificidade e provável relevância na relação sequência-estrutura-função destes peptídeos.

Tendo em vista que aproximadamente 90% dos epítomos nativos caracterizados são conformacionais (28), observamos que muitos dos fragmentos selecionados podem ser reconhecidos por um grupo maior de anticorpos, porém, dependentes da conformação espacial da proteína

marcadora. Como a composição de epítomos lineares se dá de forma sequencial, estes antígenos podem ser reconhecidos mesmo com a proteína desnaturada, assim, nossos resultados identificaram porções que podem ser reconhecidas por anticorpos em diferentes apresentações estruturais, sugerindo um menor escape de anticorpos.

A estabilidade e compactação consistentes das quimeras desenhadas para cada sorotipo e vírus, observados na DM (Figura 2), tornam estas proteínas boas candidatas para a produção heteróloga. Apesar dos resultados promissores, as estruturas qZIKV e qCHIKV devem ser consideradas quanto a sua presença em corpos de inclusão devido a seus altos pls e presença de uma longa alça hidrofóbica (para Chikungunya). A purificação de proteínas nestas condições poderá exigir o uso de desnaturantes, porém, como construímos ambas com epítomos lineares, inclusive, a interferência deste procedimento no imunoenensaio pode ser reduzida.

Devido ao caráter inventivo apresentado neste trabalho, trabalhamos com a possibilidade de um depósito de proteção intelectual, o que impossibilita a divulgação da sequência de aminoácidos das quimeras desenhadas e, conseqüentemente, limitou o uso de algumas ferramentas computacionais que não garantem o sigilo da composição estrutural e que poderiam trazer análises mais profundas acerca das proteínas marcadoras.

5. CONCLUSÃO

As ferramentas de bioinformática nos permitiram rastrear e analisar epítomos específicos para ZIKV, CHIKV e cada sorotipo de DENV. Através de um design racional de proteínas quiméricas compostas por estes fragmentos, desenhamos antígenos estáveis que serão candidatos promissores a aplicação no diagnóstico diferencial das arboviroses.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009.
2. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 16, 2021. Boletim Epidemiológico; 2021.
3. Governo do Paraná, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Informe Técnico 41. 2021
4. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA). Boletim Epidemiológico. 2019.
5. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016; 534(7606):267.
6. Zanotto PMA, Leite LCC. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. *Front Immunol*. 2018; 9:1964.
7. Kerkhof K, Falconi-Agapito F, Van Esbroeck M, Talledo M, Ariën KK. Reliable serological diagnostic tests for arboviruses: feasible or utopia?. *Trends Microbiol*. 2020; 28(4), 276-292.
8. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(4):860-7.
9. Shukla S, Hong S-Y, Chung SH, Kim M. Rapid detection strategies for the global threat of Zika virus: current state, new hypotheses, and limitations. *Front Microbiol*. 2016; 7:1685.
10. Fritzell C, Rousset D, Adde A, Kazanji M, Van Kerkhove MD, Flamand C. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(7):e0006533.
11. Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An introduction to B-cell epitope mapping and *in silico* epitope prediction. *J Immunol Re*. 2016; 2016.
12. Zeng X, Legge F, Huang C, Zhang X, Jiao Y, Treutlein H, et al. Computational Prediction of the Epitopes of HA1 Protein of Influenza Viruses to its Neutralizing Antibodies. *Antibodies*. 2019; 8(1):2.
13. Saha D, Emram TB, Paul S. Bioinformatics: The effects on the cost of drug discovery. *Galle Med J*. 2013; 18(1):44-50.

14. Hatcher EL, Zhdanov SA, Bao Y, Blinkova O, Nawrocki EP, Ostapchuck Y, et al. Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D482-D490.
15. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2018; 47(D1):D506-D15.
16. Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide protein data bank. *Nat Struct Biol.* 2003; 10(12):980.
17. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996; 14(1):33-8.
18. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(W1):W24-W29.
19. Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788(2003).
20. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010; 5(4):725.
21. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem.* 2005; 26:1781–802.
22. Mackerell Jr. AD, Feig M, Brooks III CL. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2004; 25:1400–15.
23. McNicholas S PE, Wilson KS, Noble MEM. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2011; 67: 386-394.
24. Honda ER, Zanchi F, Rios K, Lira E, DeusileneVieira, da Silva LHP, et al. Design and heterologous expression of dengue virus envelope protein (E) peptides and their use for serological diagnosis. *J Virol Methods.* 2012; 186(1-2):55-61.
25. Rubinstein ND, Mayrose I, Halperin D, Yekutieli D, Gershoni JM, Pupko T. Computational characterization of B-cell epitopes. *Mol Immunol.* 2008; 45(12):3477-89.
26. Chávez JH, Silva JR, Amarilla AA, Moraes Figueiredo LT. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals.* 2010; 38(6):613-8.
27. Khan M, Dhanwani R, Kumar JS, Rao PVL, Parida M. Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. *J Med Virol.* 2014; 86(7):1169-75.
28. Van Regenmortel MHV. What Is a B-Cell Epitope? *Methods Mol Biol.* 2009; 524:3–20.

Palavras-chave: sorologia diferencial; proteína recombinante; bioinformática.

SAFETY OF THE NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY –NAT ASSOCIATED WITH THE SEROLOGICAL TESTS FOR THE DETECTION OF BLOOD DONORS WITH HBV/HCV/HIV IN THE DIAGNOSTIC WINDOW PERIOD OR THE PRESENCE OF OCCULT INFECTIONS: A SYSTEMATIC REVIEW

Heloise Skiavine Madeira¹; Aline Ávila Brustolin²; Marcos Elias Da Silva Almeida¹; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro¹; Raul Gomes Aguera¹; Jorge JuarezVieira Teixeira³

¹Graduate Student (Master's degree), Biosciences and Pathophysiology Program, State University of Maringá, Maringá, PR

²Graduate Student (Doctorate degree), Health Sciences Program, State University of Maringá, Maringá, PR

³Professor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

e-mail: heloskima@gmail.com

1. INTRODUCTION

The transfusion process is a care activity of high epidemiological risk since it is living tissue capable of transmitting diseases (1). Among the diseases that the blood transfusion procedure can transmit, those caused by viruses are numerous. The reduction in the transmission of these infections continues to be one of the main targets of studies in the area of hemotherapy (2).

In Brazil, approximately five million collections and donations occur annually, with a single blood donation capable of saving the lives of up to four people (3). Muhlbacher et al. (2013) report that the greatest threat to transfusion safety is a donation by people infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis B (HBV) and Hepatitis C (HCV), in the process of seroconversion, as it is an asymptomatic period (4). It is important to highlight the existence of the period between the moment when the infection occurs and the detection of the presence of serological markers in the blood, defined as the window period, in which the infectious agent is already present in the bloodstream, and transmission may occur once that conventional tests do not detect (5).

Fiebig et al. (2003), describe that the absolute guarantee of detection of infectious agents is not provided by any laboratory test performed so far, due to the period of viral eclipse, which occurs in the cycles of HIV and HCV, not always being possible to detect antigens and viral RNA in this period, which lasts approximately five days after infection. In the post-eclipse phase, when the exponential replication phase starts, the detection of viral RNA by the Nucleic Acid Technology (NAT - Nucleic Acid Amplification Test) becomes significant (6). Thus, possible contamination through blood transfusion depends on the stage in which the donor is in the diagnostic window and, consequently, the later this stage is before the initial period of NAT detection, the greater is the residual risk for a given virus (7).

The effectiveness of the technology in question is already proven by several scientific researches, and over the years and longer use, especially in Brazil, its effectiveness, which represents the detection by NAT with negative serology, has also been studied.

We investigated in four databases through a systematic review, scientific publications that used NAT associated with serological tests for patient screening, HBV/HCV/HIV, in favour of the safety and quality of blood components in blood banks.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Search Strategy

The research was conducted according to the PRISMA protocol (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (8). It began with the definition of research descriptors by four researchers. The databases used were PubMed, Web of Science, Scopus and Embase. The search in PubMed followed the strategy of MeSH

terms (Medical Subject Headings) and in Web of Science and Scopus the search was by subject, titles, keywords and abstract. The terms of research were organized into three blocks. In the first block, "Nucleic Acid Amplification Techniques"; "Serologic Tests"; in block 2 "Blood Donors" and in block 3 "Hepatitis C"; "Hepatitis B virus"; "Hepacivirus"; "Hepatitis B"; "HIV". In the Embase database, an advanced search was performed using the terms "Nucleic acid amplification"; "Serologic tests"; "Blood donor"; "Hepatitis B"; "Hepatitis C"; "Human Immunodeficiency Virus"; "Hepatitis B virus"; "Hepacivirus". The filters applied were for English language, human and available abstract, regardless of the period published.

2.2. Selection criteria and quality assessment of articles

Based on the titles and abstracts, the researchers, by consensus, selected the articles. Comments, reviews, editorials, letters, case reports, interviews, news, guidelines, errata, studies that compared molecular techniques and cost-effectiveness were excluded. All phases involving the studies were carried out randomly.

2.3. Data extraction

For data extraction and inclusion, nine studies were selected a priori. The researchers defined the information for the composition of the table. Relevant information was extracted from each article: author, country, research site, study period, objective, which infection each article addressed (HBV and/or HCV and/or HIV), number of donors in which the tests were performed, a method said in the NAT, limitations in the study and statistical analysis.

3. RESULTS

The search strategy in the four databases allowed to identify 226 records. Of these, 80 were duplicated, with 146 articles remaining. By reading the titles and abstracts, 74 articles were excluded for not meeting the study objectives. Next, of the 72 articles selected for full reading, 64 were excluded for not contemplating the research proposal, resulting in eight publications for the final sample. Finally, by checking the bibliographic references, one article was retrieved, totaling nine articles (9-17).

The selected studies were published from 2000 to 2013, with a sample size ranging from 175 to 735,000 candidates for donation. The Asian continent was predominant as the location for the studies (9-16). Screening for the three infections occurred in most studies (9, 10, 13, 14, 15, 17), of which two HIV types 1 and 2 were evaluated (9-10) and three only donors with Hepatitis B (14-15, 19).

For the methodologies, both for NAT and for serology, the kits used were varied. In NAT, one study used only Transcription-Mediated Amplification (TMA) (9), while eight used the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to detect and analyze specific sequences of viral DNA/RNA (10-17). In serology, several serological markers were evaluated, depending on each infection and the specific objective of each study.

All studies had quality control (confirmatory, serological and/or NAT tests performed). Of the nine studies, five (55.5%) used serology as confirmatory tests (9-13), and three studies confirmed positive results with a new test for NAT (14-16); and one article used both methodologies (serology and NAT) to confirm positive tests (17). Only four studies performed the statistical analysis, and two described the limitations, among which they did not state what proportion of cases of NAT yield for HBV represent occult infection, as they did not analyze the anti-Hbc serological marker, as well as the impossibility of monitoring donors to observe seroconversion (13) (Table 1).

Of the analyzed studies, three (13-15) did not perform a NAT test for confirmation when serology was positive. Of the nine studies included, two did not report cases of occult infection or diagnostic window (WP) (9, 15). Six studies identified donors in a period of occult HBV infection (OBI) (10-12, 14, 16-17) and five identified cases of WP (10, 12-14, 17).

Of the studies that analyzed only HBV infection (11-12, 16), all three identified cases of occult infection, and one identified cases of WP (12). Of the 6 articles that studied the three infections, two found cases of WP for each infection (13, 17), and two studies also found cases of OBI (14, 17).

The period of seroconversion identified for each infection, when comparing studies (10, 14), was similar for HCV infection. Regarding WP cases, the largest number of cases was HBV infection, followed by HCV and HIV infection, with a total of 45 cases of WP for HBV, ranging from 30 to 90 days; 33 cases for HCV ranging from 64 to 70 days and 17 cases for HIV, not being reported in any study days for seroconversion. As for occult HBV infection, 86 cases were

reported in the studies. Four out of nine articles (44.4%) did not estimate the residual risk (RR) of infection transmission (11-12, 15-16). Of the nine selected studies, the number of donors with positive serology and NAT was 850 for HBV, 48 for HCV and 723 for HIV. The correspondence of negative serological tests to positive molecular tests (NAT), regardless of the type of technique when used, obtained a positivity of 13.5% for HBV, 8.3% for HCV and 2.2% for HIV (Table 2).

Table 1. Characteristics of included studies in the systematic review

Study/ Country	Period of study	Infection (HIV, HCV, HBV)	Number of donors	Method		Results	Conclusion
				NAT method	Serologic assay		
Kosan, E., et al. 2010 ⁹ / Turkey	February 2007 to March 2008	HIV (1 and 2), HBV, and HCV.	18,200	Procleix Ultrio kit (TMA)	Test for anti-HIV/1–2, anti-HCV, HBsAg: Vironostika HIV Ag/Ab; Innostest HCV Ab III. Heparostika Ultra HBsAg. Serology (+) NAT (-): antiHbC test; anti-HBe test. Confirm the anti-HIV and anti-HCV tests: immuno-blot test. Serology (-) NAT (+): micro-ELISA	Anti-HIV/ 1–2 positive: 24 (0.13%). Anti-HCV positive: 66 (0.36%). HBsAg positive: 318 (1.75%). NAT discrimination test: HIV/1 positive 4 (0.02%), HCV positive: 12 (0.06%), HBV-DNA positive: 312 (1.72%).	The number of serologic-negative and NAT positive donors was higher than those of other studies and a viral risk (HBV, HCV) was found in 1 of 1400 transfusions.
Li, L., et al. 2008 ¹⁰ / China	July 30 to September 17, 2006	HIV (1 and 2), HBV, and HCV.	10,824	COBAS AmpliScreen tests (PCR - HBV, HCV, and HIV-1)	Routinely screened: HBsAg; anti-HCV; anti-HIV1/2. Confirmation tests: HBsAg neutralization test; anti-HCV immunoblot assay; anti-HIV-1/2 Western blot; anti-HBc IgG; anti-HBc IgM; anti-HCV; HBsAg with the PRISM.	The 95 % LOD: HBV 5.09; HCV 11.83 and HIV 62.53 IU/mL. Seronegative donations (10,727): HBV NAT 12 (0.11%); HCV NAT 1 (0.01%). HCV yield case was a window case; all HBV NAT yield cases were occult carriers.	The use of NAT detected occult HBV and reduced HCV window period. The yield rate, especially occult HBV, was 10- to 100-fold higher than that in developed, HBV nonendemic countries.
Lin, K. T., et al. 2013 ¹¹ / China	NR	HBV	5,973	MPX v2 test (PCR) and Procleix Ultrio (TMA)	Initial screening: HBsAg; anti-HCV; anti-HIV-1/2. HBV and Anti-HCV positive: Vitros Immunodiagnostic test; Abbott AxSYM 3.0. Anti-HIV-positive - HIV BLOT 2.2.	8 NAT-only-reactive donors were identified, and follow-up samples were obtained from 6. All 8 donors had an occult HBV infection with viral loads <12 IU/mL.	The introduction of the MPX v2 test in regions with a high prevalence of HBV would add an extra layer of safety to the blood supply by interdicting samples from donors with an occult HBV infection.

Louisirirotc haNakul, S., et al. 2011 ^{12/} Thailand	NR	HBV	175	Procleix ultrio (TMA) and AmpliPrep/COB AS TaqMan HBV (PCR)	Immunologic screening of index blood donations: HBsAg; anti-HCV; anti-HIV. HBV NAT–reactive/HBsAg–negative index samples: HBsAg; anti-HBs; total anti-HBc; HBeAg; anti-HBe.	Of 175 HBV NAT–yield donors, 72 (41,1%) were followed: 19 donors NAT reactive but negative for all HBV serologic markers, 7 seroconverted to HBsAg and 8 seroconverted to anti-HBc and anti-HBs. 15 donors were in the HBV window period; 13 donors had an occult HBV infection.	The majority of donors detected during routine screening, who were HBsAg negative and NAT reactive, had an occult HBV infection, thus validating the decision to introduce NAT for blood donations in Thailand.
Moiz, B., et al. 2014 ^{13/} Pakistan	April 2011 to November, 2012	HBV, HCV and HIV-1	42,830	Multiplex PCR; RT-PCR.	Tests: Anti-HIV 1/2; Anti-HCV and HBsAg. Routinely screened: CLIA Confirmation tests: ELISA–positive samples by HIV-1 Western blotting.	There were 1526 donors having 1571 abnormal screening results with 45 who were serologically reactive: HCV antibodies (n= 708), HBsAg (n= 555), HIV antibodies (n= 29). 35 NAT-reactive samples were identified: one HIV-1; 27 (55%) HCV; and HBV 7 (14%).	The current risk of transfusion-transmitted viral infections attributable to blood donation is high in this country. The study recommends the parallel use of serology and NAT screening of donated blood in countries with high seroprevalence of these viral infections.
Niazi, S. K., et al. 2015 ^{14/} Pakistan	September 21, 2012, to September 20, 2013	HBV, HCV and HIV	56,772	Multiplex PCR kit - Cobas TaqScreen MPX test, (qPCR). MP-NAT reactive: ID-NAT.	Automated immunoassay analyzer, (for HBsAg, anti-HCV, and HIV antigen-antibody combination assay.	2334 blood donors were found to be reactive; 719 were reactive for HBsAg, 1046 for anti-HCV, 12 for HIV, and 557 for syphilis antibodies. Between 54,438 seronegative donors: 27 NAT-reactive donors: 23 for HBV DNA and 4 for HCV RNA.	NAT led to interdiction of donations from 23 hepatitis B– and 4 hepatitis C–reactive donors in 1 year, thus improving the safety index of our blood products. NAT has improved the safety of blood products.
Selim, H. M., et al. 2013 ^{15/} Saudi Arabia	January 2009 and June 2011	HBV, HCV and HIV-1	12,437	RT-PCR Cobas AmpliPrep. NAT-PCR was repeated ID - NAT	EIA: HBsAg, HBcAb (total), HCV anti-HIVp24Ag/Ab, and anti-HIV-1 and anti-HIV-2.	405 seropositive donors. 12,032 seronegative: NAT 5 (0.042 %) were positive for HCV and 2 (0.017 %) for HIV-1.	The introduction of MP NAT screening for blood donors in blood bank allowed better detection of TTVs, especially for HCV and HIV-1

Yoshikaw, A., et al. 2007 ¹⁶ / Japan	February 1, 2000, to March 31, 2003	HBV	328	Semiautomated multiplex assay system (Amplinat MPX-PCR). HBV DNA detected: sample was analyzed with ID NAT.	<p>HBsAg: EIA, CLIA.</p> <p>Anti-HBc: EIA, Hemagglutination inhibition assay.</p> <p>ALT: By machinery with reagents of transaminase HR-II.</p>	Of 328 NAT-positive donations, 26 were from donors who could be followed-up in both increasing and decreasing phases of HBV DNA load. 6 of these had both HBsAg and HBV-DNA detectable viremia longer than antigenemia. 3 OBI was identified.	The NAT is not only valuable for detection of low HBV DNA levels in the pre- and post-HBsAg window periods, but also may be capable of identifying higher levels of viremia in anti-HBc-negative donors with occult HBV infection in either an acute or chronic stage.
Vermeulen et al. 2009 ¹⁷ / South African	October 1, 2005 to September 30, 2006	HBV, HCV and HIV	732,250	ID-NAT (Ultrio on Procleix Tigris, Chiron) and HIV Versant bDNA 3.0 viral load assay qPCR	<p>Serology: Chlia (PRISM Abbott); EIA to HIV and HCV and neutralization test for HBsAg. Versant bDNA 3.0 viral load assay. Innostest p24 antigen assay.</p>	HIV positive 738 (prevalence 1:1992); HBV positive 515 (prevalence 1:1422); HCV positive 39 (prevalence 1:18.800). The residual risk obtained in this work was 6.98 to HIV, 48.45 to HBV and 0.061 to HCV.	One-year ID-NAT screening of 732,250 donations interdicted 16 HIV, 20 HBV, and 1 HCV window phase donations and 42 anti-hepatitis B core antigen-reactive infections during an early recovery or a later stage of occult HBV infection.

HBV: hepatitis B virus; HBC: antibody against viral core antigen of HBV; HCV: hepatitis C virus; HIV: human immunodeficiency virus; HBsAg: hepatitis B virus surface antigen; HBeAg: hepatitis B e antigen; PCR: qualitative polymerase chain reaction; qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; MP-NAT: mini-pool nucleic acid test multiplex assay; ID-NAT: individual donation nucleic acid test; TMA: Transcription Mediated Amplification; EIA: enzyme immunoassay; ELISA: enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLIA: chemiluminescence immunoassay methodology; ALT: alanine aminotransferase enzyme; OBI: occult hepatitis B infection; LOD: Limit of detection; NR: no reported.

Table 2. Serological and molecular characteristics, residual risk, window period and cases of occultinfection, according to HBV, HCV and HIV infection.

	Serology (+)/ NAT (+)			Serology (-) NAT (+)			Residual risk (RR)	Cases of window period (days)	Cases of occult infection
	HB V	HC V	HI V	HB V	HC V	HI V			
Kosan, E., et al. 2010 ⁹	297	9	3	11	2	0	HBV: 1:1,654 HCV: 1:9,100	NR	NR
Li, L., et al. 2008 ¹⁰	48	10	0	12	1	N R	HBV: 1:900 (0.11%) HCV: 1:10,000(0.01%)	HBV: 0 HCV= 1 (64 days)	HBV: 12
Lin, K. T., et al. 2013 ¹¹	6	-	-	8	-	-	NR	NR	HBV: 8
Louisirirochan akul, S., et al. 2011 ¹²	38	-	-	-	-	-	NR	HBV: 15 (30 to 90 days)	HBV: 13
Moiz, B., et al. 2014 ¹³	NR	NR	N R	7	27	1	HBV: 1: 10,900 HCV: 1: 13,900 HIV: 1: 62,600	HBV: 7 HCV: 27 HIV: 1	-
Niazi, S. K., et al. 2015 ¹⁴	NR	NR	N R	23	4	0	HBV: 62.5: 1.000.000 HCV: 4.4: 1.000.000	HBV: 3 (39,5da ys) HCV: 4 (70 days) HIV: 0	HBV: 14 (61%) (6 non WPor OBI)
Selim, H. M., et al.2013 ¹⁵	NR	NR	N R	0	5	2	NR	NR	NR
Yoshikawa, A., etal. 2007 ¹⁶	26	-	-	3	-	-	-	NR	HBV: 3
Vermeulen et al.2009 ¹⁷	435	29	72 0	62	1	16	HIV: 6.98 (1: 143.226) HBV: 48.45 (1: 20.642) HCV:0.061(1:16.226 .41)	HBV: 20 HCV: 1 HIV: 16	HBV: 36

NR: no reported; RR: residual risk; OBI: occult hepatitis B infection; WP: window period.

4. DISCUSSION

The biggest challenge faced in the transfusion service is to offer safe blood products that meet the patient's needs. This is important due to the high prevalence of communicable infections, as well as the low percentage of voluntary donors and the lack of standardization of screening procedures (18).

Regarding the window period, the most significant number found were cases of HBV infection. Leme and Levi (2018) (19), when screening 673,859 blood donations in the NAT test for HIV and HCV and 357,137 in the NAT test for HBV, detected six diagnostic windows, four for HIV and two for HBV. Scuracchio et al. (2007) (20) identified by NAT two donors in the window period, after screening 47,866 donations in 18 months. Fiedler et al. (2019) (21), when verifying the effectiveness of NAT for HIV, HBV and HCV from 2008 to 2015 in Germany, obtained on average, per year, from 3 to 6

donations with HBV infection detected only by NAT screening, resulting in, 29 positive cases. Regarding HIV, 20 cases were detected by NAT and 61 for HCV.

In this study, nine articles showed that NAT is a safe and effective methodology, being a valuable tool in the process of detecting blood-transmissible infections, being complementary to serological tests, evidenced in other studies. Fiedler et al. (2019) (21), when comparing serology and NAT for HBV, HCV and HIV, concluded that NAT is a screening strategy that guarantees a high standard of blood safety. Cable et al. (2013) (22), corroborate that the safety of blood in relation to the potential of HBV transmissions has been improved with the introduction of the NAT test.

Caetano et al. (2006) (23) have shown that differences regarding the prevalence of positivity to serological markers may vary between regions, due to factors such as previous screening of blood donors, the profile of the donor who seeks the blood bank, percentage of people who donate blood for the first time and tests with different techniques used in serological research. In this sense, expressing the discrepant results is important due to the impact it has on hemotherapy routines, since the bags undergo all the processing and their blood components are discarded.

5. CONCLUSION

The systematic review made it possible to validate positive correspondence between the serological and molecular tests of donors with HBV, HCV, HIV, evidencing the safety of the technology in the screening process.

REFERENCES

1. Paula J, Camargo J, Kalinke L, Slob E. A educação continuada em enfermagem norteando a prática em hemoterapia: uma busca constante pela qualidade. *Prat Hosp.* 2007. 51:125-31.
2. Allain JP, Stramer SL, Proietti ABFC, Martins ML, Lopes da Silva SN, Ribeiro M, et al. Transfusion- transmitted infectious diseases. *Biologicals.* 2009 Apr; 37(2):71-7.
3. Panhan M. (In)segurança transfusional. *HEMO em Revista*, n.24, 2013. Disponível em: <http://hemoemrevista.com.br/materia-selecionada.php?id=57>.
4. Muhlbacher A, Schennach H, Van Helden J, Hebell T, Pantaleo G, Bürgisser P. et al. Performance evaluation of a new fourth-generation HIV combination antigen-antibody assay. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202(1):77-86.
5. Anjos EBV, Costa SCB. Análises moleculares dos vírus HIV-1 em candidatos a doadores de sangue de Pernambuco com testes sorológicos positivos e inconclusivos para o HIV-1 [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas; 2009.
6. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, Sep 5;17(13):1871-9.
7. Busch, MP, Satten, GA. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am J Med.* 1997 May 19;102(5B):117-24.
8. Beller EM, Glasziou PP, Altman DG, Hopewell S, Bastian H, Chalmers I, et al. PRISMA for Abstracts: Reporting Systematic Reviews in Journal and Conference Abstracts. *PLoS Medicine.* 2013;10(4):e1001419.
9. Kosan E, Kocazeybek B, Altunay H, Aymelek M, Esra A, Saribas S et al. Can the nucleic acid amplification test (NAT) be an alternative to the serologic tests? A prospective study, the results of 18,200 blood donors from the Turkish Red Crescent. *Transfus. Apher. Sci.* 2010; 43(3): 269–272.
10. Li L, Chen PJ, Chen MH, Chak KF, Lin KS, Lin Tsai SJ. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus. *Transfusion.* 2008 Jun; 48(6):1198-206.
11. Lin KT, Chang CL, Tsai MH, Lin KS, Saldanha J, Hung M. Detection and identification of occult HBV in blood donors in Taiwan using a commercial, multiplex, multi-dye nucleic acid amplification technology screening test. *Vox Sang.* 2014 Feb;106(2):103-10.
12. Louisirirothanakul S, Oota S, Khuponsarb K, Chalermchan W, Phikulsd S, Chongkolwatana V, et al. Occult hepatitis B virus infection in Thai blood donors. *Transfusion.* 2011 Jul;51(7):1532-40.
13. Moiz B, Moatter T, Shaikh U, Adil S, et al. Estimating window period blood donations for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus by nucleic

- acid amplification testing in Southern Pakistan. *Transfusion*. 2014 Jun; 54(6):1652-9.
14. Niazi SK, Bhatti FA, Salamat N, Ghani, Tayyab M. Impact of nucleic acid amplification test on screening of blood donors in Northern Pakistan. *Transfusion*. 2015 Jul; 55(7):1803-11.
 15. Selim HM, Mohamed A, Sahar G, Wakil EI. Donor minipool NAT screening for HBV, HCV, and HIV: a 2- year experience in a private hospital in Saudi Arabia *Comp Clin Pathol*. 2014; 23(4):1125–32.
 16. Yoshikawa A, Gotanda Y, Minegishi K, Taira R, Hino S, Tadokoro K, Ohnuma H, et al. Lengths of hepatitis B viremia and antigenemia in blood donors: preliminary evidence of occult (hepatitis B surface antigen– negative) infection in the acute stage. *Transfusion*. 2007 Jul;47(7):1162-71.
 17. Vermeulen M, Lelie N, Sykes W, Crookes R, Swanevelder J, Gaggia L, et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. 2009 Jun; 49(6):1115-25.
 18. Makroo RN, Choudary N, Jagannathan L, Parihar-Malhotra M, Raina V, Chaudhary RK, et al. Multicenter evaluation of individual donor nucleic acid testing (NAT) for simultaneous detection of human immunodeficiency virus-1 & hepatitis B & C viruses in Indian blood donors. *Ind J Med Res*. 2008 Feb; 127:140–47.
 19. Leme SR, Levi JE. Avaliação tecnológica do teste molecular (NAT) para HIV, HCV e HBV na triagem de sangue no Brasil. [Dissertação]. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.
 20. Scuracchio PSP, Poli MCC, Lemos MM, Oliveira Filho AG, Salles NA, Chamone DAF et al. Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid-amplification technology. *Transf Med*. 2007 Jun; 17(3): 200–204.
 21. Fiedler SA, Oberle D, Chudy M, Scheiblaue H, Henseler O, Halbauer J. Effectiveness of blood donor screening by HIV, HCV, HBV-NAT assays, as well as HBsAg and anti-HBc immunoassays in Germany (2008–2015). *Vox Sang*. 2019 Jul;114(5):443-50.
 22. Cable R, Lelie N, & Bird, A. Reduction of the risk of transfusion-transmitted viral infection by nucleic acid amplification testing in the Western Cape of South Africa: a 5-year review. *Vox Sang*. 2013 Feb;104(2):93-9.
 23. Caetano MM, Beck ST. Importância da detecção de anticorpos anti-HBc na prevenção da transmissão do vírus da hepatite B (VHB) em bancos de sangue. *Revi Bra Anal Clin*. 2006. 38 (4) 235-237.

Keywords: nucleic acid amplification test; serological tests; blood donors.

TECHNOLOGY DEVELOPMENT IN THE GENETIC IDENTIFICATION OF ERYTHROCYTE BLOOD SYSTEMS FOR PRACTICAL PROBLEMS IN TRANSFUSION THERAPY

Marília Gonçalves Quirino¹; Joana Maira Valentini Zacarias²; Quirino Alves de Lima Neto²; Ana Maria Sell³; Jeane Eliete Laguilha Visentainer².

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

²Docente, Departamento de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
e-mail: marilia_quirino@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Knowledge and detection of erythrocyte antigens are essential for transfusion practice, since the development of antibodies against these antigens can become a major problem in the clinic, especially in multiple-transfused patients (1,2).

Currently, 43 blood group systems are recognized by the International Society of Blood Transfusion (ISBT). In transfusion practice, in addition to the ABO erythrocyte blood group system, other antibodies are of great clinical importance such as those of the Rh, Kell, Duffy, Kidd erythrocyte blood group systems. The antibodies most implicated in late hemolytic transfusion reactions are those against antigens from the Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%) and Kell (13%) systems (3-6).

The classic method for determining the antigenic profile is phenotyping performed by hemagglutination tests, which detect the gene product by binding antisera to specific antigens. This is a simple serological test, but considering the need to type a large number of samples increases the difficulty and also the costs, in addition to the need for a large number of specific and rare antisera (7). Despite being quick and easy to perform, serological methods are not always able to determine the phenotype, for example, in cases of patients who have recently been transfused, or who have certain pathologies such as autoimmune hemolytic anemia (8).

The use of molecular biology tools has been fundamental for the insertion of new methodologies in the laboratory routine of Immunohematology, increasing the safety and transfusional efficacy of multiple-transfused patients, such as thalassemic patients, patients with sickle cell anemia, myelodysplastic syndromes and autoimmune hemolytic anemia. This can be easily seen during blood group genotyping procedures, where molecular techniques make up for the deficiencies of hemagglutination techniques, especially in the phenotyping of patients with recent transfusion, when there are donor red cells in the recipient's circulation, and in patients with self-antibodies (9-12).

The molecular basis for most red cell antigens is known and most of them result from single nucleotide polymorphisms (SNPs). Differences in the sequences of these SNPs can be used for genotyping and numerous DNA analysis methodologies have been developed (10). The most commonly used PCR technique protocols in the determination of blood group antigens are: Polymerase Chain Reaction/Sequence Specific Primers (PCR-SSP) and Restriction Fragment Length Polymorphism PCR (PCR-RFLP) (14,15). Recently, the real-time PCR (Real Time) and the microarray technique (Microarray) have also been used for the analysis of blood group genes (11,15,16).

Given the variety of techniques available for the detection of erythrocyte antigens, knowing the advantages and disadvantages of each method allows for the minimization of costs and agility in the release of reports, increasing the safety in the choice of blood bags and, consequently, providing a better patient care.

The aim of this study was to develop an effective and low-cost Molecular Biology methodology for erythrocyte blood groups identification belonging to the Duffy, Kell, Kidd and Diego systems.

2. MATERIAL AND METHODS

This work was approved and conducted according to the norms recommended by the Ethics Committee on Human Research of the State University of Maringá, in accordance with 196/96 Resolution of the National Health Council/National Research Ethics Committee: COPEP/UEM nº 1.751.318/2016.

2.1. Sample collection

After clarification on the project and signed consent form, a peripheral blood sample was collected in tubes containing EDTA of patients attended at the UEM Regional Blood Center and Dom Bosco Blood Center.

2.2. DNA extraction

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes as directed by extraction kit manufacturer (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen) and the DNA concentration determined in NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington).

2.3. Blood groups genotyping by PCR-SSP

For the genotyping reaction of alleles for Kidd, Kell, Duffy and Diego, the PCR-SSP technique was used, initially with the reaction conditions, such as reagent concentrations and cycling temperature conditions, as proposed by (17). For the development of this technique, specific initiators were made for each allele.

According to the procedure developed by (17), all reactions were tested in a final volume of 10 µL, containing buffer 10X (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL), 0.2 mM dNTP, 0.4U Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), 50-100 nmol DNA, 1.5 mM MgCl₂, 2 ng/µL specific primers and internal control (HGH) and distilled water enough to make up the volume. For each antigen, two different MIX were prepared, each one containing the allele-specific pairs of primers (Forward and Reverse) and the other reagents, except for the DNA. The mixture was then distributed into 200 µl microtubes containing the DNA. The amplification temperatures and conditions were: initial denaturation (94°C for 2 minutes), 10 cycles (denaturation at 94°C for 10 seconds, annealing at 65°C for 1 minute), and 22 cycles (denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 61°C for 1 minute and 30 seconds of extension at 72°C) and, finally, a elongation cycle (72°C for 5 minutes). Amplification cycles were performed in Applied Biosystemsthermocyclers (Thermo Fisher Scientific). Modifications of these conditions were made when necessary.

All polymerase chain reactions were performed with a negative control (absence of DNA) in order to ensure the absence of contamination; and positive controls, using DNA from known samples for each possible phenotype.

After amplification of 10µL, the interpretation of the PCR-SSP result was based on the presence or absence of a specific fragment of amplified DNA. The product obtained was analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel with a 15-minute run at 150V. The gels were photographed on a UV transilluminator and the results noted in an appropriate form.

2.4. PCR-SSP validation for erythrocyte blood groups

To validate the PCR-SSP technique, samples of all existing polymorphisms for erythrocyte blood groups that will be genotyped, present in patients as homozygous and heterozygous, were selected for sequencing by the Sanger method. First, the DNA fragments to be sequenced were amplified by PCR, using a group of specific primers made for each erythrocyte antigen evaluated. After the PCR reaction, the amplification products will be analyzed by agarose gel electrophoresis, in order to ensure that only one fragment has been amplified and that it has the expected size for the DNA segment to be sequenced. Finally, the sequencing reaction was performed using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions and the product of this reaction was analyzed in the 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequencing results were evaluated using BioEdit 7.2 software and the generated data compared with the results obtained by the PCR-SSP, so that the sequencing can prove the effectiveness and validate the developed PCR-SSP technique.

3. RESULTS

In the development of PCR-SSP, for some alleles, the results obtained demonstrated unspecific bands in the reaction, requiring some changes in cycling and MgCl₂ concentrations, aiming at increasing the specificity of the reaction. The final conditions on the MgCl₂ concentration for genotyping of each allele are described in Table 1. The other reagents concentrations remained the same. The standardized cycling conditions were: 1 cycle (94°C – 2min), 30 cycles (94°C – 30s, 65°C – 1min, 72°C – 30s) and 1 cycle (72°C – 5min).

Table 1. Final MgCl₂ concentration defined for each allele.

Alleles	[MgCl ₂]
<i>KEL*01/KEL*02</i>	1,5 mM
<i>FY*01/FY*02/DI*02</i>	1,0 mM
<i>JK*01/JK*02/DI*01</i>	0,8 mM

To validate the technique, the same samples (Table 2) were sequenced using the Sanger method. Some amplification and cycling conditions were tested and the best results were obtained when we used for amplification: 0.25 μ M of each primer (Forward and Reverse), 100ng DNA, 1X buffer (10X PCR buffer), 0.25mM dNTP, 0.5U Taq DNA polymerase (5U/uL), 1.5mM MgCl₂, with a final volume of 20 μ L per sample. The standardized cycle conditions were: 1 cycle (95°C – 4min), 30 cycles (95°C – 1min, 64°C – 30s, 72°C – 45s) and 1 cycle (72°C – 7min).

Table 2. Genotypic profile of patients for the antigens of the Duffy, Kidd, Kell and Diego systems by PCR-SSP and Sequencing.

Sample	Diego	Sample	Duffy	Sample	Kidd	Sample	Kell
2	DI*01/DI*01	13	FY*01/FY*01	11	JK*01/JK*01	12	KEL*01/KEL*01
4	DI*01/DI*02	3	FY*01/FY*01	4	JK*01/JK*01	3	KEL*01/KEL*02
31	DI*01/DI*02	7	FY*01/FY*01	12	JK*01/JK*01	1	KEL*02/KEL*02
145	DI*01/DI*02	2	FY*01/FY*02	6	JK*01/JK*02		
7	DI*02/DI*02	6	FY*01/FY*02	2	JK*01/JK*02		
9	DI*02/DI*02	10	FY*02/FY*02	7	JK*01/JK*02		
10	DI*02/DI*02	4	FY*02/FY*02	3	JK*02/JK*02		
11	DI*02/DI*02	8	FY*02/FY*02	1	JK*02/JK*02		
				9	JK*02/JK*02		

4. DISCUSSION

Although there are phenotyping technologies for these blood groups already being used in Blood Centers and Blood Banks to identify compatible donors, they are expensive and not always satisfactory in terms of results, especially when patients are recently transfused or have a disease of autoimmune basis. In cases of inconclusive phenotyping, genotyping appears as an important complementary tool.

Having confirmed the expectations that blood group genotyping will, in practice, make up for all the deficiencies of current phenotyping techniques, we believe that in a short period of time, large-scale analysis technology will replace much of the current hemagglutination procedures and, consequently, the current configuration of the Immunohematology laboratories.

Other work by our research group evaluated in terms of cost-effectiveness, phenotyping and genotyping methods for detecting erythrocyte antigens. The study demonstrated that the detection of erythrocyte antigens by PCR-SSP proved to be economically more viable compared to other serological and molecular methodologies (18).

The standardized PCR-SSP in this work proved to be efficient and of high quality for genotyping erythrocyte antigens from the Kidd, Kell, Duffy and Diego systems, since the results obtained are in agreement with those found in the sequencing of the samples. Our proposal with this new methodology is to make pre-transfusion exams cheaper, enabling their implementation in public and private services.

These are only partial results of our research. The PCR-SSP validation will also be done for genotyping other antigens of great transfusion importance, such as Rh and MNS. In addition, we will evaluate the transfusion efficiency and alloimmunization in these transfused patients with a compatible phenotype based on the genotype results. This transfusional efficacy will be measured by pre- and post-transfusion hemoglobin levels and by the frequency of transfusions before and after genotyping.

The results obtained in this work will benefit all those who are dependent on regular transfusions, considerably reducing the risks of alloimmunization and hemolysis in the short and long term, which would represent an estimated value in the transfusion clinic, both in terms of cost reduction, regarding the quality and safety of the procedures.

5. CONCLUSION

The methodology developed in this work proved to be effective, safe and low cost in relation to the available genotyping methods and it can be implemented in health services for erythrocyte antigens detection.

FINANCERS

CAPES, CNPq and Laboratory of Immunogenetics (Proc. n.1589/2017-CSD-UEM).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the collaborators of the Immunogenetics Laboratory of State University of Maringá, Maringá Regional Blood Center and Dom Bosco Blood Center.

REFERÊNCIAS

1. Castilho LM, Rios M, Pellegrino JrJ. Blood group genotyping for the management of patients with “warm” antibody-induced hemolytic anemia (WAIA). *Blood*. 2001;98(11):62.
2. Castilho L, Pellegrino JrJ. Blood group genotyping. *Rev bras hematolhemoter*. 2004; 26: 135-140.
3. Castilho L, et al. *Fundamentos de Imuno-hematologia*. Sao Paulo: Atheneu; 2015.
4. Reischer EG, Kostyu DD, Philips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens*. 1987;30(4):161-166.
5. Orlina AR, Sosler SD, Koshy M. Problems of chronic transfusion in sickle cell disease. *ClinApher*. 1991;6(4):234-240.
6. Charache S. Problems in transfusion therapy [editorial]. *N Engl J Med*. 1990;322(23):1666-1668.
7. Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Wijk PAM, Schoot CEVD, Zwieten RV, Roos D, et al. Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*. 2005;45(5):667-679.
8. Martins ML, et al. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31(4).
9. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino Jr J, Alberto FL, Saad STO, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2000;42(2):232-238.
10. Castilho L, Rios M, Pellegrino JJR, Saad STO, Costa FF. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(5):216-220.
11. Ribeiro KR, Guarnieri MH, Costa DC, Costa FF, Pellegrino JJr, Castilho L. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in sickle cell disease patients. *Vox Sang*. 2009;97(2):147-152.
12. Rozman P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion*. 2000;40(8):936-942.
13. Reid ME, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusions. *Curr Opin Hematol*. 1998;5(2):93-102.
14. Reid ME, Rios M: Applications of molecular genotyping to immunohaematology. *Br J Biomed Sci*. 1999;56(2):145-152.
15. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*. 2005;45(5):680-688.
16. Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion*. 2007;47(4):736-747.
17. Liu Z, Zeng R, Chen Q, Li M, Shi G, Wei P, et al. Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and RHCE blood group antigens polymorphisms in Jiangsu Chinese Han. *Chin. Med. J*. 2012;125(6):1076-1081.
18. Quirino MG, Colli CM, Macedo LC, Sell AM, Visentainer JEL. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *hematoltransfus cell ther*. 2019;41(1):44-49.

KEYWORDS: Blood group antigens; immunohematology; molecular biology.

Antimicrobianos – uma luta incansável!

COMBINAÇÃO *in vitro* CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* DE FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE COM SUBSTÂNCIAS QUE TEM SIDO AMPLAMENTE UTILIZADAS EM PACIENTES COM COVID-19 DURANTE A PANDEMIA

Izabella Ventura de Souza¹; Regiane Bertin de Lima Scodro²; Vera Lúcia Dias Siqueira²; Rosilene Fressatti Cardoso²; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli².

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

²Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: izaventura.souza@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* que acomete especialmente os pulmões (TB pulmonar) (1). A cada ano, aproximadamente 10 milhões de pessoas adoecem com TB no mundo. A doença está entre as 10 principais causas de morte por agente único infeccioso superando até o HIV. No de 2019, 1,2 milhões de pessoas morreram(2).

Enquanto isso, a epidemia de COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2 com quase 1 ano e meio de seu início, teve um cenário global até julho de 2021 de mais de 190 milhões de caso, atingindo a marca de mais de 4 milhões de mortes. No contexto Brasil, a situação era de cerca de 10% do número de casos mundiais, atingindo a marca de quase 19,5 milhões de casos e 541.266 mortes (3).

Ambas doenças possuem como principal forma de infecção a transmissão de humano para humano mediante contato próximo, por via aérea pela dispersão de gotículas de saliva de indivíduos infectados (4, 5). Embora transmitidas principalmente pela mesma via, o SARS-CoV-2 mostra uma facilidade maior em ser transmitido. Ainda há semelhança em relação aos principais sintomas: tosse, febre e falta de ar (6). Parece haver uma relação bilateral entre essas patogêneses, onde a presença inicial de uma delas aumenta a suscetibilidade para a coinfeção(6). Um estudo chinês revelou que pessoas com TB ativa ou latente têm maior suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 associadas à rápida progressão e desenvolvimento da forma grave (7).

Com a taxa de disseminação mundial do SARS-CoV-2 alarmante, o reposicionamento de fármacos, que é a busca de novas aplicações para fármacos existentes, parece uma solução. Etapas já estabelecidas tais como: o desenvolvimento de formulação, triagem *in vitro* e *in vivo*, bem como perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, permitem a redução de todo o processo (8).

O tratamento para TB é bem estabelecido desde a década de 40, ao contrário, para SARS-CoV2, não há agentes eficazes disponíveis ainda e assim a ideia de reposicionamento de fármacos foi inicialmente muito explorada para o tratamento da COVID-19. A procura por soluções simples levou a criação de um “kit covid-19” contendo azitromicina, ivermectina e cloroquina ou hidroxicloroquina, que foi distribuída em alguns estados no Brasil para a prevenção/tratamento. Até o momento, não há tratamento com efetividade e segurança comprovada para COVID-19, assim houve um uso *off-label*, quando sua administração possui resultados sugestivos, porém sem evidência de eficácia (9, 10).

Scolari (11), levantou uma breve revisão dos motivos para pensar no uso da hidroxicloroquina ou cloroquina e da ivermectina no tratamento do novo coronavírus. A hidroxicloroquina ou cloroquina, aparentemente podem interferir no ciclo viral e também nas reações inflamatórias desencadeadas pela COVID-19. No caso da ivermectina, estudos anteriores demonstraram atividade antiviral *in vitro* contra diferentes vírus como: influenza A, dengue e HIV-1.

Paralelo ao reposicionamento dos fármacos buscou-se a suplementação de vitaminas e minerais para a melhora da imunidade dos pacientes. Destacou-se o uso dos micronutrientes, como: zinco, determinante para manutenção da função imune inata e adaptativa, e da vitamina D, onde sua deficiência gera maior vulnerabilidade a infecções (12).

Stochino *et al.*, realizaram um estudo onde 20 entre 24 pacientes internados com TB foram diagnosticados com COVID-19 (13). Em coinfeção, há risco 2,17 vezes maior de óbito quando comparado ao quadro somente viral. Pacientes com TB e COVID-19 têm 25% menos chance de se recuperar em relação a COVID-19 sozinha. Outra questão é que, as sequelas pulmonares pela COVID-

19 podem levar a um maior risco de desenvolver TB no futuro. A COVID-19 também pode ter impacto na infecção tuberculosa latente (ITBL). A desregulação imunológica causada pode afetar o diagnóstico e o manejo da ITBL, porém, muitas questões permanecem abertas, não se sabe, se é necessário realizar a triagem dos pacientes com COVID-19 com teste tuberculínico (14).

Considerando a pandemia pelo SARS-CoV-2 e a similaridade sintomática com TB, a coinfeção COVID-19/TB precisa ser estudada a fim de que a terapêutica combinada possa trazer benefícios para o paciente. O presente estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* contra *M. tuberculosis*, o efeito (sinérgica e/ou aditiva e/ou antagônica) da combinação de fármacos clássicos utilizados no tratamento da TB com substâncias que tem sido amplamente utilizada (*off-label*) em pacientes com COVID-19.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Substâncias

As substâncias selecionadas para esse estudo foram: Hidroxicloroquina (Galena), Ivermectina (Gemini – Indústria de insumos farmacêuticos), Vitamina D (Galena) e Zinco (SM empreendimento farmacêutico), que foram obtidas comercialmente.

2.2. Inóculo bacteriano

Foi utilizada cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e isolados clínicos provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá. Os bacilos foram semeados em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) enriquecido com OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubados por 15-21 dias a 35-37°C.

2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à cepa padrão e isolados clínicos com variados perfis de resistência

As suspensões bacterianas foram padronizadas em DO₆₂₅ (0,16-0,20) utilizando espectrofotômetro equivalente a escala de McFarland nº 1 e então diluídas 1:20 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC.

Os ensaios foram realizados seguindo a metodologia *Resazurin Microtiter Plate Assay* – REMA de acordo com Palomino et al. (15). Foram utilizados fármacos conhecidos como controle. A mudança da cor azul para rosa pela redução da resazurina foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a mudança de cor da resazurina de azul para rosa (inibição do crescimento bacteriano).

2.4. Avaliação da combinação *in vitro* de fármacos

Considerando o uso de pelo menos três fármacos para o tratamento da TB, buscamos com o ensaio de *checkerboard*, conforme descrito por Caleffi-Ferracioli *et al.* (16), analisar as possíveis interações *in vitro* dos fármacos de primeira linha disponíveis para o tratamento da TB, isoniazida (INH), etambutol (EMB) e rifampicina (RIF), com os emergentes fármacos utilizados amplamente no Brasil para o tratamento e/ou prevenção da COVID-19 frente ao bacilo *M. tuberculosis*. Este ensaio também foi realizado em placas de microdiluição de 96 orifícios, onde foram testadas duplas combinações de fármacos, seguindo as mesmas condições de inóculo e diluição descritas na metodologia acima. O efeito sinérgico foi avaliado seguindo a equação $FICI = (CIM_{A+B}/CIM_A) + (CIM_{B+A}/CIM_B)$, onde: CIM_{A+B} representa a CIM da substância A quando associada a substância B; CIM_{B+A} representa a CIM da substância B quando associada a substância A; CIM_A representa a CIM da substância A quando testada isoladamente; CIM_B representa a CIM da substância B quando testada isoladamente. Os efeitos das combinações foram classificados em efeito sinérgico ($FICI \leq 0,5$), efeito aditivo/indiferente ($FICI > 0,5 - 4$) ou efeito antagônico ($FICI > 4$) (17). Determinadas combinações foram analisadas pelo Software Combenefit (18).

3. RESULTADOS

A CIM das substâncias hidroxicloroquina, ivermectina, vitamina D e zinco frente a cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv foi apresentada na Tabela 1. A hidroxicloroquina, vitamina D e zinco apresentaram CIM de 250µg/mL, 1000µg/mL e 62,5µg/mL respectivamente, enquanto a ivermectina mostrou melhor atividade antimicobacteriana com CIM de 3,9µg/mL.

A técnica de *checkerboard* bidimensional foi realizada para a cepa padrão *M. tuberculosis* H₃₇Rv com a combinação das 4 substâncias e os principais fármacos utilizados no tratamento da TB: rifampicina, isoniazida e etambutol. O sinergismo ($FICI \leq 0,5$) foi observado nas combinações hidroxicloroquina/rifampicina, ivermectina/rifampicina, ivermectina/etambutol, zinco/rifampicina e zinco/etambutol. Nas demais combinações o efeito foi aditivo ou indiferente. Efeito antagônico não foi observado em nenhuma das combinações. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de substâncias utilizadas amplamente no tratamento e/ou prevenção para COVID-19 frente à cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

	CIM (µg/mL)
Hidroxicloroquina	250
Ivermectina	3,9
Vitamina D	1000
Zinco	62,5

Tabela 2. Avaliação *in vitro* da combinação de fármacos frente à cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

	CIM (µg/mL)	FICI		
		RIF	INH	EMB
Hidroxicloroquina	250	0,05	3	2
Ivermectina	3,9	0,38	1	0,37
Vitamina D	1000	0,6	2	2
Zinco	62,5	0,06	0,6	0,31

FICI: índice de fração inibitória fracionada; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol.

*Sinérgico (FICI ≤ 0,5), aditivo ou indiferente (FICI >0,5 e < 4) e antagônico (FICI >4).

Devido aos resultados promissores com a Ivermectina, os estudos prosseguiram para a análise das CIMs e *checkerboard* frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* com variados perfis de resistência. As CIMs variaram entre 3,9 a 7,8µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Ivermectina frente a isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*

Isolados/Cepa	Perfil Sensibilidade	CIM (µg/mL)
H ₃₇ Rv	Sensível	3,9
3614	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	3,9
47s	Sensível	7,8
4250	INH ^R	7,8
71 A	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	3,9
73 A	INH ^R /RIF ^R /PZA ^R	3,9
18	INH ^R /RIF ^R /EMB ^R	3,9
BRF4	INH ^R	3,9

S: susceptível; R: resistente; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; PZA: pirazinamida;

Na figura 1, temos o moledo Bliss obtido pelo Software Combenefit (18) das duas combinações sinérgicas de ivermectina com os fármacos antituberculosos rifampicina e etambutol. O software gera um *score* de sinergismo e antagonismo para cada combinação de concentrações, denominado ⊗E, os valores positivos de ⊗E evidenciam o efeito sinérgico da combinação. As diferentes cores nos gráficos 3D representam diferentes faixas de percentis de sinergia, sendo os melhores pontos representados pela coloração azul escuro ou mais próxima dessa cor.

Com isso, temos as melhores combinações de concentração de ivermectina-rifampicina sendo elas: 1,95µg/mL-0,015 µg/mL, 0,97 µg/mL-0,015 µg/mL e 1,95 µg/mL-0,007µg/mL na ordem de maior sinergismo para o menor. Na interação ivermectina-etambutol temos: 3,9µg/mL-0,5 µg/mL, 7,8 µg/mL-0,5 µg/mL e 1,95 µg/mL-0,25µg/mL também seguindo a ordem de maior ⊗E, ou seja, maior sinergismo para menor.

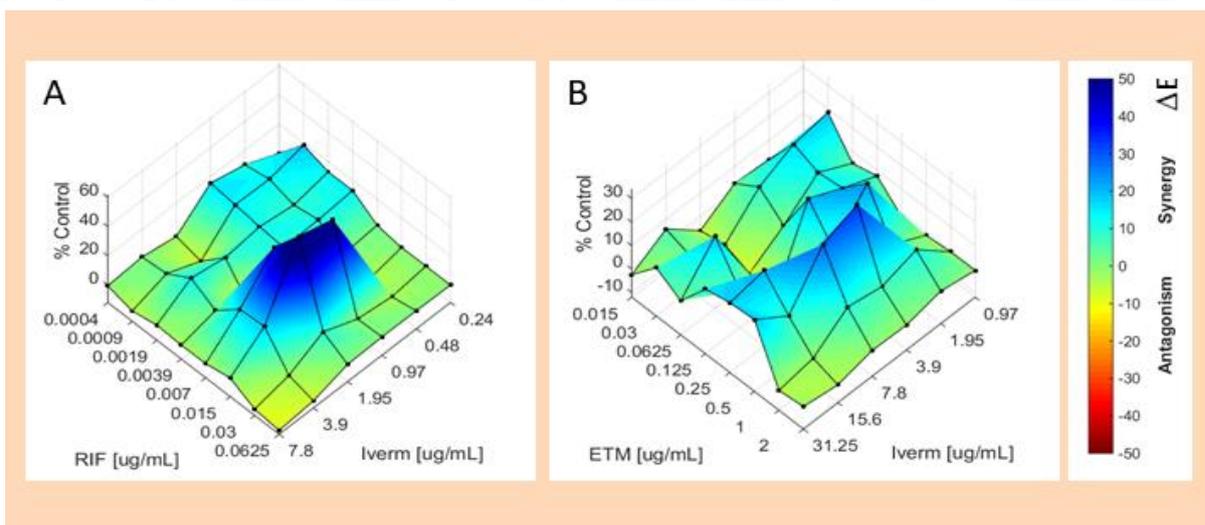


Figura 1. Análise da superfície de resposta pelo modelo Bliss para a combinação *in vitro* de ivermectina com rifampicina (RIF) ou etambutol (ETM) contra *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv*

Os eixos x e y representam as concentrações de cada composto e o eixo z é a porcentagem \otimes E. A magnitude das interações está diretamente relacionada ao \otimes E. As diferentes cores nos gráficos 3D representam diferentes faixas de percentis de sinergia.

4. DISCUSSÃO

Quando nos deparamos com uma nova doença, inicia-se também a busca por um tratamento seguro e eficaz. Diante da pandemia pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), uma doença com transmissão assustadoramente rápida e sem medicações com eficácia comprovada, iniciou-se a prescrição de medicamentos (*off-label*) com atividade para outras doenças virais mesmo sabendo que as condições não foram confirmadas para o novo coronavírus (19).

Com o uso *off-label*, a cloroquina, hidroxicloroquina e a ivermectina foram medicamentos amplamente utilizados no Brasil anteriormente a vacina. A primeira dupla mostrou um aumento acentuado no prolongamento do QT. Edema periférico, taquicardia, tontura e prurido entre outros sintomas, foram as reações registradas no uso da ivermectina, evidenciando a necessidade de mais estudos clínicos para garantir a segurança para o tratamento da Covid-19 (20).

Com a pandemia da COVID-19 em curso, muitas áreas foram afetadas, particularmente programas de prevenção e cuidados da TB. Muitas áreas da saúde pública global foram e serão afetadas por essa pandemia, sendo a TB mais uma entre elas. Porém, se não houver medidas de contingências, os 10 milhões de casos e 1 milhão de mortes por TB que ocorrem anualmente em todo o mundo aumentarão. Considerando a possibilidade de coinfeção TB/Covid-19, se faz necessário avaliar o efeito combinado das duas terapêuticas, uma vez que o paciente também pode estar usando antivirais e agentes imunomoduladores adicionais que são promissores contra COVID-19. (21, 22)

Um trabalho prévio (23) observou CIM de 6 μ g/mL para ivermectina, similar ao encontrado no presente de 3,9 μ g/mL para a cepa de *M. tuberculosis H₃₇Rv*. Crowle *et al.* (22) observou que 500 μ g/mL foi a concentração de cloroquina capaz de matar o bacilo (avaliação foi feita por UFC/unidade formadora de colônia), concentração próxima a 250 μ g/mL encontrada em nosso estudo, porém avaliada por CIM (24).

O estudo de Bouaré *et al.*(25) relatou a possível associação sinérgica cloroquina-rifampicina frente ao tratamento da COVID-19, em um estudo de caso. Assim como a associação cloroquina-rifampicina foi sugerida na hipótese de associação sinérgica (anti-retroviral e imunomoduladora) para o tratamento dessa nova doença, se faz necessário também pensar na coinfeção viral+micobacteriana. Embora dois estudos tenham demonstrado um aumento significativo da proteção anti-TB da isoniazida associada a cloroquina, no presente estudo quando associada em sua forma hidroxilada, a hidroxicloroquina em combinação com a isoniazida não demonstrou efeito sinérgico, tendo apresentado efeito indiferente(24, 26).

Em *Mycobacterium ulcerans* a combinação de 0,1 μ g/mL de rifampicina e 8 μ g/mL de ivermectina mostrou um efeito sinérgico de morte. Clinicamente, a rifampicina pode diminuir a concentração sérica de ivermectina pela indução da glicoproteína-P em humanos(27). A combinação de selamectina, que assim como a ivermectina pertence a classe das avermectinas com concentrações subinibitórias de etambutol aumenta sua atividade frente a *Mycobacterium smegmatis*(28). No presente estudo, quando analisado a combinação rifampicina/ivermectina e etambutol/ivermectina frente a *M. tuberculosis* também foi observado efeito sinérgico (FIC_I< 0,5).

Ganmaa *et al.* (29), demonstraram que a suplementação de vitamina D não resultou em um risco menor de infecção por TB, doença tuberculosa ou infecção respiratória aguda. Em outro estudo de Zhang *et al.* (30), foi evidenciado que a suplementação de vitamina D não diminui o tempo para negatização da cultura de escarro e conversão do esfregaço. No entanto, pode melhorar a taxa de conversão de cultura de escarro de TB MDR (TB-multirresistente).

Nosso resultado de sinergismo quando associado *in vitro* zinco e rifampicina, em condições diferentes está de acordo com Pati *et al.* (31), que mostrou a associação de zinco e rifampicina em um sistema de nanocristais que permite uma liberação lenta por período prolongado da droga, demonstrou um grande potencial na atividade anti-TB, além da redução de efeitos colaterais.

Por fim, no presente estudo não foi encontrado sinergismo quando associado zinco com isoniazida, porém, Saifullah *et al.* (32), desenvolveram uma formulação de nanotransmissão dessa combinação que foi três vezes mais eficaz em comparação ao fármaco em sua forma livre e três vezes mais biocompatíveis.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que o uso *off-label* dos fármacos estudados em pacientes com covid-19, especialmente de hidroxicloroquina, ivermectina e zinco em pacientes com coinfeção TB/Covid-19 pode ser vantajoso para o prognóstico da TB. Novos estudos devem ser conduzidos para melhor compreensão do efeito sinérgico e da aplicação na clínica da terapia combinada.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. Pereira GR. Impacto do teste Xpert MTB/RIF no diagnóstico da tuberculose. 2018.
2. Who G. Global tuberculosis report 2020. Glob Tuberc Rep. 2020;2020.
3. COVID-19 Dashboard [Internet]. 2021. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
4. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. Asian Pac J Allergy Immunol. 2020;38(1):1-9.
5. Warriak K, Nyamthimba P, Chweya A, Agaya J, Achola M, Reichler M, et al. Tuberculosis disease and infection among household contacts of bacteriologically confirmed and non-confirmed tuberculosis patients. Tropical Medicine & International Health. 2020.
6. Udwadia ZF, Vora A, Tripathi AR, Malu KN, Lange C, Raju RS. COVID-19-Tuberculosis interactions: when dark forces collide. Indian Journal of Tuberculosis. 2020.
7. Liu Y, Bi L, Chen Y, Wang Y, Fleming J, Yu Y, et al. Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. Medrxiv. 2020.
8. Novac N. Challenges and opportunities of drug repositioning. Trends in pharmacological sciences. 2013;34(5):267-72.
9. Ferreira LLG, Andricopulo AD. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. Estudos Avançados. 2020;34:7-27.
10. da Costa Braúna C, Araujo PM, Carvalho RD, de Medeiros MdGF, Nunes LCC. Farmacoeconomia aplicada ao tratamento medicamentoso para a COVID-19 em um hospital campanha. Revista Eletrônica Acervo Saúde. 2021;13(2):e5971-e.
11. Scolari MJ. Redescubriendo viejos conocidos: el posible papel de la hidroxicloroquina, cloroquina, ivermectina y teicoplanina en el tratamiento del COVID-19. Revista de la OFIL. 2020;30(2):127-30.
12. de Carvalho MdC, Oliveira ASdSS. Zinco, vitamina D e sistema imune: papel na infecção pelo novo coronavírus. REVISTA DA FAESF. 2020;4.
13. Stochino C, Villa S, Zucchi P, Parravicini P, Gori A, Raviglione MC. Clinical characteristics of COVID-19 and active tuberculosis co-infection in an Italian reference hospital. European Respiratory Journal. 2020;56(1).

14. Silva DR, Mello FCdQ, D'Ambrosio L, Centis R, Dalcolmo MP, Migliori GB. Tuberculose e COVID-19, o novo dueto maldito: quais as diferenças entre Brasil e Europa? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2021;47.
15. Palomino J-C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(8):2720-2.
16. Caleffi-Ferracioli KR, Maltempe FG, Siqueira VLD, Cardoso RF. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*. 2013;93(6):660-3.
17. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(1):1-.
18. Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, Mollard S, Bramhall JL, Richards FM, et al. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2866-8.
19. Paumgarten FJR, Oliveira ACAXd. Off label, compassionate and irrational use of medicines in Covid-19 pandemic, health consequences and ethical issues. *Ciencia & saude coletiva*. 2020;25:3413-9.
20. de Oliveira FS, da Silva Mendonça G, de Souza Silva S. Avaliação de segurança de medicamento off-label utilizados no tratamento da COVID-19: revisão sistemática. *Brazilian Applied Science Review*. 2021;5(3):1399-410.
21. Togun T, Kampmann B, Stoker NG, Lipman M. Anticipating the impact of the COVID-19 pandemic on TB patients and TB control programmes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2020;19(1):1-6.
22. Glaziou P. Predicted impact of the COVID-19 pandemic on global tuberculosis deaths in 2020. *MedRxiv*. 2020.
23. Lim LE, Vilchère C, Ng C, Jacobs Jr WR, Ramón-García S, Thompson CJ. Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium tuberculosis*, including multidrug-resistant clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(2):1040-6.
24. Crowle AJ, May MH. Inhibition of tubercle bacilli in cultured human macrophages by chloroquine used alone and in combination with streptomycin, isoniazid, pyrazinamide, and two metabolites of vitamin D3. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990;34(11):2217-22.
25. Bouaré F, Laghmari M, Etouche FN, Arjdal B, Saidi I, Hajhouji F, et al. Unusual association of COVID-19, pulmonary tuberculosis and human immunodeficiency virus, having progressed favorably under treatment with chloroquine and rifampin. *The Pan African Medical Journal*. 2020;35(Suppl 2).
26. Matt U, Selchow P, Dal Molin M, Strommer S, Sharif O, Schilcher K, et al. Chloroquine enhances the antimycobacterial activity of isoniazid and pyrazinamide by reversing inflammation-induced macrophage efflux. *International journal of antimicrobial agents*. 2017;50(1):55-62.
27. Omansen TF, Porter JL, Johnson PDR, van der Werf TS, Stienstra Y, Stinear TP. In-vitro activity of avermectins against *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(3):e0003549.
28. Aznárez JME. ESTUDIOS INICIALES DE LA CARACTERIZACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN MOLECULAR DE LAS AVERMECTINAS COMO AGENTES ANTI-TUBERCULOSOS.
29. Ganmaa D, Uyanga B, Zhou X, Gantsetseg G, Delgerekh B, Enkhmaa D, et al. Vitamin D supplements for prevention of tuberculosis infection and disease. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(4):359-68.
30. Zhang J, Chen C, Yang J. Effectiveness of vitamin D supplementation on the outcome of pulmonary tuberculosis treatment in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chinese medical journal*. 2019;132(24).
31. Pati R, Sahu R, Panda J, Sonawane A. Encapsulation of zinc-rifampicin complex into transferrin-conjugated silver quantum-dots improves its antimycobacterial activity and stability and facilitates drug delivery into macrophages. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-14.

32. Saifullah B, El Zowalaty ME, Arulselvan P, Fakurazi S, Webster TJ, Geilich BM, et al. Synthesis, characterization, and efficacy of antituberculosis isoniazid zinc aluminum-layered double hydroxide based nanocomposites. International journal of nanomedicine. 2016;11:3225.

Palavras-chave: Coinfecção Tuberculose/COVID-19, combinação de fármacos, sinergismo.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO CARVACROL E DERIVADOS EM *Mycobacterium* spp.– REVISÃO SISTEMÁTICA

Thiago Henrique Fermiano¹; João Paulo Salvaterra Pasquini¹; Letícia Sayuri Murase²; João Vítor Perez de Souza²; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli³, Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá³, Regiane Bertin de Lima Scodro³; Vera Lúcia Dias Siqueira³, Rosilene Fressatti Cardoso³.

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

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Laboratório de Bacteriologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

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

e-mail: th.fermiano@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) e a hanseníase são as doenças mais conhecidas causadas por representantes do gênero *Mycobacterium* (1). O complexo *M. tuberculosis* (CMTB) é o agente causador da TB, a principal causa de óbito por um agente infeccioso após a COVID-19 (2). A TB tem cura, mas o tratamento extenso somado aos efeitos colaterais acarreta a não-adesão dos pacientes à terapia, levando ao surgimento de bacilos resistentes.

Apesar de menos investigadas, infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNTs) têm aumentado significativamente. Essas infecções possuem grande importância clínica em pacientes imunossuprimidos (3). Não há um consenso sobre o tratamento mais adequado para doenças causadas por MNTs, denominadas micobacterioses, diferindo em função da espécie envolvida e os perfis de resistência, haja vista diversos relatos de espécies intrinsecamente resistentes aos fármacos preconizados (4–6).

O número de novos casos de TB e micobacterioses somados à emergência de isolados clínicos resistentes reforçam a urgente busca por novas estratégias terapêuticas. Ganha destaque, nesse cenário, o aumento no interesse por produtos naturais com atividades biológicas. Carvacrol (CAR) é um monoterpene aromático biossintetizado a partir do γ -terpineno e do *p*-cimeno, comumente extraído de espécies aromáticas da família *Labiatae* (7-9). Diversos estudos reportaram efeitos biológicos importantes de CAR, como ação antimicrobiana (10,11), antiparasitária (12), atividades anti-inflamatórias (13), antitumoral (14) e anti-hepatotóxica (15).

Diante dos resultados apresentados por CAR sobre distintos patógenos, analisar os estudos originais que avaliaram essa molécula frente às micobactérias e sintetizar as evidências é um grande passo nesse enfrentamento. Nosso trabalho surge para elucidar e investigar os mecanismos de atividade de CAR sobre o gênero *Mycobacterium* spp.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Estratégia de pesquisa

Esta revisão sistemática foi realizada de acordo com PRISMA *guideline* (16) (Fig 1.). Artigos originais que analisaram a atividade antimicrobiana de CAR e seus derivados no gênero *Mycobacterium* foram selecionados para esta revisão. Os pesquisadores do grupo I (THF, JVPS, LSM, JPP) definiram por consenso os descritores para a busca das publicações, realizada em quatro bases de dados: Pubmed, Web of Science, Scopus e EMBASE. Os descritores foram divididos em dois blocos: “*Mycobacterium* OR *Mycobacterium* Infections” e “Monoterpenes”, além da busca por termos livres utilizando “carvacrol”.

2.2. Critérios de elegibilidade

Foram selecionados apenas artigos originais alinhados com o objetivo da revisão, publicados em português, inglês ou espanhol, com resumo e texto completo disponível. Artigos que não estavam de acordo com o objetivo da revisão, sem resumo disponível, revisões, comentários, cartas, editoriais, teses, dissertações, *guidelines*, erratas, entrevistas e diretrizes foram excluídos desta revisão.

2.3. Seleção dos artigos

Após o cruzamento dos blocos, pesquisadores do grupo I foram distribuídos aleatoriamente em pares. A primeira etapa da seleção dos artigos foi a pesquisa de possíveis publicações por meio da

leitura dos títulos e resumos, excluindo duplicatas e estudos que não atenderam aos critérios de seleção. A triagem dos artigos foi realizada por meio da plataforma Rayyan (17), utilizando os filtros disponíveis dentro da plataforma: “wrong study design”; “wrong publication type”; “foreign language” e “wrong drug”. Os artigos incluídos foram decididos em consenso entre os pesquisadores. Os artigos completos foram lidos e trocados, independentemente, entre as duplas para revisão e consenso dos dados analisados.

2.4. Extração de dados e análises dos resultados

A extração de dados foi realizada por meio da estruturação das informações em formato de tabela. Foram extraídas informações sobre os objetivos dos trabalhos, os compostos e espécies, bem como métodos de avaliação da atividade antimicrobiana, análise estatística, toxicidade, resultados, conclusões, vieses e perspectivas relatadas. Especialistas do grupo II (RFC, KRFC, PAZC e RBLS) realizaram as correções dos dados tabulados. Reparos e ponderações foram realizados, se cabíveis, após as avaliações dos experts.

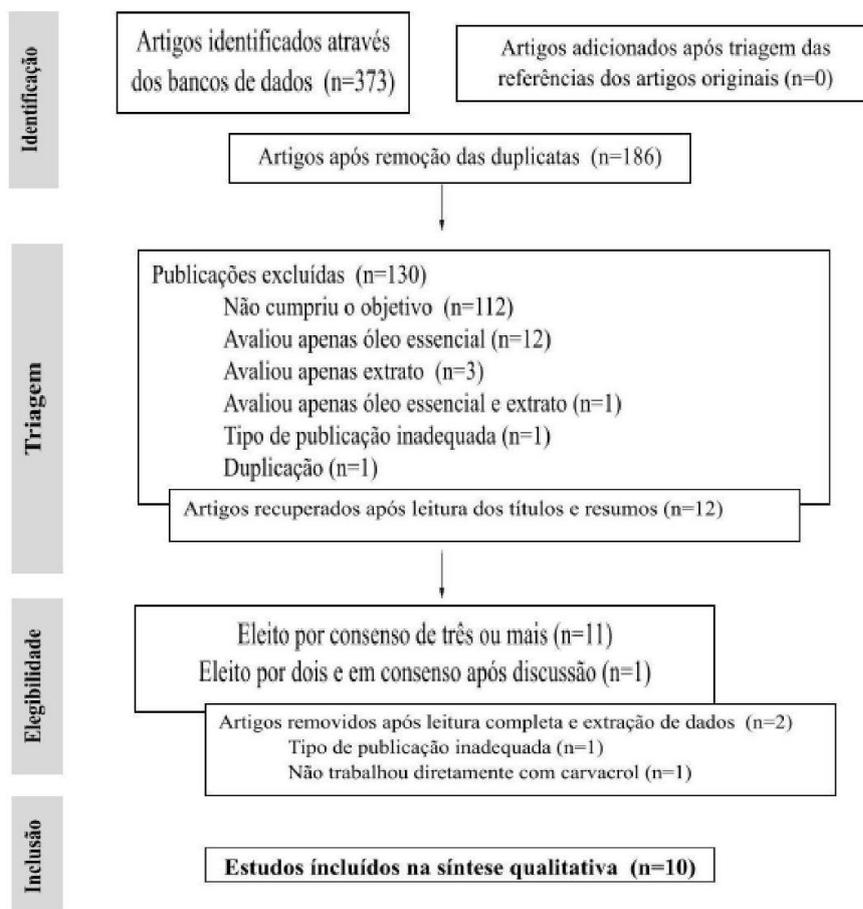


Figura 1. PRISMA flowchart dos artigos incluídos na revisão sistemática.

3. RESULTADOS

3.1 Características dos estudos

Um total de dez publicações foram incluídas nessa revisão sistemática. Seis estudos eram experimentais *in vitro* (18-23), dois realizaram exclusivamente análises *in silico* (24,25), e dois estudos mesclaram ensaios experimentais e computacionais em suas avaliações (26,27). Nove espécies de micobactérias foram investigadas nas publicações selecionadas: *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. bovis*, *M. mucogenicum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*.

Quanto à origem dos compostos, seis estudos adquiriram CAR comercialmente, todavia, aqueles que trabalharam com derivados sintetizaram-nos a partir de rotas químicas diversas, com destaque para a acilação de CAR com cloreto de benzoíla e a halogenação de CAR, que gerou compostos com atividades biológicas similares ao de CAR (26). Apenas um estudo obteve CAR e um de seus derivados por meio da hidrodestilação de partes aéreas de planta (23). Sete estudos avaliaram

apenas a atividade de CAR (18,19, 21,22,24,25,27), ao passo que em outros três foram avaliados seus derivados (20,23,26). O objetivo da maioria dos estudos (70%) foi avaliar a atividade antimicrobiana de CAR isoladamente ou em combinação com outros compostos. Os prováveis mecanismos de ação e combinação de CAR com outras moléculas foram avaliados por diferentes metodologias *in vitro* (ação em lipídios da membrana, determinação de fosfato extracelular e ATP intra e extracelular, avaliação da atividade citotóxica, análise de isotermos e de sobrenadante de cultura pós exposição a CAR, estudo em monocamada celular, avaliação por microscopia eletrônica, acumulação de brometo de etídio, ação em biofilmes pré-formados e em formação, estudo de inibição enzimática) e *in silico* (predições computacionais de atracamento molecular, bem como simulações virtuais de QSAR). Análises estatísticas foram realizadas em três estudos (18,19,27), enquanto que ensaios de citotoxicidade foram relatados em apenas dois trabalhos (20,27).

3.2 Ação antimicrobacteriana do carvacrol e derivados

Para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), seis estudos realizaram microdiluição em caldo (18,20,21,26,27). Dentre esses, um avaliou a atividade do CAR também em sua forma de vapor (18). A CIM de CAR variou de 2,02-512 ug/mL entre as espécies testadas. Especificamente para *M. tuberculosis* H₃₇Rv, obtiveram-se valores de CIM que variaram de 2,02-76 ug/mL. Já diante de isolados clínicos resistentes dessa espécie, as CIM variaram de 19-152 ug/mL. Em relação às MNTs, os valores de CIM relatados variaram de 32-512 ug/mL, sendo o valor mais baixo para o isolado clínico *M. smegmatis*. As concentrações inibitórias mínimas apontadas na fase de vapor (16-64 ug/mL) foram menores para todos os isolados, comparado às de fase líquida. Os valores de concentração bactericida mínima (CBM) foram de 2–4 vezes maiores (64-2048 µg/mL) do que as CIM em todas as MNTs testadas, exceto para o isolado *M. fortuitum*. Em um estudo foi avaliada a CIM de CAR pelo método de macrodiluição em caldo, em cepas padrões de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* com valor de 72,2 ug/mL, enquanto o derivado metil-carvacrol foi levemente mais eficiente com um valor de CIM 50 ug/mL (22). A atividade antibiofilme apontou resultados promissores com concentrações de 1/2 e 1/4 da CIM de CAR para inibir o crescimento planctônico (28-46%) e forte inibição de mais de 70% da biomassa do biofilme para todos os isolados testados. Além disso, notou-se que em concentrações maiores (2-8xCIM), ocorreram desagregação significativa na biomassa e na atividade metabólica do biofilme pré-formado em 4 e 8 dias (18). Além disso, foi possível observar, após a exposição de *M. avium* subsp *paratuberculosis* à CAR, alterações físico-químicas na membrana celular do microrganismo. Houve um aumento na permeabilidade da membrana, com rápido decréscimo das concentrações de ATP intracelular (19). Em relação aos derivados de CAR, alguns mostraram-se totalmente inativos em micobactérias com as derivações químicas realizadas, enquanto outros apresentaram-se com atividade reduzida comparada ao CAR (22,23,26).

3.3 Possíveis alvos micobacterianos do carvacrol

CAR demonstrou ligação promissora no sítio ativo da corismato mutase (CM) micobacteriana por ensaios de atracamento molecular, interagindo com resíduos essenciais para atividade enzimática (Arg72 e Arg134) (26). A atividade de CAR como inibidor de CM foi confirmada por ensaios de inibição enzimática, com IC₅₀ de 1.06±0.4 µM. Adicionalmente, a atividade inibitória de análogos de CAR também foi avaliada e revelou que a substituição do grupamento hidroxila (OH) ligada ao anel aromático levou à queda na atividade dos derivados. A acetilação do grupo OH e a esterificação do grupo OH com metilação da molécula tornaram os compostos inativos. Apenas o derivado de cloro apresentou atividade com IC₅₀ de 13,7 ± 1,9 uM, enquanto os derivados de bromo e nitro foram completamente inativos. Nos modelos de QSAR estudados, foi correlacionado a presença de grupos fenólicos bem como do grupamento OH conferindo características químicas especiais à molécula de CAR, tornando-os essenciais para a atividade biológica do composto. CAR demonstrou atuar como um potencial inibidor da proteína de dormência sHSP 16.3 (choque térmico) de *M. tuberculosis* (25). Simulações de dinâmica molecular mostraram ligação forte e estável de CAR em um sítio ativo de sHSP 16.3 formando uma ligação de hidrogênio e quatro ligações hidrofóbicas de alquil, que formaram conformações de ligações estáveis.

4. DISCUSSÃO

Os estudos incluídos neste estudo demonstram que CAR possui fraca a moderada atividade antimicrobacteriana comparado aos fármacos padrões, assim como outros compostos naturais já estudados anteriormente (28,29). Quando testado em combinação com rifampicina (RIF) apresentou efeito sinérgico em 55% dos isolados de *M. tuberculosis* MDR, não apresentando efeito antagônico com outros fármacos testados (20). RIF é um fármaco de primeira linha utilizado no tratamento da TB e hanseníase. Embora algumas espécies de MNTs possuam resistência intrínseca ao antibiótico, RIF ainda pode ser empregada no tratamento de infecções causadas por *M. avium* e *M. kansasii* (3). Al-in e colaboradores (2015) também observaram sinergismo de CAR com amicacina em *M. fortuitum*, fármaco importante no esquema terapêutico de várias micobacterioses (3). Resultados obtidos no

ensaio na fase de vapor reforçam o potencial em utilizá-lo para desinfecção de superfícies contaminadas e em estratégias de uso por via inalatória, corroborando achados que relataram o uso de compostos em sua forma de vapor para outras espécies patogênicas (30-32).

Marini e colaboradores (2019) demonstraram que CAR tem efeito na formação e em biofilmes pré-formados de isolados clínicos de *M. abscessus* e *M. fortuitum*. A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência de microrganismos ubíquos, como as MNTs. Nesse estado, os microrganismos estão protegidos pela matriz celular exopolissacarídica, que funciona como uma barreira física. Devido ao gradiente de gases, componentes tóxicos e depleção de nutrientes e oxigênio nos biofilmes, o crescimento micobacteriano ocorre de forma assíncrona, com flutuações na expressão gênica que podem resultar em resistência aos fármacos (33). A TB e micobacterioses são doenças sabidamente caracterizadas pela formação de biofilmes (33,34), o que pode justificar a dificuldade terapêutica e as recidivas, mesmo após o tratamento. Embora o número de espécies avaliadas seja pequeno, os resultados são promissores. É grande a necessidade de buscarmos por compostos que tenham atividade antibacteriana eficaz além do estado planctônico e possam desestruturar biofilmes formados e em formação.

A erradicação das formas resistentes de micobactérias é um grande desafio para o desenvolvimento de novos fármacos. Metodologias *in silico* são ferramentas que permitem otimizar as avaliações em menores intervalos de tempo, com menos custos e pautadas em análises biocomputacionais que propiciam trabalhar com a síntese de moléculas mais direcionada ao alvo (36,37). Nesse sentido, dois possíveis alvos de CAR - enzima CM e proteína sHSP 16.3 - apresentaram resultados promissores nas análises *in silico*. A CM faz parte da via do chiquimato, responsável pela síntese de compostos aromáticos essenciais como aminoácidos (Fen, Tir) e vitaminas E e K (38). Essa via é de extremo interesse para o desenvolvimento de fármacos devido seu caráter de essencialidade em bactérias, fungos e parasitas e ausência em mamíferos. A proteína de choque térmico, por sua vez, é crucial para o desenvolvimento de *M. tuberculosis* no hospedeiro (39), sendo também importante para a sua virulência (40) e espessamento da parede celular (41), permitindo seu crescimento e propagação da infecção sob longos períodos em condições adversas ao microrganismo.

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo é pioneiro em recuperar e sintetizar sistematicamente os trabalhos que avaliaram o potencial antimicrobiano de CAR e derivados sobre o gênero *Mycobacterium* spp. CAR demonstrou ser um candidato para futuras moléculas com atividade contra micobactérias, com capacidade de inibir vias metabólicas essenciais para o microrganismo. Estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos de ações e os efeitos da utilização desses, bem como ampliar as análises para um painel maior de espécies de micobactérias com distintos perfis de resistência e sintetizar novos derivados com maior afinidade pelos bacilos.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Forbes BA. *Mycobacterial Taxonomy*. 2017;55(2):380–3.
2. WHO. *Global tuberculosis report 2020*. Geneva: World Health Organization; 2020. 2020.
3. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official {ATS/ERS/ESCMID/IDSA} Clinical Practice Guideline. *Clin Infect Dis*. 2020;71(4):905–13.
4. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B, Zhang Y, Pan X, Girard W, et al. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(8):928–34.
5. Mougari F, Bouziane F, Crockett F, Nessar R, Chau F, Veziris N, et al. Selection of Resistance to Clarithromycin in *Mycobacterium abscessus* Subspecies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(1).
6. Moon SM, Park HY, Kim S-Y, Jhun BW, Lee H, Jeon K, et al. Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Resistance Mutations Associated with Macrolide-Resistant *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6758–65.
7. Antonia Nostro, Teresa Papalia. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Perspectives. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2012;7(1):28–35.
8. Kirimer N, Başer KHC, Tümen G. Carvacrol-rich plants in Turkey. *Chem Nat Compd*. 1995;31(1):37–41.

9. Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgueño MR, Acedo-Félix E, González-León A, Morales-Trejo A, Vázquez-Moreno L. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OREGANO (*Lippia palmeri* {S} . WATS) ESSENTIAL OIL COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE. *Rev Fitotec Mex.* 2011;34(1):11–7.
10. Rivas L, McDonnell MJ, Burgess CM, O'Brien M, Navarro-Villa A, Fanning S, et al. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;139(1–2):70–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.029>
11. Ait-Ouazzou A, Espina L, Gelaw TK, De Lamo-Castellví S, Pagán R, García-Gonzalo D. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2013;114(1):173–85.
12. Force M, Sparks WS, Ronzio RA. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytother Res.* 2000;14(3):213–4.
13. Hajhashemi V, Ghannadi A, Pezeshkian SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2002;82(2–3):83–7.
14. Can Baser K. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Curr Pharm Des.* 2008;14(29):3106–19.
15. Uyanoglu M, Canbek M, Aral E, Husnu Can Baser K. Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine.* 2008;15(3):226–9.
16. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and MetaAnalyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097.
17. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev.* 2016;5(1):210.
18. Marini E, Di Giulio M, Ginestra G, Magi G, Di Lodovico S, Marino A, et al. Efficacy of carvacrol against resistant rapidly growing mycobacteria in the planktonic and biofilm growth mode. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219038.
19. Nowotarska SW, Nowotarski K, Grant IR, Elliott CT, Friedman M, Situ C. Mechanisms of Antimicrobial Action of Cinnamon and Oregano Oils, Cinnamaldehyde, Carvacrol, 2,5-Dihydroxybenzaldehyde, and {2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyde} against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). *Foods.* 2017;6(9).
20. de Vasconcelos SS, Caleffi-Ferracioli KR, Hegeto LA, Baldin VP, Nakamura C V, Stefanello TF, et al. Carvacrol activity & morphological changes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Futur Microbiol.* 2018;13:877–88.
21. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine.* 2015;22(2):245–55.
22. Wong SYY, Grant IR, Friedman M, others. Antibacterial Activities of Naturally Occurring Compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl.* 2008;
23. Castilho PC, Savluchinske-Feio S, Weinhold TS, Gouveia SC. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control.* 2012;23(2):552–8.
24. Baby B, Ravisankar V, Nair LS, Nazeem PA. INHIBITION OF MYCOBACTERIAL GLYCOSYLTRANSFERASES WITH PHYTOCOMPOUNDS-AN IN-SILICO APPROACH. *Int J Pharm Sci Res.* 2016;7(3):1125.
25. Jee B, Kumar S, Yadav R, Singh Y, Kumar A, Sharma N. Ursolic acid and carvacrol may be potential inhibitors of dormancy protein small heat shock protein16.3 of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biomol Struct Dyn.* 2018;36(13):3434–43.
26. Alokam R, Jeankumar VU, Sri devi JP, Matikonda SS, Peddi S, Alvala M, et al. Identification and structure--activity relationship study of carvacrol derivatives as *Mycobacterium tuberculosis* chorismate mutase inhibitors. *J Enzym Inhib Med Chem.* 2014;29(4):547–54.
27. Andrade-Ochoa S, Nevárez-Moorillón GV, Sánchez-Torres LE, Villanueva-García M, Sánchez-Ramírez B, Rodríguez-Valdez LM, et al. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:332.
28. de Almeida AL, Caleffi-Ferracioli KR, de L Scodro RB, Baldin VP, Montaholi DC, Spricigo LF, et al. Eugenol and derivatives activity against *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. *Future Microbiol.* 2019;14:331–44.

29. Hegeto LA, Caleffi-Ferracioli KR, Nakamura-Vasconcelos SS, Almeida AL de, Baldin VP, Nakamura CV, et al. In vitro combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Kekkaku*. 2018;111:35–40.
30. Houdkova M, Rondevaldova J, Dosekocil I, Kokoska L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified {MTT} assay. *Fitoterapia*. 2017;118:56–62.
31. Kristinsson KG, Magnusdottir AB, Petersen H, Hermansson A. Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal. *J Infect Dis*. 2005;191(11):1876–80.
32. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47(5):565–73.
33. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2017;307(8):481–9.
34. Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*. 2021;12(1):1606.
35. Sousa S, Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4(1):36–43.
36. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov Today*. 2006;11(13–14):580–94.
37. Alves V, Braga R, Muratov E, Andrade C. QUIMIOINFORMÁTICA: UMA INTRODUÇÃO. *Quim Nov*. 2017;
38. Rohr J. Shikimic Acid. *Metabolism and Metabolites*. {VonE}. Haslam. Wiley, Chichester, 1993. 387 S., geb. 75.00 \pounds -- {ISBN} 0-471-93999-4. *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger*. 1995;107(5):653.
39. Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG, Coates ARM. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect Immun*. 2006;74(2):861–8.
40. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9578–83.
41. Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*. 1998;180(4):801–8.

Palavras-chave: *Mycobacterium*; carvacrol; revisão sistemática.

ATIVIDADE DA POLIMIXINA B COMBINADA COM DERIVADOS 3,5-DINITROBENZOILHIDRAZÔNICOS E COM *N*-ACILHIDRAZONAS DERIVADOS DA ISONIAZIDA CONTRA GRAM-NEGATIVOS MULTIRRESISTES

João Paulo Salvaterra Pasquini¹; Paula Assis Queiroz²; Amanda Dias Pedro³; Pedro Henrique Rodrigues Amaral³; Thalita Camilo da Silva³; Fábio Vandresen⁴; Regiane Bertin de Lima Scodro⁵; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli⁶; Rosilene Fressatti Cardoso⁶; Vera Lúcia Dias Siqueira⁶

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

²Doutora do Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Acadêmica (o) de Graduação em Biomedicina, Laboratório de Bacteriologia Médica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Docente, Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR

⁵Docente, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
e-mail: jaodospaulo@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Polimixina B (PMB) tem sido utilizada como última linha terapêutica contra bactérias Gram-negativas multirresistentes (BGN-MDR), particularmente espécies da ordem *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos. Entretanto, o aumento do uso de PMB tem levado à resistência a esse antimicrobiano, limitando ainda mais as opções terapêuticas (1-3).

Polimixinas (PMB e colistina) são lipopeptídeos catiônicos que interagem com os lipopolissacarídeos (LPS) da parede externa de bactérias Gram-negativas. Esta interação acontece especialmente com moléculas carregadas negativamente, como os grupos fosfato presentes no lipídio A do LPS (4-6). Por outro lado, as bactérias se tornam resistentes à PMB por alterarem a estrutura da membrana externa, com a adição de grupos catiônicos como fosfoetanolamina (PEtn) e/ou 4-amino-L-arabinose (L-Ara4N), o que diminui a negatividade do LPS e conseqüentemente a afinidade pela PMB (6).

O desenvolvimento de fármacos com atividade contra bactérias resistentes, com estruturas e mecanismos de ação diferentes não são vistos há muito tempo, o que dificulta o tratamento e intensifica a necessidade da busca por novas opções terapêuticas (7).

Derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) e *N*-acilhidrazonas derivadas da isoniazida (INZ) foram previamente sintetizadas e demonstraram importante ação contra micobactérias, inclusive contra *Mycobacterium tuberculosis* (8, 9). Ambos os derivados não apresentaram atividade inibitória direta sobre o crescimento de bactérias Gram-negativas. Entretanto, um teste *in silico* utilizando o software *Swiss ADME* (10) mostrou que essas moléculas são doadoras/aceptoras de hidrogênio (8, 9). Ni et al. (11), reportaram que moléculas capazes de restaurar a carga negativa das membranas bacterianas, contribuíram com a melhoria da atividade inibitória de polimixinas. Nesse sentido, surgiu a hipótese de que moléculas doadoras/aceptoras de hidrogênio poderiam levar algum tipo de interação com a carga elétrica da membrana bacteriana ou até mesmo com a própria molécula de PMB, melhorando a atividade deste antimicrobiano sobre a parede celular, especialmente em bactérias PMB resistentes. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade da PMB em combinação com derivados DNH e INZ contra BGN-MDR resistentes à PMB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados clínicos

Foram testados neste estudo treze isolados clínicos (IC) de *Enterobacteriales* (oito *Klebsiella pneumoniae*, três *Enterobacter cloacae*, um *Proteus mirabilis* e um *Providencia stuartii*), e dois isolados da espécie *Acinetobacter baumannii*. Todos os isolados clínicos foram provenientes de coleção da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil e registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AB486FE. Foram selecionados os isolados com multirresistência aos antimicrobianos, inclusive resistentes aos carbapenêmicos e com teste de triagem para resistência à PMB (teste da gota) positivo. Os isolados bacterianos foram estocados a - 80 °C em caldo tripteína de soja (TSB – Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) adicionado de 15% de glicerol (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) e reativados no momento da realização de cada teste.

2.2. Substâncias Químicas e Antimicrobianos

Foram testados quatro derivados DNH (DNH01, DNH11, DNH13 e DNH20), sintetizados a partir da 3,5-dinitrobenzohidrazida, conforme descrito por Valverde et al. (8) e nove *N*-acilhidrazonas sintetizados a partir da isoniazida (INZ01-7, INZ09 e INZ11) de acordo com Sampiron et al., (9). Os derivados foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO – Synth, Diadema/SP, Brasil) a uma concentração final que não inibisse o crescimento bacteriano (< 2,5 %). PMB e INZ foram adquiridas comercialmente (Inlab, São Paulo, SP, Brasil e Sigma-Aldrich, respectivamente).

2.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs da PMB sobre os isolados clínicos selecionados foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo usando caldo Muller Hinton com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA), segundo recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (16). *Escherichia coli* ATCC® 25922 foi utilizada como controle. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e repetidas em dias diferentes. Resistência a PMB foi definida como CIM > 2 µg/ml, de acordo com pontos de corte preconizados pelo BrCAST (12).

2.4 Determinação da ação combinada e fator de modulação

A avaliação do efeito combinado da PMB com derivados DNH foi realizada empregando a técnica de microdiluição em CAMHB em microplacas de 96 orifícios. A PMB foi diluída seriadamente na razão 2, em concentrações variáveis, conforme a CIM de cada isolado. Em seguida, o composto a ser combinado foi adicionado na concentração fixa de 50 µg/ml. O inóculo bacteriano foi acrescentado a cada orifício da microplaca na concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/ml. A microplaca foi incubada a 35 ± 2 °C por 16 a 20 h. A PMB diluída na mesma razão foi utilizada como controle. O efeito da ação combinada foi avaliado pelo fator de modulação (FM), calculado a partir da fórmula: $FM = (CIM \text{ da PMB}) / (CIM \text{ da combinação PMB + derivado})$. O efeito modulatório foi definido quando uma redução ≥ 4 na CIM da combinação de PMB + derivado DNH ou INZ em relação a PMB foi observada (13).

2.5 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada a partir do teste de microdiluição em caldo em isolados bacterianos com $CIM \leq 2$ µg/ml para PMB combinada com os derivados testados. Depois de realizar a leitura das placas usadas para a determinação da CIM, os pocinhos sem nenhum crescimento visível foram homogeneizados e 10 µL foram transferidos para uma placa de TSA (Ágar tripteína de soja - Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) sem antimicrobianos ou derivados. As placas de TSA foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e as unidades formadoras de colônias foram contadas. A concentração que matou 99,9% das bactérias foi considerada a CBM (14).

2.6 Avaliação de integridade da membrana celular através da citometria de fluxo

A integridade da membrana celular foi avaliada em um isolado cuja CIM da combinação PMB + DNH foi ≤ 2 µg/ml e o $FM \geq 4$. O isolado foi avaliado em BD-FACSCalibur 20 h após exposição à CIM e à $0,5 \times CIM$ da PMB bem como à CIM e $2 \times CIM$ da combinação PMB+DNH e adição de iodeto de propídio (IP) em concentração final de 16,6 ng/ml. Um total de 10.000 eventos foram avaliados e a fluorescência detectada.

3. RESULTADOS

A determinação da CIM confirmou a resistência à PMB ($CIM > 2$ µg/ml) de todos os isolados selecionados (Tabela 1). Os derivados DNH foram os mais eficazes na modulação ($FM \geq 4$) e no resgate ($CIM \leq 2$ µg/ml) da atividade da PMB nos isolados testados (Tabela 1). As combinações PMB+DNH01

e PMB+DNH20 apresentaram CIM $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, ou seja, foram capazes de resgatar a atividade da PMB em 11 (73,3%) e modularam a atividade do antimicrobiano em 12 (80,0%) dos 15 isolados bacterianos testados. A combinação PMB+DNH11 resgatou e modulou a atividade em 6 (60%) dos 10 isolados testados, enquanto a molécula DNH13 não resgatou ou modulou a atividade da PMB nos isolados testados (Tabela 1). Com exceção dos isolados de *A. baumannii* (ACCI) e *K. pneumoniae* (262 e 13) que apresentavam altas CIM para PMB (≥ 64), foi possível observar que as moléculas DNH 01, 11 e 20 não foram capazes de resgatar a atividade da PMB apenas nos isolados bacterianos intrinsecamente resistentes a este antimicrobiano, como *P. mirabilis* e *P. stuartii*.

Dentre as nove moléculas de INZ testadas, apenas a associação PMB+INZ11 foi capaz de resgatar (CIM = 0,5 $\mu\text{g/ml}$) e modular (FM = 1024) a atividade da PMB contra o isolado *P. mirabilis* (116), o único com resistência intrínseca testada (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina B (PMB) combinada ou não com derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) e fator modulatório (FM) dos derivados DNH sobre a atividade da PMB em isolados clínicos de bactérias Gram-negativas multirresistentes (BGN-MDR).

IC (Nº de identificação)	CIM (FM) ($\mu\text{g/ml}$)				
	PMB	PMB + DNH01	PMB + DNH11	PMB + DNH13	PMB + DNH20
<i>K. pneumoniae</i> (13)	64	1 (64)	32 (2)	64 (1)	1 (64)
<i>K. pneumoniae</i> (47)	16	0,5 (32)	1 (16)	8 (2)	0,5 (32)
<i>K. pneumoniae</i> (97)	32	$\leq 0,5$ (64)	2 (16)	32 (1)	$\leq 0,5$ (64)
<i>P. mirabilis</i> (116)	≥ 512	≥ 512 (1)	≥ 512 (1)	≥ 512 (1)	≥ 512 (1)
<i>P. stuartii</i> (154)	≥ 512	≥ 512 (1)	≥ 512 (1)	≥ 512 (1)	≥ 512 (1)
<i>E. cloacae</i> (161)	128	0,25 (512)	0,5 (256)	128 (1)	0,25 (512)
<i>E. cloacae</i> (176)	64	0,5 (128)	1 (64)	64 (1)	0,25 (256)
<i>K. pneumoniae</i> (181)	32	1 (32)	-	32 (1)	0,5 (64)
<i>E. cloacae</i> (184)	32	0,5 (64)	2 (16)	32 (1)	0,012 (2560)
<i>A. baumannii</i> (AC252)	128	0,5 (256)	0,5 (256)	128 (1)	0,5 (256)
<i>A. baumannii</i> (ACCI)	128	128 (1)	64 (2)	128 (1)	128 (1)
<i>K. pneumoniae</i> (259)	16	0,5 (32)	-	-	4 (4)
<i>K. pneumoniae</i> (260)	32	$\leq 0,5$ (64)	-	-	0,5 (64)
<i>K. pneumoniae</i> (261)	32	$\leq 0,5$ (64)	-	-	0,5 (64)
<i>K. pneumoniae</i> (262)	64	8 (8)	-	-	1 (64)

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*; *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*; *P. stuartii*: *Providencia stuartii*; *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *A. baumannii*: *Acinetobacter baumannii*.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina B (PMB) combinada ou não com N-acilhidrazonas derivadas da isoniazida (INZ) e fator modulatório (FM) dos derivados INZ sobre a atividade da PMB em isolados clínicos de bactérias Gram-negativas multirresistentes (BGN-MDR).

IC (Nº de identificação)	CIM (FM) ($\mu\text{g/ml}$)									
	PMB	PMB+ INZ01	PMB+ INZ02	PMB+ INZ03	PMB+ INZ04	PMB+ INZ05	PMB+ INZ06	PMB + INZ07	PMB + INZ09	PMB + INZ11
<i>K. pneumoniae</i> (13)	64	64 (1)	64 (1)	64 (1)	64 (1)	64 (1)	64 (1)	64 (1)	64 (1)	64 (1)
<i>K. pneumoniae</i> (47)	16	8 (2)	4 (4)	8 (2)	16 (1)	8 (2)	8 (2)	8 (2)	16 (1)	16 (1)
<i>K. pneumoniae</i> (97)	32	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	16 (2)
<i>P. mirabilis</i> (116)	≥ 512	≥ 512 (1)	0,5 (1024)							
<i>K. pneumoniae</i> (181)	32	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)
<i>E. cloacae</i> (184)	32	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)	32 (1)

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*; *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*; *P. stuartii*: *Providencia stuartii*; *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *A. baumannii*: *Acinetobacter baumannii*.

A avaliação da atividade bactericida da PMB associada aos derivados DNH mostraram que, além de diminuir a CIM, esses derivados foram capazes de também diminuir a CBM desse antimicrobiano para os isolados testados (Tabela 3). As CBMs das combinações PMB+DNH01 e PMB+DNH20 mostraram resultados próximos aos valores da CIM, variando no máximo 4 x a CIM.

Apenas para o isolado *K. pneumoniae* (13) as CBMs das combinações PMB+DNH01 e DNH20 foram pelo menos 8 x CIM. Na associação PMB+DNH11, a CBM foi realizada apenas para o isolado *K. pneumoniae* (47), mas já foi possível observar um comportamento semelhante aos das outras moléculas (DNH01 e 20), ou seja, MBC próxima a CIM. Para a combinação PMB+INZ11 a CBM foi avaliada apenas no isolado *P. mirabilis* (116) e apresentou o mesmo valor da CIM (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Polimixina B (PMB) combinada ou não com derivados 3,5 dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH) e N-acilhidrazonas derivadas da isoniazida (INZ) contra isolados clínicos de bactérias Gram-negativas multirresistentes (BGN-MDR).

IC (Nº de identificação)	CIM (CBM)					
	(µg/ml)					
	PMB	PMB + DNH01	PMB + DNH11	PMB + DNH13	PMB + DNH20	PMB + INZ11
<i>K. pneumoniae</i> (13)	64 (64)	1 (>8)	32	64	1 (>8)	64
<i>K. pneumoniae</i> (47)	16 (16)	0,5 (0,5)	1 (2)	8	0,5 (0,5)	16
<i>K. pneumoniae</i> (97)	32 (32)	≤0,5 (0,5)	2 *	32	≤0,5 (0,5)	16
<i>P. mirabilis</i> (116)	≥512	≥512	≥512	≥512	≥512	0,5 (0,5)
<i>P. stuartii</i> (154)	≥512	≥512	≥512	≥512	≥512	-
<i>E. cloacae</i> (161)	128 (128)	0,25*	0,5*	128	0,25*	-
<i>E. cloacae</i> (176)	64 (64)	0,5 (1)	1*	64	0,25 (0,25)	-
<i>K. pneumoniae</i> (181)	32 (32)	1 (1)	-	32	0,5 (0,5)	32
<i>E. cloacae</i> (184)	32 (32)	0,5 (0,5)	2*	32	0,012 (0,012)	32
<i>A. baumannii</i> (AC252)	128 (128)	0,5 (0,5)	0,5*	128	0,5 (0,5)	-
<i>A. baumannii</i> (ACCI)	128 (128)	128	64	128	128	-
<i>K. pneumoniae</i> (259)	16 (16)	0,5 (2)	-	-	4	-
<i>K. pneumoniae</i> (260)	32 (32)	≤0,5 (0,5)	-	-	0,5*	-
<i>K. pneumoniae</i> (261)	32 (32)	≤0,5 (0,5)	-	-	0,5*	-
<i>K. pneumoniae</i> (262)	64 (64)	8	-	-	1*	-

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*; *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*; *P. stuartii*: *Providencia stuartii*; *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*; *A. baumannii*: *Acinetobacter baumannii*. *Resultados com valores FM ≥4 e MIC <2 que não foram feitos a CBM.

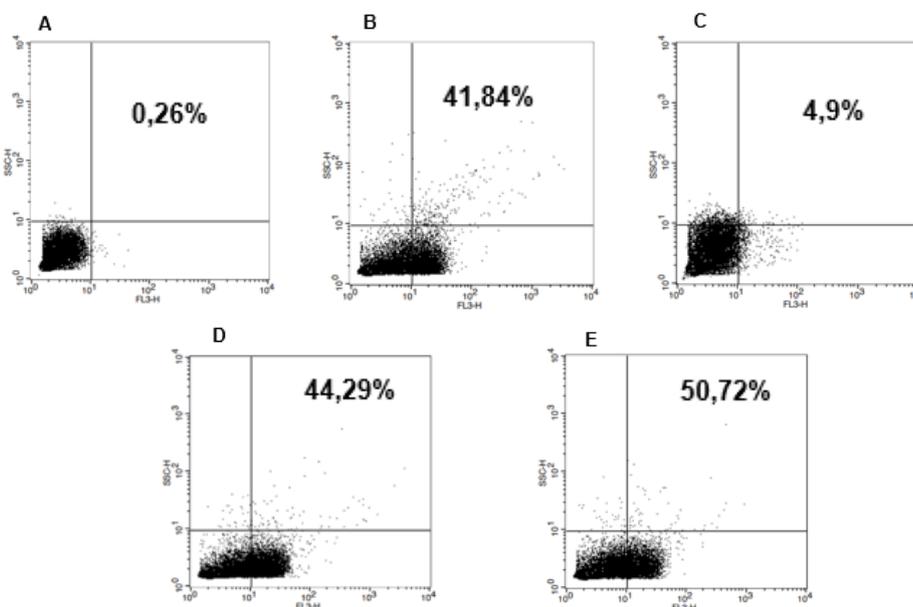


Figura 1. Avaliação da integridade da membrana celular através da citometria de fluxo. As figuras demonstram os resultados da leitura de fluorescência do iodeto de propídio para o isolado clínico de *Enterobacter cloacae* (176) exposto ou não à combinação PMB+DNH01. *E. cloacae* não exposto a associação, controle positivo (A). *E. cloacae* exposto a CIM (64 µg/ml) de PMB (B). *E. cloacae* exposto a 0,5 × CIM (32 µg/ml) de PMB, = (C). *E. cloacae* exposto a CIM (1 µg/ml) de PMB +DNH01 (D). *E. cloacae* (176) exposto a 0,5 × CIM (0,5 µg/ml) de PMB+DNH01 (E). A porcentagem representa a soma dos eventos lidos nos quadrantes inferior e superior a direita, indicando a porcentagem de células bacterianas com dano na membrana celular.

O ensaio de citometria de fluxo foi realizado para avaliar a integridade da membrana celular do isolado bacteriano, exposto ou não à combinação de PMB+DNH01 utilizando a detecção da fluorescência do IP (Figura 1). Uma porcentagem de 41,84% da população bacteriana exposta a CIM de PMB apresentou alteração na integridade da parede celular (Figura 1A), mostrando que nessa concentração a PMB possui atividade bactericida. Já a população bacteriana exposta à 0,5 × CIM de PMB apresenta uma fluorescência semelhante ao controle não tratado, ou seja, poucas células com dano na parede celular (Figura 1C). As células bacterianas expostas a CIM (1 µg/ml) de PMB+DNH01 apresentaram uma taxa de fluorescência de 44,29% (Figura 1D), indicando que combinada à molécula DNH01, uma concentração de PMB 64 vezes menor que a CIM foi capaz de provocar dano celular a ponto de causar um efeito bactericida contra a população bacteriana estudada, confirmando o resgate da atividade da PMB pela molécula DNH01. Quando o isolado bacteriano foi exposto a uma concentração mais elevada (2 × CIM) da combinação PMB+DNH01 a porcentagem de células com dano na parede aumentou para 50,72%.

4. DISCUSSÃO

A crescente prevalência de infecções causadas por BGN-MDR, com opções terapêuticas limitadas, levou ao aumento do uso das polimixinas, inclusive PMB (1-3). Considerando que isolados resistentes a PMB têm sido reportados, alternativas terapêuticas tornam-se imprescindíveis (15).

Nesse estudo avaliamos a capacidade de derivados DNH e INZ recuperar a atividade antimicrobiana da PMB. Os derivados DNH01, DNH11 e DNH20 foram capazes de resgatar a atividade da PMB contra a maioria (> 60%) dos BGN-MDR testados, reduzindo a CIM para ≤ 2 µg/ml, que representa o ponto de corte para sensibilidade à PMB nos isolados estudados (12). O mecanismo de ação mais descrito da PMB é a interação com o lipídio A, presente no LPS da membrana externa de bactérias Gram-negativas (16). Isso ocorre porque grupos fosfato determinam um caráter negativo à essa porção da parede bacteriana. Sem a ação da PMB essa carga negativa é naturalmente neutralizada por cátions bivalentes, como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} , o que traz estabilidade à membrana (4). Contudo, na presença de PMB essa estabilidade é alterada, o que resulta na morte celular por lise (5). O mecanismo de resistência mais aceito é justamente em relação a interação das cargas elétricas entre a PMB e os grupos fosfato. As bactérias resistentes adicionam moléculas catiônicas, como a PEtn e a L-Ara4N, ao lipídio A em substituição aos grupos fosfato, o que diminui a carga negativa do LPS e consequentemente a afinidade pela PMB (5,6). Nesse sentido, acreditamos que os derivados DNH01, DNH11 e DNH20 foram capazes de melhorar a interação entre PMB e parede bacteriana, o que resultou na diminuição da CIM.

Ni et al. (11) mostraram que carbonilcianeto-*m*-clorofenilhidrazona um inibidor de bombas de efluxo, foi capaz de resgatar a atividade da colistina e sugeriram que esse resgate foi devido a restauração da carga negativa da membrana externa bacteriana, através da ruptura da força motriz do próton. Por outro lado, Silva et al. (17) atribuíram a capacidade de um derivado de canfeno em restaurar a atividade de PMB, contra isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, à uma interação direta sobre a molécula deste antimicrobiano, tornando-a mais positiva e facilitando sua ligação ao lipídio A.

A estrutura do LPS apresenta variações inter e intraespécies, o que pode explicar as diferenças nas respostas aos derivados testados. Os isolados *P. mirabilis* e *P. stuartii* são BGN que embora pertençam a ordem *Enterobacterales*, são intrinsecamente resistentes a PMB. Nesses isolados os derivados DNH não foram capazes de resgatar ou modular a atividade da PMB. Entretanto, entre os derivados INZ testados, o INZ11 foi capaz de resgatar a atividade da PMB apenas contra *P. mirabilis*. Já é conhecido que bactérias intrinsecamente resistentes as polimixinas, como *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Burkholderia* spp., *Ralstonia* spp. entre outras, podem ter moléculas de L-Ara4N adicionadas, como substituintes dos grupos fosfato, em diversas posições do LPS, o que resulta em uma membrana menos negativa e consequentemente com muito menos afinidade à PMB (6).

A atividade bactericida das combinações PMB+DNH (DNH01, 11 e 20) e PMB+INZ11, bem como a alteração da integridade da parede celular bacteriana após exposição a PMB+DNH01, avaliada por citometria de fluxo, fortalecem a hipótese de um efeito sobre a membrana. Entretanto mais estudos

deverão ser realizados para definir o mecanismo pelo qual os derivados DNH e INZ resgataram a atividade da PMB.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa destacaram que derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos (DNH01, DNH11 e DNH 20) e *N*-acilhidrazona derivada da isoniazida (INZ11) podem representar promissores candidatos à adjuvantes terapêuticos, capazes de resgatar a atividade *in vitro* da PMB contra BGN-MDR.

FINANCIADORES

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

1. Mo Y, Lorenzo M, Farghaly S, Kaur K, Housman ST. What's new in the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(2):171-81.
2. Garg SK, Singh O, Juneja D, Tyagi N, Khurana AS, Qamra A, et al. Resurgence of Polymyxin B for MDR/XDR Gram-Negative Infections: An Overview of Current Evidence. *Crit Care Res Pract.* 2017;2017:3635609.
3. Paterson DL, Bonomo RA. Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens: The Urgent Need for 'Old' Polymyxins. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:9-13.
4. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clin Infect Dis.* 2014;59(1):88-94.
5. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557-96.
6. Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:55-71.
7. Baser KHC, Buchbauer G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* Boca Raton: CRC Press; 2010.
8. Valverde, T.L. Derivados 3,5-dinitrobenzoilhidrazônicos como modelo para o desenvolvimento de fármacos antituberculose. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Maringá. Maringá, p. 59. 2020.
9. Sampiron EG, Calsavara LL, Santos NCS, Ieque AL, Vandresen F, Olher VGA, et al. Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de uma série de *N*-acilhidrazonas derivadas da isoniazida. *Anais de Simpósios do Programa de Biociências e Fisiopatologia – UEM / Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia.* Vol. 1, Maringá : UEM/PBF, 2019.
10. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7:42717.
11. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3215-8.
12. BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, disponível em: <http://brcast.org.br/documentos>. Consultado em 04.08.2021.
13. Caleffi-Ferracioli KR, Cardoso RF, de Souza JV, Murase LS, Canezin PH, Scodro RB, et al. Modulatory effects of verapamil in rifampicin activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 2019;14:185-94.
14. Isenberg, HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* 2^a ed. American Society for Microbiology Press: Washington DC, USA, 2010.
15. Velkov T, Roberts KD. Discovery of Novel Polymyxin-Like Antibiotics. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1145:343–62.

16. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat.* 2010;13(4-5):132-8.
17. Silva BR, Freitas BC, Queiroz PA, Amaral PHR, Vandresen F, Caleffi-Ferracioli KR, et al. resgate da ação da polimixina B pela tiossemicarbazida derivada do (-)-canfeno contra enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. *Anais de Simpósios do Programa de Biociências e Fisiopatologia – UEM / Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia.* Vol. 1, Maringá : UEM/PBF, 2019.

Palavras-chave: polimixina B; bactérias Gram-negativas; adjuvantes.

Estudos em Parasitologia e Neurogastroenterologia

DIFFERENT STRAINS OF *Leishmania (Viannia) braziliensis* IMPAIRS ILEUM MORPHOLOGY IN HAMSTERS

Amanda Gubert Alves dos Santos¹; Maria Gabriela Lima da Silva², Erick Lincoln Carneiro³, Lainy Leiny de Lima⁴, Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes⁵, Thaís Gomes Verzignassi Silveira⁶, Roberto Kenji Nakamura Cuman⁶, Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁷ and Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo^{5,7}

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

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

³Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Laboratório de Neurogastroenterologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Doutora em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

⁶Docente, Programa de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁷Docente, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
e-mail: agsgubert@gmail.com

1. INTRODUCTION

Over 20 *Leishmania* species are known and can cause leishmaniasis (1), that was considered a neglected tropical disease by the World Health Organization (WHO) since the poorest population is the most affected by the disease (2). Depending on the species of *Leishmania*, the disease can present different clinical manifestations; the 3 main forms of the disease are the visceral (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous (ML) leishmaniasis (1).

According to the Pan American Health Organization, in 2019, 41,617 new cases of CL/ML were reported in the Americas; Brazil was the country with the highest number of cases, representing more than 37% of the total (3). The transmission of the CL occurs after the bite of infected female phlebotomine sand flies; immune cells, as macrophages are attracted to the inoculation site and phagocyte the parasite, that are able to multiply and proceed to infect other macrophages. Thus, there is an increase in the parasite load and the development of skin lesions (4).

Leishmania (Viannia) braziliensis is one of the most important etiologic agent of CL (5) and ML (6), causing destructive damage to the skin and oral, nasal and oropharyngeal mucous membranes (7). However, the DNA of the parasite has been detected in bone marrow (8) and lesions were found in other organs (9,10) in human leishmaniasis. An interesting fact is that different strains of *L. (V.) braziliensis* were found causing distinct lesions in the same patient (11) and in patients in the same region (12), demonstrating the large genetic polymorphism of this *Leishmania* specie. The present study used two strains that were obtained from patients of the same region that presented different responses to leishmaniasis treatment; these strains were previously described by Fernandes (13). It is important to study this genetic polymorphism, as it can be related to the diversity of clinical forms of leishmaniasis.

Previously studies of *L. (V.) braziliensis* infection has the ileum as research subject (14–16). The ileum is a segment of the small intestine and presents the highest concentration of lymphoid aggregates and Peyer patches (17), which together with the immune cells found in the lamina propria (18), playing an important role in the organ immunity. Additional to direct immune function, these cells are able to interact with the enteric nervous system (ENS) and participate in organ tolerance and regeneration (19).

Alterations that suggest an inflammatory response in the organ after *L. (V.) braziliensis* infection have already been found, even without the presence of clinical signs (14,16), included alterations in the area of neuronal bodies of the ENS in the ileum of hamsters infected by other strains of *L. (V.) braziliensis*; and it has been suggested that the changes are time and strain dependent (16). In other study using the same animals of the present work, we were able to detect the parasite's DNA in the ileum and mesenteric lymph node, and immunostaining amastigote forms in the ileum (14). The discovery of the parasite in the organ, together with evidence that the histopathological changes are dependent on the inoculated strain, other analyzes are needed. So, the aim of this study was evaluating

some structural, immune and ENS characteristics in the animals whose presence of the parasite in the ileum was confirmed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

The study was previously approved by the Ethical Committee on Animal Use of the Universidade Estadual de Maringá (UEM) under protocol number 7587260416. We used 24 female hamsters (*Mesocricetus auratus*) with 21-days-old. The animals were kept in individually ventilated cages, with food and water *ad libitum*, a light/dark cycle (12/12 hr) and autoclaved wood shavings and filtered air and water.

2.2. Parasites and infection

For the experiments were used two different strains of *L. (V.) braziliensis* isolated of patients diagnosed in the Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas at UEM (LEPAC/UEM) who had different responses to Glucantime® treatment. These strains were identified by the Oswaldo Cruz Institute (Rio de Janeiro, Brazil) as MHOM/BR/2003/2311 and MHOM/BR/2009/3476 (13). The patient infected with the MHOM/BR/2003/2311 strain developed a typical lesion and was considered moderately resistant to therapy; and the patient infected with MHOM/BR/2009/3476 strain developed an atypical lesion and multiple therapeutic interventions were needed to cure it.

These strains were cultured and cryopreserved in the Leishmaniasis Laboratory at UEM where were they obtained. For the infection, the parasites were thawed and reactivated in a culture of 199 medium (Gibco Laboratories®, Grand Island, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% human urine. Before the infection, the hamsters were anesthetized with ketamine (Francotar®-Virbac Animal health), and xylazine (Calmium Agener-Union Animal Health). The infected groups received in the left hind paw an intradermal injection of each strain containing $2 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ promastigotes forms in the stationary growth phase. The control group received an intradermal injection of $100 \mu\text{l}$ of phosphate-buffered saline (PBS). Thus, were formed six groups of 4 hamsters: two control groups, two groups infected by MHOM/BR/2003/2311 strain (2311) and two groups infected by MHOM/BR/2009/3476 strain (3476).

3.3 Euthanasia and tissue collection

90- or 120-days post infection the hamsters were euthanized under deep anesthesia and after laparotomy the ileum was collected. 1 cm of the ileum was used for histology, 0.5 cm was collected for biochemical analyses and 2 cm was used for the evaluation of enteric neurons.

3.4 Histological processing and analysis

The samples were fixed in buffered paraformaldehyde, dehydrated, diaphanized, and embedded in paraffin to obtain sets with semi-serial $5 \mu\text{m}$ transverse histological sections.

For the quantification of total mast cells, sets were stained with toluidine blue technique. These cells were counted in 100 random microscopic fields (100x objective lens) from the mucosa of the ileum in a Nikon Eclipse E200 optical microscope. For statistical analysis, the quantity of mast cells in 1 mm^2 were calculated.

The collagen fibers were analyzed in picosirius red stained sets. For measurement of type I and III collagen fibers, we captured 16 images with a 20x objective lens in a light microscope (Olympus BX50 - Minato-Ku, Japan) with the use of a polarizing filter (Olympus U-POT, Japan) and for the measurement of total fibrillar collagen, were captured 16 images without the polarizer filter. The results are presented as the average area (μm^2) occupied by the collagen fibers.

3.5 Biochemical analyses

These analyses were performed as previously described by Santos et al (16). Briefly, fragments of the ileum were washed with PBS, frozen in liquid nitrogen, stored in a freezer at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until the use. Where they were homogenized with PBS and centrifuged, the supernatant was then used for the measurement of nitric oxide (NO) with the Griess method and evaluation of enzyme myeloperoxidase (MPO) activity with the o-dianisidine solution. The pellet was resuspended in PBS containing hexadecyltrimethylammonium bromide, homogenized, and centrifuged to measure the enzymatic activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) with a citrate buffer and NAG solution.

Results of NO were expressed in μM concentration of nitrite; MPO were expressed in optical density (OD); and NAG results were presented in OD/g of wet tissue. The analyses were performed in duplicate in a 96-well microplate, and their absorbances were measured in a microplate reader (Spectra Max Plus).

3.6 Neuron counting and morphometry

The fragment collected for the evaluation of enteric neurons was fixed and immersed in 4% paraformaldehyde solution for 3 hours, then it was opened along the mesenteric border, washed with PBS, and stored (PBS with 0.08% sodium azide; $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Fractions of the ileum were dissected to obtain whole mount preparations of the myenteric plexus. The immunohistochemistry technique using the anti-

HuC/HuD (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) antibody was performed as described by Santos et al (16).

For the analyses, 32 images of each animal were captured (20x objective lens) using the FSXBSW Image Browser integrated in an Olympus FSX100 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with immunofluorescence filters. Using the Image-Pro® Plus (version 4.5.0.29) software we count the HuC/HuD-immunoreactive neurons (cells/mm²) and measured 100 neurons (µm²) per animal.

3.7 Statistical analysis

Firstly, we performed the determination of the data distribution in the BioEstat 5.3 software using Shapiro-Wilk or D'Agostino Pearson tests. Thus, we compared the control groups to the infected groups in the same experimental periods and the 90-day infected group to the 120-day group groups using the GraphPad Prism 8.0.1 software. For these analyzes, we used the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's pos hoc test in non-parametric data; the two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple-comparison test was used in the parametric data. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

In order to verify the histoarchitecture of the ileum, some morphometric and cellular analysis were performed, in addition the dissemination of the parasite to the ileum and mesenteric lymph node was confirmed by using qPCR. These data had had already been published by Santos et al (14).

A component of the extracellular matrix evaluated were collagen fibers. Two-way ANOVA demonstrated a significant main effect for the infection [$F(2,18) = 7.98, p = 0.003$] in the type I collagen fibers and a reduction was demonstrated in both infected groups at 90-days post infection when compared to the CG. The total fibrillar collagen and type III collagen fibers did not show alterations (Figure 1).

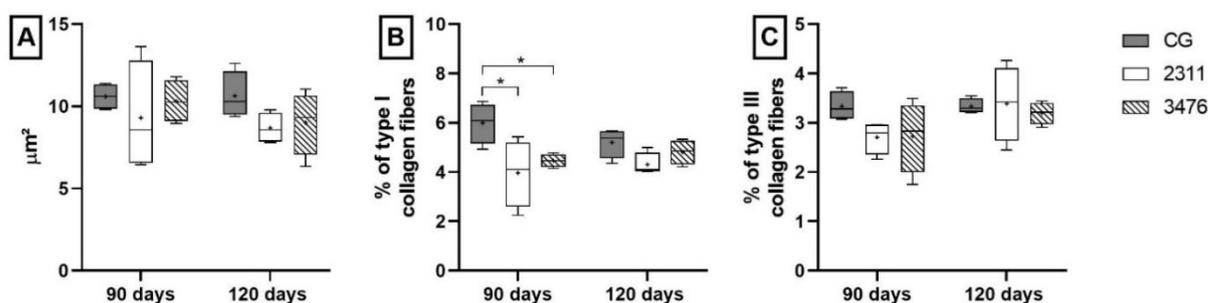


Figure 1. Area occupied by (A) total fibrillar collagen (µm²) and the percentages of (B) type I and (C) type III collagen fibers. Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 4$). * $p < 0.01$. CG: Control Group. 2311: Group infected by the MHOM/BR/2003/2311 strain. 3476: Group infected by the MHOM/BR/2009/3476 strain.

We can observe a reduction of approximately 60% in the dosage of NO in the 3476 group at 120-days post infection when compared to the 90-days group. In the enzymatic activity of MPO there was a decrease of more than 58% in both infected groups at 120-days post infection when compared with the same groups at 90-days (Table 1). The enzymatic activity of NAG does not present a statistical difference between the groups. However, the two-way ANOVA analyses revealed a significant main effect for the time [$F(1,18) = 4.50, p = 0.048$] in the NAG activity, which was also observed in the NO dosage [$F(1,18) = 5.43, p = 0.031$] and MPO activity [$F(1,18) = 17.0, p < 0.001$] (Table 1).

Table 1. Dosage of NO and evaluation of the enzymatic activity of MPO and NAG in the ileum of hamsters infected with different *L. (V.) braziliensis* strains.

		NO (µM)	MPO (OD)	NAG (OD/g of wet tissue)
	CG	47.408 ± 8.035	0.171 ± 0.014	23.239 ± 0.537
90-days	2311	32.252 ± 8.625	0.197 ± 0.062	32.063 ± 6.370

	3476	36.585 ± 10.352	0.226 ± 0.035	32.105 ± 3.739
	CG	31.020 ± 6.204	0.121 ± 0.016	17.870 ± 2.725
120-days	2311	29.971 ± 1.844	0.081 ± 0.004 [#]	28.097 ± 3.741
	3476	14.826 ± 3.586 [*]	0.087 ± 0.004 [*]	22.190 ± 2.472

Mean ± SE. * represents a statistical difference between the 3476 group at 90- and 120-days post infection; # represents a statistical difference between the 2311 group at 90- and 120-days post infection ($n = 4$, $p < 0.05$). CG: Control Group. 2311: Group infected by the MHOM/BR/2003/2311 strain. 3476: Group infected by the MHOM/BR/2009/3476 strain. NO: nitric oxide dosage. MPO: enzymatic activity of myeloperoxidase. NAG: enzymatic activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase. OD: optical density.

The quantity of mast cells did not present alterations. The number of neurons from myenteric plexus reduced in 2311 group at 120-days post infection and the area of neuronal bodies reduced in both infected groups at 120-days post infection when compared to 90-days. The main effect of the infection in count of neurons was demonstrated by the two way ANOVA [$F(2,18) = 7.21$, $p = 0.005$] (Figure 2).

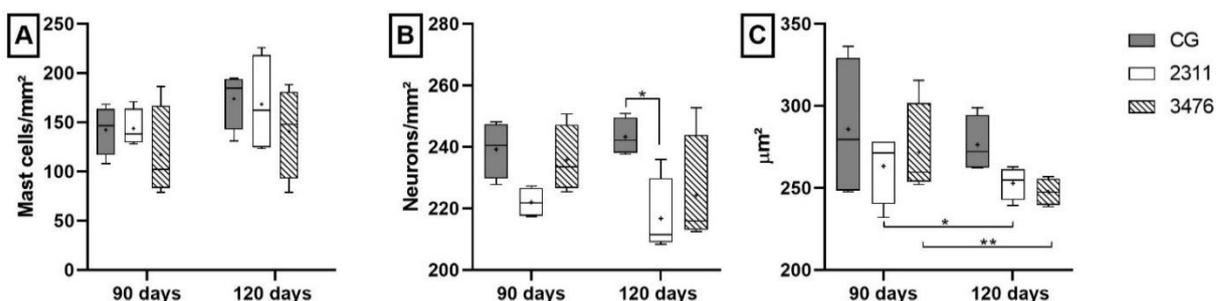


Figure 2. Proportion of (A) mast cells and (B) myenteric neurons per mm² and (C) the size of neuron bodies (µm²) in the myenteric plexus of ileum of hamsters infected by *L. (V.) braziliensis* after 90 or 120 days ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Data represented in box plots (median with 25 to 75 percentile), whiskers (2.5 to 97.5 percentile), and mean (+) ($n = 4$). * $p < 0.05$. CG: Control Group. 2311: Group infected by the MHOM/BR/2003/2311 strain. 3476: Group infected by the MHOM/BR/2009/3476 strain.

4. DISCUSSION

In the experimental infection by *L. (V.) braziliensis*, histopathological changes in other organs than skin have already been described (20,21). The parasite or its DNA were found in the spleen and lymph nodes (20,22,23). Recently, our research group start investigating the effects of these infection in the intestine of rodents (14–16).

Using the same animals that the present study, changes suggestive of inflammation were found, e.g., the increase of intraepithelial lymphocytes and in the thickness of the layers in the intestinal wall, inflammatory infiltrate, higher villus, ganglionitis and periganglionitis (14). For the better understand of the parasite-intestine interaction, we evaluated others parameters that can be related with the inflammatory response.

At 90-days post infection, we observed in both infected groups a reduction in the proportion of type I collagen fibers. This fact could be related with the production of collagenases and gelatinases by immune cells such as neutrophil and macrophages (24), that were found in the inflammatory infiltrate in these animals (14), and are responsible for the degradation of these fibers (24). At 120-days we do not found alterations in the collagen fibers. Corroborating this finding, MPO and NO levels were lower at 120-days post infection in the infected groups, when compared with the 90-days group.

MPO is an enzyme found primarily in neutrophils and is considered a marker of tissue damage and inflammation, since its release occurs in the phagolysosome and in the extracellular environment after activation of neutrophils (25). NO is one of the main important substances produced by macrophages against *Leishmania* (26). That is, in 120-days post infection there was a decreased in the activity of neutrophils and macrophages. In a study using other *L. (V.) braziliensis* strains was observed

the increase of TGF- β -immunoreactive cells in the ileum (16), which can be influence in the NO production by downregulation some macrophage functions (26,27). In other words, the decrease of NO, can predispose the animals to be more susceptible to infection by *Leishmania* (28). In fact, 120-days post infection we detect the DNA of the parasite in the ileum and mesenteric lymph node in a larger number of animals (14).

Another important component of the immune system is the mast cell. These cells perform a bidirectional crosstalk with the ENS that helps in the maintenance of intestinal homeostasis (29). In our experiment, mast cells present in the mucosa did not show alterations. Other authors described that the activation of these cells is linked to barrier dysfunctions (30), which we do not find in our animals. However, the myenteric neurons present some interesting alterations.

Myenteric plexus is the responsible for the regulation of the gut motility (31). Our results show that the quantity of neurons in group 2311 at 120-days post infection decreased and the size of the neuron bodies reduced when compared the 120- to 90-days infected groups. These alterations could be related with the ganglionitis previously described in these animals (14) that can cause neuronal degeneration, the loss of these cells and consequently their function (32). In Chagas disease, neuronal degeneration is correlated with the increase of the colon wall thickness and the hypertrophy of the muscle layers (33), which was also already observed in the animals of the present study (14).

5. CONCLUSION

L. (V.) braziliensis infection caused inflammatory alterations that may interfere in the host susceptibility to the parasite and in the normal histoarchitecture of the ileum. Including affecting myenteric neurons, which seem to have degenerated after infection. Our results did not show differences between the infected groups, however, we observed some parameters may or may not have changed, depending on the infecting strain and these alterations are time dependent. Further studies should be carried out to better understand the host-parasite relationship, the mechanisms and consequences of the observed alterations.

FUNDING

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Grant Number: 4226522016-4.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CAPES, the CNPq, the Leishmaniasis Laboratory, and the Laboratories of Parasitology and Clinical Parasitology. Also, the Departments of Morphological Sciences, of Pharmacology and Therapeutics and the Department of Clinical Analysis and Biomedicine at Universidade Estadual de Maringá.

REFERENCES

1. World Health Organization W. Leishmaniasis: Key facts [Internet]. World Health Organization. 2021 [cited 2021 Jul 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. World Health Organization W. Neglected tropical diseases [Internet]. World Health Organization. 2012 [cited 2021 Jul 26]. Available from: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/neglected-tropical-diseases>
3. Pan American Health Organization O. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas [Internet]. PAHO. Washington; 2020. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllOwed=y
4. Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia humana. 13. ed.-. São Paulo: Atheneu; 2016. 616 p.
5. Souza M de A, Ramos-Sanchez EM, Muxel SM, Lagos D, Reis LC, Pereira VRA, et al. miR-548d-3p Alters Parasite Growth and Inflammation in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jun 10;0:511.
6. Guerra JA de O, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI de ARC, Gama P, Moura A, et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2011 Mar [cited 2021 Jul 26];5(3):e980. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000980>
7. Conceição-Silva F, Morgado FN. *Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers

- Media S.A.; 2019 [cited 2021 Mar 4]. p. 330. Available from: www.frontiersin.org
8. Silva ES da, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev do Inst Med Trop São Paulo* [Internet]. 2002 [cited 2016 Sep 10];44(3):145–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163907>
 9. Cruz AA V., Alves-Ferreira EVC, Milbratz-Moré G, Chahud F, Ruy PC, Duarte MIS, et al. Case report: Sclerosing orbital inflammation caused by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Mar 4];96(1):197–9. Available from: www.ajtmh.org.
 10. Silva L, Damrose E, Fernandes A-M-F. Laryngeal leishmaniasis, a rare manifestation of an emerging disease. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Mar 3];134(3):211–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879729617300686>
 11. Hoyos CL, Quipildor M, Bracamonte E, Lauthier JJ, Cajal P, Uncos A, et al. Simultaneous occurrence of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis caused by different genotypes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vol. 46, *Journal of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. e320–2.
 12. Quaresma PF, De Brito CFA, Rugani JMN, Freire JDM, Baptista RDP, Moreno EC, et al. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Proc Int Astron Union* [Internet]. 2018 [cited 2021 Feb 2];145(9):1161–9. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0031182018000276>
 13. Fernandes ACBS, Pedrosa 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* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Oct 19];167:83–93. Available from: https://ac.els-cdn.com/S0014489416300935/1-s2.0-S0014489416300935-main.pdf?_tid=d313179a-b483-11e7-a411-00000aacb35f&acdnat=1508386573_d4efeed84e76df0b16777e3777452342
 14. 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* [Internet]. 2018 Oct;106(July):1624–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.120>
 15. Santos AGA dos, Ferlini J de P, Vicentino SL, Lonardonni MVC, Sant'Ana D de MG, Melo G de AN de, et al. Alterations induced in the ileum of mice upon inoculation with different species of *Leishmania*: a preliminary study. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2018 Aug [cited 2018 Oct 15];51(4):537–41. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822018000400537&lng=en&tlng=en
 16. 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* [Internet]. 2021 Jul 14 [cited 2021 Jul 26];0:626. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.687499/full>
 17. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2021 May 23]. p. 667–85. Available from: www.nature.com/reviews/immunol
 18. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. 608 p.
 19. Jacobson A, Yang D, Vella M, Chiu IM. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes [Internet]. *Mucosal Immunology*. Springer Nature; 2021 [cited 2021 Mar 8]. p. 1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00368-1>
 20. 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* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2017 Aug 6];140(06):771–9. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182012002156
 21. Pereira CG, Silva ALN, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Romão RP, et al. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Oct 6];165(3–4):231–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709004166>
 22. Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MAP, Miles MA. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* [Internet]. 1996 Oct 1 [cited 2021 Mar 4];115(3):311–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997596800880>

23. Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2018 May 20];82(12):5203–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287925>
24. Teles RMB, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun* [Internet]. 2010 Mar [cited 2021 Aug 2];78(3):1012–21. Available from: <https://journals.asm.org/journal/iai>
25. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Feb 15;640:47–52.
26. Bogdan C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine X*. 2020 Dec 1;2(4):100041.
27. de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol* [Internet]. 2012 Jun 8 [cited 2021 Mar 5];3(JUN):145. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00145/abstract>
28. Calegari-Silva TC, Vivarini AC, Pereira R de MS, Dias-Teixeira KL, Rath CT, Pacheco ASS, et al. *Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. *Eur J Immunol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2021 Aug 2];48(7):1188–98. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201747257>
29. Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotoner C, et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells* [Internet]. 2019 Feb 8 [cited 2021 Aug 2];8(2):135. Available from: </pmc/articles/PMC6407111/>
30. Zuani M De, Secco CD, Frossi B. Mast cells at the crossroads of microbiota and IBD. *Eur J Immunol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Aug 2];48(12):1929–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201847504>
31. Buhner S, Schemann M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. Vol. 1822, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier; 2012. p. 85–92.
32. De Giorgio R, Sarnelli G, Corinaldesi R, Stanghellini V. Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* [Internet]. 2004 Nov [cited 2017 Oct 22];53(11):1549–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479666>
33. Ricci MF, Béla SR, Moraes MM, Bahia MT, Mazzeti AL, Oliveira ACS, et al. Neuronal Parasitism, Early Myenteric Neurons Depopulation and Continuous Axonal Networking Damage as Underlying Mechanisms of the Experimental Intestinal Chagas' Disease. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 15 [cited 2021 Mar 6];10:583899. Available from: <http://www.cobea.org.br/>

Key words: Leishmaniasis; small intestine; enteric nervous system.

RESPOSTA TECIDUAL DO ÍLEO À INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* (RH) E AO TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea* EM RATOS

Claudia Nara de Almeida Lino-Bratti¹; Maria José Pastre²; Amanda Gubert Alves dos Santos²; Henrique Cazanti Sona³; Luana Vitoria de Araujo Duarte³; Lainy Leiny de Lima⁴; Aline Rosa Trevisan⁵; Emerson Luiz Botelho Lourenço⁶; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁷; Gessilda de Alcantara Nogueira-Melo⁸

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

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

³Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁴Doutora, Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁵Pós-doutoranda, Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Docente, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, Universidade Paranaense, Umuarama, PR

⁷Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁸Docente, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

e-mail: claudiaalino@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença com elevada importância por sua distribuição em todo o mundo, podendo atingir mais de 80% da população em determinados países (1). No Brasil, a toxoplasmose é considerada endêmica, havendo relatos de diversos surtos em várias regiões do país (2). O protozoário *Toxoplasma gondii* pode ser transmitido principalmente pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com formas evolutivas do parasito e pela transmissão congênita (3).

A gravidade clínica da infecção se deve a fatores que influenciam na patogenicidade e virulência do parasito, sendo o genótipo um desses fatores. Destacamos neste estudo a linhagem clonal dominante de genótipo I (RH, CAST e VEL) do *T. gondii*, considerada de alta virulência para camundongos, mas não para ratos (4). Desta forma, pacientes imunocompetentes podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas gerais variados, enquanto pessoas com o sistema imunológico debilitado podem apresentar manifestações clínicas graves (5).

Uma vez adquirida a infecção por via oral, o sistema imune do hospedeiro se depara com o *T. gondii* na mucosa intestinal. O epitélio do intestino é formado por uma única camada organizada em criptas e vilosidades que separa a lâmina própria subjacente das bactérias presentes no lúmen intestinal (6). Composto em sua grande maioria por enterócitos absorptivos, possui também células caliciformes, linfócitos intraepiteliais e células enteroendócrinas. Logo abaixo do epitélio são encontrados vários outros componentes celulares como os mastócitos e fibroblastos secretores de colágeno da matriz extracelular entre outras células (7), que através de mecanismos diversos formam uma barreira ao meio externo intestinal, protegendo o hospedeiro de infecções e exposições contínuas a estímulos potencialmente inflamatórios (8).

Na mucosa intestinal, como reação imediata à invasão celular pelo *T. gondii*, a intensa resposta imune é ativada, mediada pela secreção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios com o objetivo de conter a multiplicação do parasito e induzir a sua eliminação (9). Nesse contexto, a serotonina e o óxido nítrico atuam como quimiotáticos, recrutando células imunes e intensificando o processo inflamatório intestinal (10). Estudos realizados com cepas do genótipo II, demonstram os impactos intestinais causados pelo parasito, como modificações das camadas intestinais, alterações morfológicas e quantitativas nos neurônios entéricos (11), aumento do número de linfócitos intraepiteliais (12) e de mastócitos (13). No entanto, apesar de todos os esforços, o *T. gondii* possui mecanismos diversos de evasão da resposta imune do hospedeiro e pode se disseminar para diversos órgãos do corpo (9). Portanto, o uso de substâncias que atuem na redução do potencial infeccioso do parasito e do dano causado pela infecção se faz necessário.

Considerando os efeitos indesejáveis dos medicamentos utilizados atualmente para a toxoplasmose e as manifestações clínicas graves, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se obter opções terapêuticas mais seguras no futuro (14). Nesse contexto, as plantas medicinais são utilizadas há anos como matéria prima para o desenvolvimento de novos fármacos (15). Dentre elas está a *Echinacea purpurea* (EP), planta capaz de induzir efeitos antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunomoduladores, anti-inflamatórios, antioxidantes e citotóxicos (16). O uso de EP por seu efeito imunomodulador em doenças infecciosas causadas por outras espécies do Filo Apicomplexa (*Leishmania* e *Trypanosoma*) já teve a sua eficácia verificada (17). Embora o tratamento com EP tenha demonstrado importantes atividades protetoras na infecção aguda por diferentes cepas (RH e ME49) de *T. gondii* em camundongos (15), o nosso trabalho é o primeiro estudo com ratos envolvendo a infecção crônica por *T. gondii*. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos teciduais causados no íleo de ratos frente a infecção crônica com oocistos da cepa RH de *T. gondii* e o efeito do tratamento com *Echinacea purpurea* no intestino de animais infectados e não infectados com o parasito.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá sob nº 7633021018. Foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar, com 33 dias de idade, distribuídos (n=4) em 4 grupos: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI); Grupo controle tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GC-EP) e Grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea* (GI-EP).

2.2. Parasitos

Para este estudo foram utilizados 500 oocistos esporulados da cepa RH (genótipo I) de *T. gondii*.

2.3. Delineamento experimental

Os ratos dos grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com 100 mg/kg de *E. purpurea*, por gavagem, 28 dias antes e 28 dias depois da infecção, já aqueles pertencentes aos grupos GC e GI receberam somente água fervida. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas (6h – 18h), recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*. Para a confirmação da infecção dos grupos infectados foi realizada a pesquisa de anticorpos IgG por meio do teste de imunofluorescência indireta.

2.4. Coleta de material biológico

Findado o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. Após laparotomia, o íleo desses animais foi coletado para diferentes técnicas. Anéis de 1 cm foram utilizados para o processamento histológico. Após a fixação em paraformaldeído tamponado (4%) e emblocamento em parafina foram obtidos cortes semi-seriados de 4 μm que foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (quantificação de linfócitos intraepiteliais e morfometria da parede intestinal), picrosirius red (evidenciar colágenos dos tipos I e III), azul de toluidina (quantificação de mastócitos totais) e alcian blue pH 1,0 (AB 1,0) (detecção de sulfomucinas). Outros segmentos (0,5 cm) foram coletados para a realização da técnica de dosagem de óxido nítrico (NO).

2.5. Análises morfométricas da parede intestinal e das fibras colágenas tipos I e III

As mensurações foram feitas no 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 coradas por hematoxilina e eosina. Nas imagens capturadas com a objetiva de 10 \times foi determinada a altura e largura dos vilos, profundidade e largura das criptas, espessura da tela submucosa, da camada muscular total e da parede intestinal total. Nas lâminas coradas com picrosirius red foram capturadas em objetiva de 10 \times 16 imagens em microscópio de luz polarizada para a mensuração de colágeno tipo I e tipo III. As imagens foram posteriormente analisadas utilizando o software de análise de imagens Image Pro Plus®. As fibras colágenas tipos I e III foram quantificadas pelas áreas coradas em vermelho ou verde. Os resultados da morfometria de parede foram expressos em μm e das fibras colágenas em μm^2 .

2.6. Quantificação celular

As quantificações de linfócitos intraepiteliais (LIEs) e células calciformes (CCs) foram realizadas em microscópio óptico, onde foram contadas 2560 células do epitélio intestinal e os LIEs presentes entre essas células. Foi calculada a proporção de LIEs ou CCs/100 células epiteliais. A quantificação dos mastócitos totais também foi realizada em microscópio óptico, em 4 cortes por animal,

onde foram contadas todas as células presentes em 100 campos microscópicos aleatórios em objetiva de 100x. Os dados foram expressos em mm².

2.7. Análises imunohistoquímicas

2.7.1. Imunohistoquímica para marcação de mastócitos e células enteroendócrinas produtoras de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT)

Após a rotina histológica para obtenção de cortes transversais semi-seriados de 4 µm foi realizada técnica para recuperação antigênica utilizando tampão citrato à 92°C em banho-maria. Após, as lâminas foram dispostas em uma câmara escura para realização do bloqueio da peroxidase; bloqueio das ligações inespecíficas; incubadas com o anticorpo primário (overnight); incubados com anticorpo secundário e contra corados com hematoxilina. A análise foi realizada em microscópio óptico, em 4 cortes por animal, onde foram avaliados 50 campos microscópicos aleatórios em objetiva de 40x. Os resultados foram expressos como número de células enteroendócrinas e mastócitos imunorreativos para 5-HT (5HT-IR) por mm².

2.8. Parâmetros inflamatórios

2.8.1. Quantificação da concentração de nitrito para inferir os níveis de óxido nítrico (NO)

Segmentos dos íleos dos animais foram macerados em PBS, em seguida foram incubados em banho-maria a 60°C para inibição da catalase por 2 horas, então foram centrifugados e seus sobrenadantes foram separados para a análise. A dosagem de NO foi realizada utilizando a reação de Griess (0,1 g N-Naftil; 1g sulfanilamida; 2,5 mL ácido ortofosfórico; 100 mL água destilada) com uma curva padrão de nitrito de sódio. A leitura foi realizada em um leitor de ELISA com comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em densidade ótica.

2.9. Análise estatística

Para a avaliação da normalidade dos dados foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk ou D'Agostino-Pearson no software BioEstat (versão 5.3). Os dados que apresentaram distribuição livre foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis (GraphPad Prism versão 5) e apresentados por mediana e percentis. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste de Análise de Variância de duas vias seguido do pós teste de Tukey (GraphPad Prism versão 8.0.1) e foram apresentados por média ± desvio padrão. Para todos os testes foi utilizado $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Durante o período experimental os animais não demonstraram alterações comportamentais e de peso. No final desse período, durante a eutanásia e coleta do material para análise, também não foram visualizadas alterações macroscópicas nos segmentos intestinais coletados.

Em relação às análises microscópicas, nos grupos não tratados, observamos um aumento de aproximadamente 10% na altura e diminuição de 14,6% na largura dos vilos do GI em relação ao GC. Já nos grupos tratados, houve uma redução significativa na espessura da parede total e na altura dos vilos com um aumento de 12,3% na camada muscular do GI-EP em relação ao GC-EP. O GI-EP também demonstrou um aumento de 16,03% na tela submucosa e uma redução de 17,26% na altura dos vilos em relação ao GI. Não foram observadas alterações entre os grupos controles tratados e não tratados (Tabela 1), bem como nas análises das fibras colágenas em nenhum dos grupos (Figura 1).

Tabela 1. Morfometria da parede do íleo de ratos Wistar infectados ou não com *T. gondii* e tratados ou não com *E. purpurea*.

	GC	GI	GC-EP	GI-EP
Parede total	277,9 (242,8; 319,3) ^{ab}	271,2 (225,0; 319,6) ^a	290,7 (255,5; 329,9) ^b	279,3 (221,4; 331,4) ^a
Muscular total	65,25 (49,43; 79,48) ^a	63,70 (48,05; 86,93) ^{ab}	64,00 (45,95; 89,20) ^a	71,90 (49,88; 100,8) ^b
Tela submucosa	32,65 (24,93; 39,80) ^{ab}	31,20 (24,10; 39,13) ^a	32,95 (24,90; 41,18) ^{ab}	36,20 (25,85; 45,63) ^b
Profundidade de cripta	97,65 (78,18; 123,4) ^{ab}	91,10 (69,63; 120,6) ^a	105,2 (82,03; 135,9) ^b	99,60 (74,40; 135,4) ^{ab}
Largura de cripta	31,75 (27,50; 37,73) ^a	32,65 (28,03; 37,48) ^a	30,70 (27,30; 35,10) ^a	32,65 (27,35; 37,65) ^a

Altura de vilosidade	243,0 (201,3;272,2) ^a	266,0 (215,2;305,6) ^b	238,9 (212,9;265,9) ^a	220,1 (184,5;253,0) ^c
Largura de vilosidade	109,8 (84,15;145,5) ^a	93,76 (74,67;123,6) ^b	104,6 (86,05;140,1) ^a	102,0 (87,79;129,1) ^a

Mediana e percentis (μm). Letras diferentes na mesma linha representam significância estatística. GC (Grupo controle); GI (Grupo infectado); GC-EP (Grupo controle tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea*); GI-EP (Grupo infectado e tratado com 100 mg/kg de *E. purpurea*).

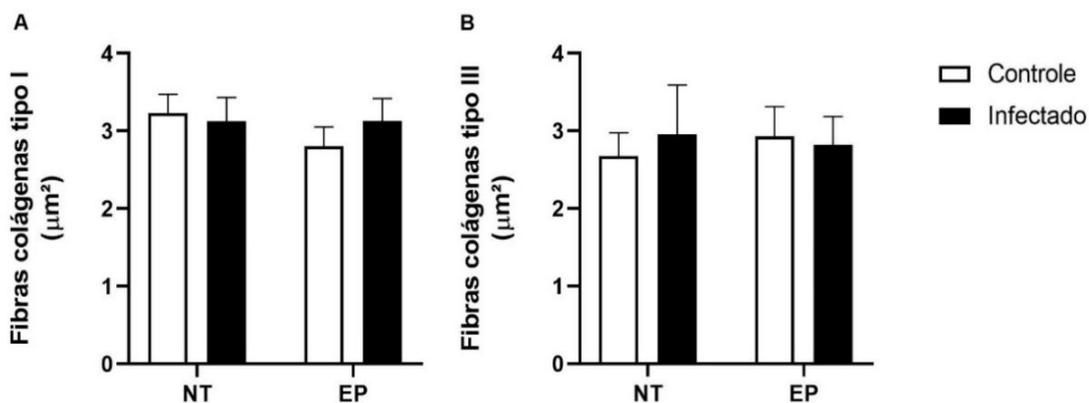


Figura 1. Área (μm^2) ocupada pelas fibras colágenas dos tipos I (A) e III (B) no epitélio do íleo de ratos infectados ou não por *T. gondii* (cepa RH) e tratados ou não com *E. purpurea* evidenciados através da coloração de picosirius. Dados representados por média e desvio padrão. NT (grupos não tratados) e EP (grupos tratados com *E. purpurea*).

A infecção por *T. gondii* e/ou o tratamento com *E. purpurea* não causou alterações no número de LIEs [GC ($4,434 \pm 0,562$); GI ($4,365 \pm 0,167$); GC-EP ($4,805 \pm 0,541$); GI-EP ($4,482 \pm 1,135$)] e na dosagem de óxido nítrico [GC ($53,445 \pm 12,550$); GI ($33,520 \pm 14,541$); GC-EP ($74,798 \pm 38,063$); GI-EP ($51,683 \pm 15,769$)].

Em relação as células calciformes AB pH 1.0, o teste de ANOVA de dois fatores demonstrou significância para o tratamento [F (1,12) = 23.1 p < 0,001]. Corroborando com isso, observamos um aumento significativo na contagem dessas células após o tratamento com EP quando comparamos os grupos controles e infectados entre si. Já a quantificação de mastócitos, demonstrou um aumento dessas células em todos os grupos experimentais quando comparados ao GC. Segundo o teste de ANOVA de dois fatores, há um efeito significativo para o tratamento [F (1,12) = 31.6, p < 0,001], para a infecção [F (1,12) = 10.2 p = 0,007] e também demonstrou interação entre os dois fatores [F (1,12) = 9.50 p = 0,009]. Por fim, as células imunorreativas para serotonina não foram alteradas (Figura 2).

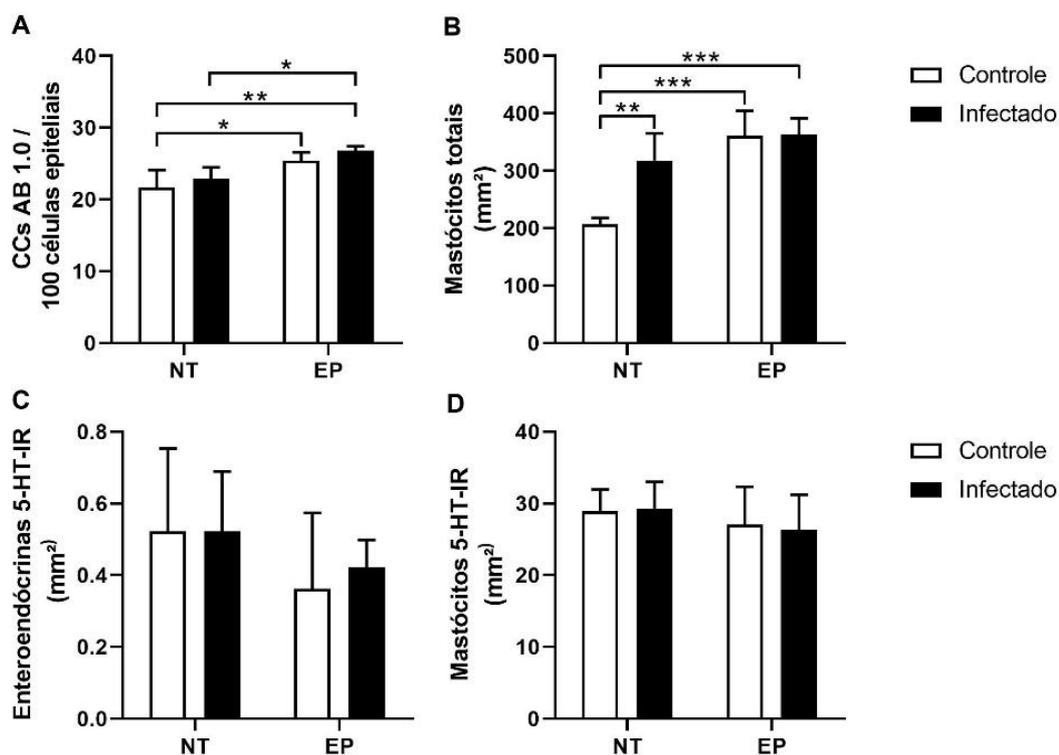


Figura 2. Alterações celulares no íleo de ratos infectados ou não por *T. gondii* e tratados ou não com *E. purpurea*. (A) Proporção da contagem de células caliciformes (CCs) coradas por alcian blue (AB) pH 1,0 por 100 células epiteliais. (B) Mastócitos totais/mm². (C) Células enteroendócrinas imunorreativas para serotonina (5-HT-IR)/mm². (D) Mastócitos imunorreativos para serotonina (5-HT-IR)/mm². NT (grupos não tratados) e EP (grupos tratados com *E. purpurea*) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. DISCUSSÃO

Tendo em vista que na transmissão oral o *T. gondii* chega ao intestino delgado desencadeando uma grande resposta imunológica (9), a imunomodulação proporcionada pelo uso de EP (16) poderia atenuar o potencial infeccioso do parasito, reduzindo possíveis danos ao órgão (11-13). Desta forma, investigamos a resposta tecidual do íleo à infecção e ao tratamento com EP.

A estrutura intestinal é semelhante a um tubo oco, envolto por uma parede formada por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (7). Essas estruturas sofrem alterações durante o processo inflamatório, no qual ocorre um aumento da interação entre as células do sistema imune e de outros sistemas, alterando o metabolismo das células da parede intestinal, tornando-as hipo ou hipertróficas para preservar a homeostase intestinal (18). Esse fato pode ter contribuído para a atrofia da parede total observada no grupo infectado e tratado.

Por outro lado, neste mesmo grupo houve um aumento na espessura da camada muscular total. Nessa camada há uma população residente de macrófagos, que quando ativados, induzem a musculatura lisa a um estado de hipercontratibilidade no intuito de expulsar o parasito (19). Também foi observado um aumento da espessura da tela submucosa e na largura dos vilos do GI-EP em relação ao grupo infectado não tratado. Nesse caso, existe uma relação com a migração de células imunes para a lâmina própria e o epitélio (12, 20), como macrófagos, monócitos e células *natural killer* (NK) cuja estimulação após o uso de EP que já foi descrita por outros autores (21). Contudo, o grupo GI-EP demonstrou uma diminuição na altura e o GI na largura dos vilos. Como essas estruturas são projeções no lúmen intestinal que tem a função de aumentar a capacidade de absorção (7), acreditamos que nesses animais essa capacidade pode ter sido reduzida.

As células caliciformes (CCs) são responsáveis pela liberação de mucinas que constituem o muco e conferem lubrificação e proteção ao epitélio intestinal (7). Nossos dados demonstram uma hiperplasia das células secretoras de mucinas ácidas sulfatadas ou sialomucinas após o tratamento com EP, que pode ter ocorrido em decorrência da ação imunomoduladora da planta (21). O aumento

quantitativo de CCs AB pH 1.0 resulta em uma camada de muco mais ácida e fluída para proteger o epitélio intestinal e auxiliar na expulsão do agente infeccioso.

Durante a fase aguda da toxoplasmose há o recrutamento e proliferação de células imunes que podem persistir a longo prazo no local lesionado (22). Nossos resultados demonstram um aumento nos mastócitos totais 28 dias após a infecção, caracterizando a persistência de resposta inflamatória e sugerindo um possível dano da infecção sobre o íleo. Além disso, houve também aumento dessas células nos grupos tratados, quando comparados aos seus controles, sugerindo novamente uma ação imunomoduladora da EP.

Nossos dados não demonstraram alterações quantitativas significativas nas células imunorreativas para serotonina, linfócitos intraepiteliais e nas concentrações de nitrito no íleo dos animais. Esses dados podem ser explicados pelo fato de não haver multiplicação ativa do parasito na fase crônica da doença e/ou ainda devido à alta renovação celular do tecido (22). Estudo realizado no jejuno de ratos com a cepa ME-49 também não demonstrou alterações quantitativas nos LIEs, embora tenha encontrado diminuição nas CCs secretoras de sulfomucinas após a infecção (23).

5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados nos permitem sugerir que o uso da EP levou à um aumento da imunidade inata/intrínseca no órgão, como o aumento de células caliciformes e mastócitos. Esse uso também é benéfico frente a infecção por *T. gondii*, demonstrado pela diferença entre os grupos infectados nas células caliciformes e alterações na parede intestinal indicativas de aumento de processo inflamatório.

FINANCIADORES

CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

AGRADECIMENTOS

Aos financiadores, aos Departamentos de Análises Clínicas e Biomedicina (Laboratório de Parasitologia Clínica) e de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá. Aos colaboradores do Grupo de Pesquisa em Neurogastroenterologia e aos parceiros da Universidade Paranaense (campus Umuarama) e da Universidade Estadual de Londrina.

REFERÊNCIAS

1. Neves D, Melo A, Linardi P, Vitor R. Parasitologia Humana. 13^a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2016.
2. Ministério Da Saúde. Portal da Saúde. SUS. 2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/23/Boletim-epidemiologico-SVS-38-2-interativo.pdf>
3. Ministério Da Saúde. Portal da Saúde. SUS. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/toxoplasmose>
4. Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart M-P, Dardé M-L, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? Trends Parasitol. 2008;24(7):299-303.
5. Custodio H. Protozoan Parasites. Pediatr Rev. 2016;37(2):59-69; quiz 70-1.
6. Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. Immunology Cell Biology. 2012;90(7):668-75.
7. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica Texto e Atlas. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
8. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nature Immunol. 2014;14(3):141-53.
9. Randall LM, Hunter CA. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. European J Microbiol Immunol Infect. 2011;1(1):3-9.
10. Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, et al. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 1999;21(7):365-76.
11. Ferezin RI, Vicentino-Vieira SL, Góis MB, Araújo EJ, Melo GA, Garcia JL, et al. Different inoculum loads of *Toxoplasma gondii* induce reduction of myenteric neurons of the rat colon. Rev Bras Parasitol Vet. 2017;26(1):47-53.

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;164:56-63.
13. 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*. 2019;114:108797.
14. Sharif M, Sarvi S, Pagheh AS, Asfaram S, Rahimi MT, Mehrzadi S, et al. The efficacy of herbal medicines against *Toxoplasma gondii* during the last 3 decades: a systematic review. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(12):1237-48.
15. Gasparotto Junior A, Cosmo ML, Reis MeP, Dos Santos PS, Gonçalves DD, Gasparotto FM, et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 2016;115(10):3999-4005.
16. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacogn Rev*. 2015;9(17):63.
17. Canlas J, Hudson JB, Sharma M, Nandan D. *Echinacea* and trypanosomatid parasite interactions: growth-inhibitory and anti-inflammatory effects of *Echinacea*. *Pharm Biol*. 2010;48(9):1047-52.
18. Mawe G, Collins S, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motility*. 2004;16:133-6.
19. Bauer A. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterol Motility*. 2008;20:81-90.
20. Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, da Silva Watanabe P, Góis MB, de Melo GdAN, Garcia JL, et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Exp Parasitol*. 2016;165:22-9.
21. Barrett B. Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review. *Phytomedicine*. 2003;10(1):66-86.
22. Ravanbakhsh N, Kesavan A. The role of mast cells in pediatric gastrointestinal disease. *Ann Gastroenterol*. 2019;32(4):338.
23. Sant'Ana DMG, Góis MB, Zanoni JN, da Silva AV, da Silva CJT, Araujo EJA. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Int J Exp Pathol*. 2012;93(4):279-86.

Palavras-chave: toxoplasmose; produtos naturais; intestino delgado.

RESPOSTA TECIDUAL DA PRÓSTATA À INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* (RH) E AO TRATAMENTO COM *Echinacea purpurea* EM RATOS

Julia Calvi Mori¹; Emerson Luiz Botelho Lourenço²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo³; Jaqueline de Carvalho Rinaldi³.

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

²Docente, Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, PR

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

e-mail: pg402453@uem.br

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, uma doença de distribuição mundial (1). A ingestão de alimentos e/ou água contaminados é a forma mais comum de aquisição do parasito. Mas a infecção também pode ser desencadeada por via transplacentária, por transfusão de sangue e por transplante de órgãos contaminados (2, 3).

A toxoplasmose afeta principalmente o sistema nervoso, devido a capacidade do parasito infectar células de vida longa como neurônios, e ocasionalmente outros órgãos/sistemas (4).

A literatura não traz detalhes sobre a relação entre a toxoplasmose e o sistema reprodutor masculino, entretanto, já foi descrita a presença do *T. gondii* no epidídimo e no sêmen (5). Importante ressaltar que o fluido seminal, parte do sêmen, é responsável pela sobrevivência e viabilidade do gameta, portanto influenciando na reprodução humana. Ele é produzido e adicionado ao sêmen pelas glândulas secretoras bulbouretral, vesícula seminal e próstata (6).

A próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta presente na maioria dos mamíferos (7). Enquanto o parênquima glandular é constituído por tecido epitelial, o estroma é formado por tecido conjuntivo e muscular. A heterogeneidade celular do epitélio é marcada pela presença de células secretoras luminais colunares, células basais piramidais, células tronco-adultas e células neuroendócrinas (8). Apesar da escassez de estudos avaliando os impactos da toxoplasmose sobre a próstata, Lopes et al. (5) demonstrou que o *T. gondii* pode induzir inflamação no estroma glandular. Mudanças na organização do estroma torna o epitélio mais suscetível a alterações proliferativas e disfunção secretora.

O tratamento padrão para a toxoplasmose é a pirimetamina associada ao folinato de cálcio e a sulfadiazina (4). Esses compostos agem pela inibição de proliferação do parasito, contudo, estudos mostram que a utilização dessas drogas pode levar a seleção de cepas resistentes (9). Neste sentido, terapias alternativas envolvendo reposição de fármacos ou utilização de plantas medicinais têm sido empregadas (10).

A planta *Echinacea purpurea* (*E. purpurea*) vem ganhando destaque nos últimos anos devido suas propriedades antiviral, antimicrobiana, imunomoduladora, antimutagênica e antioxidante (11, 12). Ela demonstrou resultados promissores quando utilizada em associação à quimioterapia, tratamento de doenças infecciosas, dentárias, intestinais, convulsões, artrite crônica, dentre outras (10, 13). Além disso, estudo prévio descreveu que a *E. purpurea*, reduziu a incidência de hiperplasia prostática bem como alterações degenerativas na glândula após 28 dias de tratamento (14).

Assim, o presente estudo avaliou os impactos da administração via oral da *E. purpurea* antes e após a indução experimental de infecção por *T. gondii* (cepa RH), sobre a morfologia da próstata dorsolateral de rato *Wistar* jovem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento Experimental

Para o protocolo experimental foram utilizados 16 *Rattus norvegicus* machos (Comissão de Ética na Utilização de Animais/UEM - protocolo 7633021018) que aos 21 dias de idade receberam tratamento antiparasitário por via oral (500 mg/kg de suspensão de Metronidazol por 5 dias e 50 mg/kg de suspensão de Fembendazol em dose única). Após 7 dias foi realizado o exame parasitológico para certificação da ausência de parasitos. A partir dos 33 dias de idade estes animais foram distribuídos

aleatoriamente (n = 4) em 4 grupos: Grupo controle (GC); Grupo infectado (GI); Grupo controle tratado com *E. purpurea* (GCEP) e Grupo infectado e tratado com *E. purpurea* (GIEP).

Os ratos dos grupos GCEP e GIEP foram tratados com 100 mg/kg *E. purpurea* via oral diariamente por 28 dias antes da infecção por oocistos de *T. gondii*. Os animais dos demais grupos receberam apenas solução salina estéril. A *E. purpurea* foi preparada a fresco em concentração de 2% de extrato aquoso em 100 mL de água destilada. Após os 28 dias de tratamento com *E. purpurea* cada animal dos grupos infectados (GI e GIEP) receberam, via oral, 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) ressuspendidos em 1 mL de solução salina estéril, enquanto os ratos não infectados (GC e GCEP) receberam apenas água.

Os oocistos foram obtidos do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. A confirmação da infecção foi realizada através da presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no sangue coletado, considerando positivos títulos acima de 25 (15). Após confirmação da infecção, os animais dos grupos GCEP e GIEP foram tratados por 28 dias com 100 mg/kg de *Echinacea purpurea*, diariamente. Os demais grupos receberam apenas água.

2.2. Eutanásia e Coleta de Amostras

Todos os ratos foram eutanasiados após a finalização dos tratamentos por meio de aprofundamento anestésico com vapor de isoflurano. Em seguida, foi realizada a laparotomia vertical para coleta da próstata ventral bem como o complexo urogenital (próstata dorsolateral, bexiga e vesículas seminais). Os órgãos coletados foram dissecados, pesados, fixados em methacarn e processados para as análises morfológicas e morfométricas.

2.3. Processamento Histológico e análises morfométricas

O material foi fixado em methacarn (70% metanol, 20% ácido acético e 10% clorofórmio). Na sequência, as amostras foram desidratadas, diafanizadas em xilol P.A. e incluídas em parafina. Foram coletados até 5 cortes transversais semi-seriados por lâmina, sendo 5 lâminas por amostra. Na sequência foram realizadas as seguintes colorações: a) Hematoxilina e Eosina para a histopatologia além de avaliar a morfometria da altura do epitélio e a fração volumétrica do epitélio, do estroma e do lúmen pelo método de Weibel (16); b) Fucsina-resorcina para estudar a distribuição das fibras do sistema elástico; c) Picrosirius-red para avaliar a distribuição das fibras do sistema colágeno; d) Azul de Toluidina para contagem dos mastócitos totais.

2.3.1. Morfometria da altura epitelial

Foram feitas imagens de pelo menos 10 campos da próstata de cada animal utilizando a objetiva de 40x. Em seguida foi realizada a mensuração de 20 células aleatórias por campo microscópico com auxílio do software Image-Pro Plus®.

2.3.2. Fração volumétrica do parênquima (lúmen e epitélio) e do estroma glandular

Essa análise foi executada através do sistema de contagem de pontos de Weibel (16). Resumidamente, o método consiste em sobrepor uma grade de 168 pontos à imagem histológica (cujo tamanho é padronizado em 11,4 cm de altura) e na sequência efetua-se a contagem dos pontos situados sobre cada compartimento glandular (Lúmen, Estroma e Epitélio). Esta metodologia foi realizada em 10 campos microscópicos, cujas imagens foram obtidas na objetiva de 10x.

2.3.3. Morfometria das fibras colágenas do estroma glandular

As fibras do sistema elástico foram avaliadas de forma qualitativa através de cortes corados com fucsina-resorcina. Fibras do sistema colágeno quantificadas usando coloração de picrosirius-red contra coradas com hematoxilina. As fibras colágenas foram visualizadas em microscopia óptica associada a um polarizador de luz. O colágeno total foi quantificado pelo software Image-Pro Plus®. Os colágenos tipo I e III foram quantificados pela área corada em vermelho e verde, respectivamente.

2.3.4. Quantificação dos mastócitos

Foram contados todos os mastócitos marcados pelo Azul de Toluidina presentes em 100 campos microscópicos na lente objetiva de 100x (área 0,996 mm²) por animal.

2.3.5. Histopatologia glandular

Essa análise qualitativa foi executada em 4 cortes corados por Hematoxilina e Eosina por animal procurando distinguir alterações epiteliais como células vacuolizadas e hiperplasia epitelial. Também foi investigada a presença de infiltrado inflamatório no estroma bem como no lumen acinar.

2.4. Análise Estatística

Os dados foram apresentados por média \pm desvio padrão e comparados entre os grupos pelo teste *Anova Two-way*. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Todos os animais infectados tiveram a infecção confirmada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no sangue. Não foi observado sinais clínicos envolvendo mudança de comportamento, diarreia ou perda de pelos dos animais durante o período experimental. Além disso, a infecção pelo *T.*

gondii bem como o uso da *E. purpurea* não alteraram o peso corporal ou o peso absoluto e relativo dos complexos urogenitais dos animais (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados parciais das análises de peso, estereologia e morfometria

	GC	GI	GCEP	GIEP
Peso do animal (g)	351,00±56,01	394,25±13,89	396,00±23,02	395,50±23,90
Peso do complexo (g)	1,98±0,26	2,26±0,28	2,08±0,13	2,05±0,28
Morfometria da altura do epitélio (µm)	28,28±5,50	27,84±3,17	31,29±5,79	25,30±5,00
Fração volumétrica do epitélio (%)	27,75±4,79	26,25±5,85	28,75±6,94	30,50±13,40
Fração volumétrica do lúmen (%)	47,00±5,71	53,75±12,41	42,50±8,58	42,25±12,39
Fração volumétrica do estroma (%)	25,50±1,73	19,75±9,18	29,50±1,91	27,50±8,70
Fibras colágenas do tipo-I (%)	0,94±0,46	0,50±0,22	1,04±0,30	0,93±0,58
Fibras colágenas do tipo-III (%)	0,53±0,15 ^{ac}	0,23±0,08 ^b	0,48±0,18 ^{abc}	0,67±0,35 ^{ac}
Mastócitos (mm ²)	28,00±8,00 ^a	79,00±5,40 ^{bc}	41,00±5,00 ^{ab}	99,00±4,40 ^c

GC: Grupo controle; GI: Grupo infectado; GCEP: Grupo tratado com *Echinacea purpurea*; GIEP: Grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea*; g: gramas; µm: micrômetros. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, p<0,05.

A morfologia glandular apresentou ácinos/ductos e organização estromal semelhante entre os grupos (Figura 1A). Resultados preliminares da morfometria de altura do epitélio bem como da fração volumétrica dos compartimentos glandulares pelo método de *Weibel* não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 1). Entretanto, nos animais infectados foi observado presença de intenso infiltrado inflamatório no estroma, células epiteliais vacuolizadas e focos de hiperplasia epitelial (Figura 1A e 1B). Além disso, foi observado um aumento significativo de mastócitos totais após a indução da infecção experimental, e esse aumento foi ainda maior expressivo quando associado ao tratamento com a *E. purpurea* (Tabela 1).

No compartimento estromal foi observado um aumento estatisticamente significativo na proporção de fibras colágenas do tipo-III no GI-EP comparado a GI (Figura 1C). A análise qualitativa das fibras elásticas revelou a presença destas fibras dispersas no estroma, ao redor dos ácinos e dos vasos sanguíneos (Figura 1D).

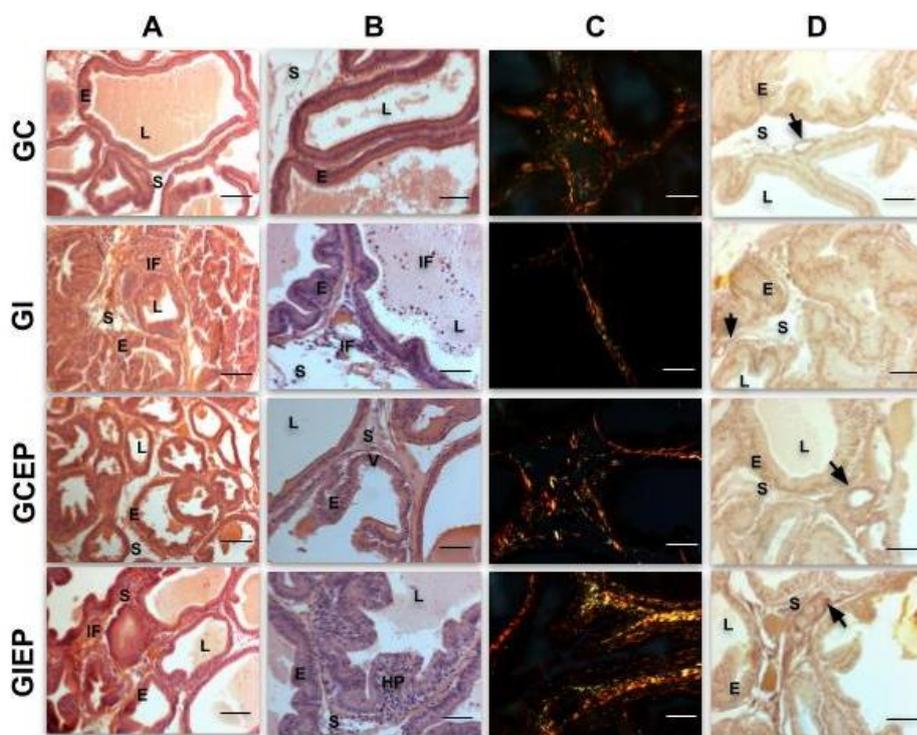


Figura 1. Fotomicrografias da próstata dorsolateral. (A-B) Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina. Aumento: (A) 100x barra=100µm; (B) 200x barra=100µm. (C) Fotomicrografias coradas com picrosirius-red, em vermelho e amarelo observam-se as fibras colágenas do tipo-I; em verde estão as do tipo-III. Aumento: 200x barra=100µm.

(D) Fotomicrografias coradas com fucsina-resorcina, as setas indicam as fibras elásticas coradas em púrpura. Aumento: 200x barra=100um. E, epitélio; S, estroma; L, lúmen; IF, infiltrado inflamatório; V, célula epitelial vacuolizada; HP, hiperplasia epitelial prostática; GC, Grupo controle; GI, Grupo infectado; GCEP, Grupo controle tratado com *E. purpurea*; GIEP, Grupo infectado tratado com *E. purpurea*.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a infecção pelo *T. gondii* (cepa RH) foi induzida experimentalmente em ratos *Wistar* machos, por via oral, utilizando 500 oocistos esporulados. A presença do parasito sistemicamente induziu alterações na arquitetura da próstata dorsolateral, como hiperplasia epitelial prostática, vacuolização celular e infiltrado inflamatório estromal além de remodelação estromal identificada pelo aumento na deposição do colágeno imaturo ou do tipo-III. Além disso, o presente trabalho verificou que o uso da *E. purpurea* (100 mg/kg) por 28 dias antes e 28 dias após o animal ser infectado pelo *T. gondii* amenizou os efeitos intraprostáticos deletérios da infecção. Houve redução do infiltrado inflamatório, bem como aumento de mastócitos totais tanto no grupo controle quanto infectado, evidenciando a sua atividade imunomoduladora já descrita na literatura (12, 14).

A escolha do rato para realização deste experimento foi para estudar a infecção, bem como o tratamento com a *E. purpurea* em um modelo animal resistentes ao *T. gondii* (17). Isto é importante uma vez que a cepa RH é considerada virulenta além de desenvolver resistência ao tratamento padrão com pirimetamina associada ao folinato de cálcio e a sulfadiazina (4, 9).

O extrato da parte aérea de *E. purpurea* foi empregada por apresentar atividades imunomoduladora, anti-inflamatória, antioxidante (11, 12), além de sua ação prostática uma vez que é conhecida a sua propriedade anti-androgênica e a próstata é uma glândula cuja fisiologia é dependente de andrógenos (18).

Estudo prévio já demonstrou que tanto a infecção pelo *T. gondii* quanto o uso da *E. purpurea* não influenciaram no peso de animais ou órgãos. Assim, nosso trabalho corrobora com achados na literatura, apesar das diferenças de protocolo experimental. Segundo o estudo, a manutenção do peso observada pode ser devido às ações benéficas da *E. purpurea* (19).

De modo geral, a morfologia glandular, a altura epitelial e a fração volumétrica dos compartimentos glandulares mostraram-se semelhante entre os grupos. Além disso, foi observado um aumento na deposição de colágeno imaturo (tipo-III) no estroma de animais do grupo infectado e tratado com *E. purpurea*. O colágeno é a proteína mais abundante do corpo e sua principal função é fornecer suporte estrutural para os tecidos (20). A literatura apresenta que na presença de infecção por *T. gondii* (ME-49) a área ocupada por fibras do tipo III (imaturo) é aumentada no jejuno de ratos (21). Além disso, há um relato que o extrato etanólico das partes aéreas e raízes da *E. purpurea* inibe a concentração de colágeno induzida por fibroblastos (10). O aumento observado na deposição de colágeno imaturo pode ser resultado da resposta particular da glândula prostática à complexa interação entre a infecção pelo parasito, o tempo de infecção, e os compostos químicos da *E. purpurea* como as alcaloides que têm função direta na liberação de óxido nítrico e indireta contendo a inflamação (10).

Ainda em relação ao estroma, o grupo infectado e tratado com *E. purpurea* também apresentou maior número de mastócitos em relação ao grupo controle e ao grupo tratado somente com a *E. purpurea*. Os mastócitos são células que atuam como importantes mediadores da resposta inflamatória e sabe-se que na infecção por *T. gondii* há um aumento no número dessas células (21), pois estas estão envolvidas nas respostas ao parasito (22). Além disso, a atividade imunomoduladora da *E. purpurea* pode aumentar a sensibilidade da resposta imune (12).

Nos animais infectados houve presença de intenso infiltrado inflamatório. A literatura mostra que o *T. gondii* induz uma reação inflamatória substancial e crônica na próstata de camundongo que é caracterizada pela presença de monócitos e linfócitos (23). Nesse contexto, a *E. purpurea* é relatada como anti-inflamatória (11), resultado da sua complexa composição química envolvendo alcaloides, derivados do ácido cafeico, polissacarídeos e glicoproteínas o qual acreditam serem responsáveis por essa atividade (24).

Os resultados parciais encontrados neste trabalho ainda deixam uma lacuna na compreensão desse assunto. Para sanar isso, outras análises estão em andamento para auxiliar no entendimento da relação da *E. purpurea* com o *T. gondii* e a próstata.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho são parciais, mas sugerem que a infecção experimental por *T. gondii* (cepa RH) desencadeou intensa inflamação estromal, o que induziu alterações epiteliais como hiperplasia e vacuolização celular. O tratamento de 28 dias com *E. purpurea* antes e após a inoculação do *T. gondii* levou ao aumento da população total de mastócitos intraglandular bem como a remodelação estromal evidenciada pelo aumento da deposição de colágeno

imaturu (fibras do tipo-III) quando comparado a próstata dorsolateral de ratos infectados sem tratamento.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao grupo de Neurogastroenterologia pela colaboração no trabalho, a Universidade Estadual de Maringá pela infraestrutura, ao Programa de pós-graduação em biociências e fisiopatologia por possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira AM, Vitor RWA. Aspectos Taxonômicos e Evolutivos. In: Souza W, Belfort JR. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 21-31.
2. Mangiavacchi, BM. *Toxoplasmose: uma revisão sistemática dos fatores de risco relativos à infecção toxoplásmica em crianças no Brasil*. Acta Biomédica Brasiliensia. 2015; 6(2):49-58.
3. Sher A, Tosh K, Jankovic D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. Cellular & Molecular Immunology. 2017; 14:36-42.
4. Silva FWS, Alves ND, Amóra SSA, Texeira FHV, Accioly MP, Carvalho CG, et al. *Toxoplasmose: Uma Revisão*. Ciência Animal. 2006; 16(2):71-7.
5. Lopes WZ, Santos TR, Luvizotto MCR, Sakamoto CAM, Oliveira GP, Costa AJ. Histopathology of the reproductive system of male sheep experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. 2011; 109:405-09.
6. Pieri NCG. *Biologia da reprodução do macho de viscacha (Lagostomus maximus) – uma parceria entre Brasil e Argentina para integração da biotecnologia da reprodução em animais ameaçados [Dissertação]*. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2011.
7. Oliveira DSM, Dzinic S; Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S; Bonfil RD. The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 2016; 16(1):8-13.
8. Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. Endocr Relat Cancer. 2004 Jun; 11(2):225-54.
9. Reynolds, M. G.; Roos, D. S. A Biochemical and Genetic Model for Parasite Resistance to Antifolates. The Journal Of Biological Chemistry. 1998; 273(6):3461–9.
10. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. Pharmacogn Rev. 2015; 9(17):63-72.
11. Barrett, B. Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review. Phytomedicine. 2003; 10(1):66-86.
12. Hudson, JB. Applications of the Phytomedicine *Echinacea Purpurea* (Purple Coneflower) in Infectious Diseases. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011; 2012:1-16.
13. Grimm W, Muller HH. Arandomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections. Am J Med 1999; 106:138-43.
14. Skaudickas D, Kondrotas AJ, Kevelaitis E, Venskutonis PR. The effect of *Echinacea purpurea* (L.) Moench extract on experimental prostate hyperplasia. Phytother Res. 2009; 23(10):1474-8.
15. Dubey JP. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. Vet. Parasitol. 1998; 74:75-7.
16. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. Journal of Cell Biology. 1966; 30:23-38.
17. De Champs C, Pelloux H, Dechelotte P, Giraud JC, Bally N, Ambroise-Thomas P. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. Parasite. 1998; 5(3):215-8.
18. Gupta M, Sharma D, Sharma A, Kumari V, Goshain OP. A review on purple coneflower (*Echinacea purpurea* L. Moench). J Pharm Res. 2012; 5(8):4076-81
19. Gasparotto Junior A, Cosmo ML, Reis Mde P, et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. 2016; 115(10):3999-4005.

20. Wu M, Cronin K, Crane JS. Biochemistry. Collagen Synthesis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021 [Updated 2020 Sep 11]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507709/>
21. Pastre MJ, Casagrande L, Gois MB, Pereira-Severi LS, Miqueloto CA, Garcia JL, Nogueira-Melo GA, Sant'Ana DMG. *Toxoplasma gondii* causes increased ICAM-1 and serotonin expression in the jejunum of rats 12 h after infection, Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019; 114:1-8.
22. Ferreira GLS, Mineo JR, Oliveira JG, Ferro EAV, Souza MA, Santos AAD. *Toxoplasma gondii* and mast cell interactions in vivo and in vitro: experimental infection approaches in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). 2004; 6(2):172–81.
23. Colinot DL, Garbuz T, Bosland MC, et al. The common parasite *Toxoplasma gondii* induces prostatic inflammation and microglandular hyperplasia in a mouse model. Prostate. 2017; 77(10):1066-75.
24. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. J Pharm Pharmacol. 2005; 57(8):929-54.

Palavras-chave: plantas medicinais; resistência; *Toxoplasma gondii*.

IMMUNOSTIMULATION WITH *Echinacea purpurea*: JEJUNAL RESPONSE TO CHRONIC TOXOPLASMOSIS IN *Rattus norvegicus*

Maria José Pastre¹, Henrique Cazanti Sona², Lainy Leiny de Lima³, Marcelo Biondaro Gois⁴, Mariana Buranelo⁵, Claudia Nara de Almeida Lino Bratti⁵, Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁶, Aline Rosa Trevizan⁶, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁷

¹Postgraduate (PhD) student, Bioscience and Physiopathology Program, State University of Maringá, Maringá, PR

²Biology undergraduate student, morphology lab, State University of Maringá, Maringá, Paraná

³Doctor, Comparative Biology Program, State University of Maringá, Maringá, Paraná

⁴Professor, Health Sciences Center, Federal University of Recôncavo da Bahia, Bahia

⁵Postgraduate student, Bioscience and Physiopathology Program, State University of Maringá, Maringá, Paraná

⁶Postgraduate (PhD) student, Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, Paraná

⁷Professor, Department of Morphological Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná
e-mail: mjpastre35@gmail.com

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is the protozoan that causes toxoplasmosis, a parasitic infection that is widespread all over the world (1). In Brazil, up to 80% of the population has had contact with this parasite and, consequently, positive serology for the disease (2). Its sexual reproduction occurs in the epithelial cells of the small intestine of felids, which are the definitive hosts of the parasite. During reproduction, oocysts are formed and eliminated in the animal's feces. Domestic and wild animals, as well as humans, are intermediate hosts, only for the asexual tissue cycle (1). Infection occurs mainly due to ingestion of water or vegetables contaminated by the oocysts, or meat containing cysts. Sporozoites or bradyzoites are released in the intestine. Then, they invade the intestinal cells and turn into tachyzoites, which characterizes the acute phase. Afterwards, these parasitic forms reach other organs and form cysts, which is the chronic phase of the infection (3).

When it comes to immunocompetent human beings, toxoplasmic infection is often asymptomatic. As for immunocompromised patients, it can cause symptoms and, in some cases, lead to death (1), as the severity level of the infection depends on the host's immune status and the virulence of the parasite strain (4). *T. gondii* has a highly clonal population with subclassification into distinct genotypes. The most used classification proposes three populations of clonal lineages, namely genotypes I, II and III (5). Type I, whose examples of strains are RH, CAST and VEL, has high virulence in mice, with high mortality rates, but not in rats (6, 7). Type II lineage, represented by strains such as ME-49, PDS and PLK, is responsible for most human infections, and leads to chronicity and tissue cyst formation in rats and mice. Type III strains, such as CEP and VEG, are considered avirulent and, therefore, they uncommonly cause infections involving humans (2).

During infection, due to intestinal inflammation (8), the host's immune system is activated, attracting macrophages, neutrophils, monocytes and lymphocytes to the site of inflammation. These cells secrete cytokines, inflammatory mediators and microbicidal substances in an attempt to eliminate the parasite (9). In the intestinal mucosa, mast cells, Paneth cells, lymphocytes, goblet cells, and others, protect the host from pathogens and support local immune response.

Continuous polarized monolayer epithelial cells maintain the electrolyte gradient between the internal and external medium. Close to the epithelium, there are many immune cells, extensions of neurons, blood vessels and also fibroblasts, whose role is maintaining the extracellular matrix mainly through the secretion of collagen and epithelial proliferation, actively contributing to the mucosal barrier (10). A neural cells network in the enteric nervous system (ENS) coordinates all intestinal functions. Ganglia of the myenteric and submucosal plexuses respectively regulate intestinal motility and mucous secretion (10).

Although the host has different defense mechanisms, they are not enough to eliminate the parasite. Currently, the treatment for toxoplasmosis is based on the use of pyrimethamine combined with sulfadiazine, which inhibits the enzymes dihydrophalate reductase and dihydropteroate synthase,

blocking DNA synthesis (11). However, the excessive use of these drugs has led to the selection of resistant strains of this parasite (12).

Plant extracts are of great importance in the production of substances for the creation of new drugs (13). One of them is *Echinacea purpurea*, a plant that has already been acknowledged as an important immunostimulant anti-inflammatory agent (14), with promising results in both *in vitro* and *in vivo* studies using rats (15). Due to its immunostimulating potential, it is believed to reduce inflammation caused by infection.

Given the above, this experiment aimed to evaluate the histological effects against infections caused by *T. gondii* (RH strain H) in the jejunum of rats exposed to the prior use of daily oral doses of 100 mg/kg of *E. purpurea*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals and infection

The experimental protocol (7633021018) was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Experiments, at the State University of Maringá (UEM). We used 24 94-day old male Wistar *Rattus norvegicus* (n=6), divided into four groups, namely CG (Control Group), UIG (Untreated Infected Group), TCG (Treated Control Group) and TIG (Treated Infected Group). The TCG and TIG rats were treated orally with 100 mg/kg of *E. purpurea* for 28 days before and 28 days after inoculation of the parasite. The CG and UIG rats were given just water. The infected groups received 500 sporulated *T. gondii* oocysts (RH strain) orally. The animals were kept in an animal facility with controlled temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) and 12-hour photoperiod (6h - 18h), receiving standard chow and *ad libitum* filtered water.

2.2. Preparation of aqueous extracts

Flowering aerial parts of *E. purpurea*, cataloged by the Herbarium of the Universidade Paranaense under registration number 3451, were collected at the botanical garden of the aforementioned university (Umuarama, Brazil). The plant material was air-dried at 37°C for 5 days, cut and pulverized. The extracts were obtained by infusion (Farmacopeia Brasileira, Brazil 2010). A 4% concentration of aqueous extracts (AEEP) was prepared. A filtered infusion (4g/100 mL) was administered orally (2.5 ml/kg) each day (dosages of 100 mg/kg). The infusions were prepared at the time of administration (13).

2.3. Histological Processing

Twenty-eight days after inoculation, a sample of the animals' blood was collected from their retro-orbital plexus to confirm IgG through the indirect immunofluorescence test. They were euthanized by deep anesthesia with isoflurane vapor. Afterwards, their jejunums were removed and fixed in 4% buffered paraformaldehyde and then exposed to histological routine to be paraffin-embedded and sliced as $4\ \mu\text{m}$ sections through semi-serial transverse microtomy.

Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used to quantify intraepithelial lymphocytes (IELs) and measure the total wall, tunica muscularis, crypts and villi; Periodic acid Schiff (PAS) was used to count neutral mucin-producing goblet cells; Alcian-Blue (AB pH 2.5) was used to count goblet cells producing non-sulfated acid mucins or sialomucins; Alcian-Blue (AB pH 1.0) for counting goblet cells producing sulphated mucins or sulfomucins; finally, a Picrosirius red solution counterstained with Harris hematoxylin, was used to quantify the percentage of the area occupied by type I and type III collagen fibers.

2.4. Immunohistochemistry Technique

The $4\ \mu\text{m}$ sections were fixed in 4% Paraformaldehyde, deparaffinized and rehydrated. Then, they were subjected to antigen retrieval in water bath at 92°C and exposed to the anti-HuC/HuD primary antibody (1:100) produced in rabbit overnight. After that, we added a polymer conjugated with Peroxidase for 30 minutes, which was later revealed by the brown coloration of Diaminobenzidine (DAB) staining for 10 minutes. Finally, counterstaining with Mayer's hematoxylin was performed and the slide was prepared with permont and a coverslip.

2.5. Morphometric Analysis

Based on enlarged images of the H&E staining captured with a 20x objective lens, we measured the thickness of the total wall and the tunica muscularis, the depth and width of the crypts, and the height and width of the villi. For each structure, 80 measurements were taken, and they were uniformly distributed within the whole circumference of each rat's jejunum.

2.6. Goblet cells (GCs) and intra-epithelial lymphocytes (IELs) counting

Each section was divided into 4 quadrants. Under optical microscopy, with a 100x objective lens, 160 cells were counted per quadrant in the mucosal epithelium, with a total of 2,560 cells of the intestinal epithelium of each animal. Among these cells, the GCs (AB staining pH 1, 0, AB pH 2.5 and PAS) and the IELs (HE staining) were also counted. Subsequently, the proportion of goblet cells /100 and IEL/100 epithelial cells was calculated.

2.7. Analysis of type I and III collagen fibers

Polarized light microscopy images were captured, with a 20x objective lens, using Picrosirius red staining counterstained with Harris hematoxylin. It was all quantified within a stained area in the submucosal mesh in μm^2 by using the Image Pro Plus® software. Types I and III collagen fibers were quantified by the polarized area in red and green, respectively.

2.8. HuC/HuD-IR neurons counting

The HuC/HuD-IR neurons found in 35 random submucosal and myenteric ganglia were quantified by using an optical microscope, with a 40x objective lens.

2.9. Statistical Analysis

We used the Bioestat 5.3® software for the statistical analysis. Data distribution was assessed by D'Agostino-Pearson's test. The data with free distribution were shown as median and percentiles (P25; P75). The Kruskal-Wallis criterion variance test was performed and the Dunn's test was used to compare the groups. Normal distribution was shown as mean \pm standard deviation. Finally, the one-way ANOVA criterion variance test was performed and the Tukey test was used to compare the groups. The significance level is 5%.

3. RESULTS

Infection in the animals was confirmed by the presence of antibodies. It did not cause morphometric changes in the total wall of their jejunum. The treatment, in turn, led to an increase in thickness of the total wall. When comparing only the tunica muscularis, it is possible to notice an increase in the TIG compared to the CG, UIG and TCG (Table 1) (Figure 1).

The width of the crypts of infected and untreated animals was reduced and there were no changes in their depth (Table 1) (Figure 1). There was a decrease in height and width of the villi in all groups compared to the CG.

However, when compared to the UIG, the treated groups showed a significant increase in the height of the villi, and their width was reduced. By comparing the two treated groups, we found that there was an increase in height in this structure, and a decrease in its width in the TIG (Table 1) (Figure 1).

Table 1. Median \pm Percentis of the total thickness of the wall, tunica muscularis and mucosa of the jejunum of the rat from the control group (CG), the untreated infected group (UIG), the control grouped treated with *E. purpurea* (TCG) and the group infected and treated with *E. purpurea* (TIG). The UIG and TIG groups were infected with 500 oocysts of *Toxoplasma gondii* (RH strain).

Parameter (μm)	GC	UIG	TCG	TIG
Total Wall Thickness	303.5 264.3; 336.8	289.0 248.0; 343.0 ^b	297.5 266.0; 335.5	308.0 280.0; 335.8 ^b
Tunica Muscularis Thickness	67.0 51.2; 80.0 ^a	63.0 51.2; 74.0 ^b	55.0 40.0; 69.0 ^{abc}	74.0 53.2; 91.0 ^{abc}
Crypt Depth	47.0 35.0; 83.7	45.0 34.0; 65.7	44.0 32.0; 75.0	45.0 34.2; 80.0
Crypt Width	46.0 34.0; 85.0 ^a	41.0 33.0; 64.0 ^a	46.5 34.0; 64.0	45.0 34.0; 80.7
Villi Height	259.5 215.3; 339.0 ^a	219.0 182.3; 258.0 ^{ab}	228.5 197.3; 276.8 ^{ab}	244.0 210.0; 287.0 ^{ab}
Villi Width	92.0 78.2; 115.0 ^a	78.0 67.0; 90.0 ^{ab}	63.0 56.0; 91.7 ^{abc}	60.0 54.0; 65.0 ^{abc}

Values followed by the same letters on the same line indicate a significant difference between groups ($p < 0,05$).

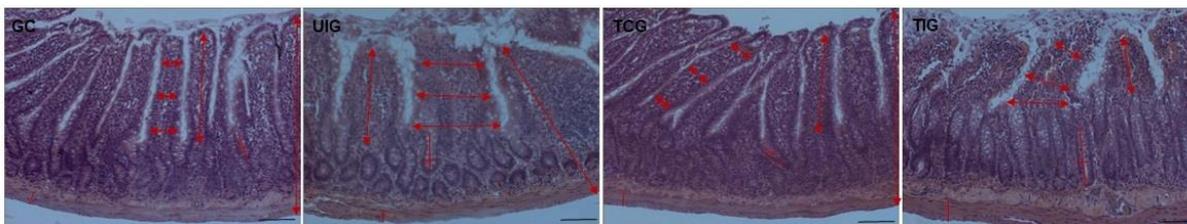


Figure 1. Morphometric analysis of the jejunum of rats. Representative photomicrographs showing the jejunum of the rats from the control group (CG), untreated infected group (UIG), control group treated with *E. purpurea* (TCG) and the infected group treated with *E. purpurea* (TIG). The UIG and TIG were infected with 500 oocysts of *Toxoplasma gondii*, RH strain (genotype I). Histochemical technique for staining in H&E; 10x objective lens; 20 μm bar.

The infection led to an increase in the number of IELs in the jejunal epithelium, whereas the treatment reduced it (Table 2). Regarding goblet cells, both the infection and the treatment caused an

increase in their number. Therefore, when comparing the treated groups, we can notice an increase in the number of goblet cells producing non-sulfated acid mucins or sialomucins in the TIG (Table 2).

Both the chronic infection with 500 *T. gondii* oocysts and the treatment with the herbal medicine caused changes in the extracellular matrix that composes the submucosal mesh of the rats' jejunum. *T. gondii* infection caused an increase in the percentage (%/ μm^2) of type I collagen and a reduction of type III collagen ($p < 0.05$), while the treatment increased the percentages (%/ μm^2) of both I and III collagen types (Table 2) (Figure 2).

The counting of ganglionic neurons in the myenteric and submucosal plexuses did not show significant differences (Figure 3).

Table 2. Median \pm percentiles of the proportion of intraepithelial lymphocytes (IELs) and goblet cells (GCs) present in tunica mucosa, and the percentage (%/ μm^2) of collagen present in the submucosal mesh of the jejunum of rats in the control group (CG), untreated infected group (UIG), control group treated with *E. purpurea* (TCG) and the infected group treated with *E. purpurea* (TIG). The UIG and TIG were infected with 500 oocysts of *Toxoplasma gondii* (RH strain).

Cells ou % collagen	Techniques	CG	UIG	TCG	TIG
IELs	HE	5.0 3.0; 7.0 ^a	7.0 5.0; 9.0 ^{ab}	4.0 3.0; 6.0 ^b	5.0 3.0; 7.0 ^b
GCs	AB 1.0	26.0 22.0; 30.0 ^a	29.0 26.0; 33.0 ^a	30.0 27.0; 32.7 ^a	26.0 26.0; 33.0 ^a
GCs	AB 2.5	25.0 21.2; 29.0 ^a	30.0 26.0; 34.0 ^{ab}	26.0 23.0; 28.0 ^{bc}	31.0 27.0; 35.0 ^{ac}
GCs	PAS	20.5 16.7; 22.0 ^a	23.0 21.0; 24.0 ^a	22.5 20.7; 24.2 ^a	23.5 22.0; 26.0 ^a
%Collagen I	Picosirius	8.2 6.4; 11.3 ^a	10.8 7.8; 13.4 ^{ab}	12.2 10.3; 14.7 ^{ab}	12.4 10.4; 16.7 ^{ab}
%Collagen III	Picosirius	5.7 4.6; 6.9 ^a	3.9 3.3; 5.2 ^{ab}	5.7 4.4; 7.2 ^{ab}	5.5 4.3; 7.0 ^{ab}

Values followed by the same letters on the same line indicate a significant difference between groups ($p < 0.05$).

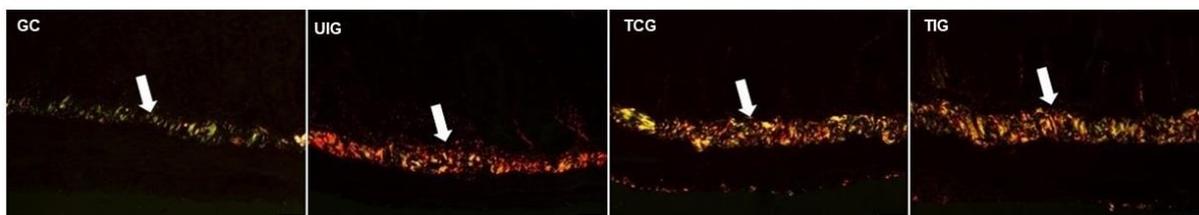


Figure 2. Collagen polarized light photomicrographs. Median and interquartile deviation of the percentage of types I and III collagen fibers, per analyzed area (%/ μm^2), in the submucosal mesh of the jejunum of rats from the control group (CG), untreated infected group (UIG), control group treated with *E. purpurea* (TCG) and the infected group treated with *E. purpurea* (TIG). The UIG and TIG were infected with 500 oocysts of *Toxoplasma gondii*, RH strain (genotype I). Type I (red) and type III (green) collagen fibers, indicated by white arrows in the submucosal mesh of the jejunum in the CG, UIG, TCG and TIG. Histochemical staining technique in Picosirius Red. 20x objective lens; 20 μm bar.

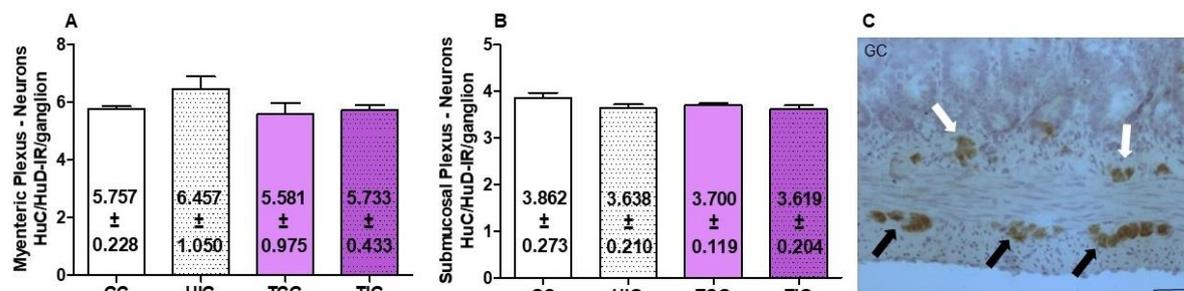


Figure 3. Quantitative analysis of HuC/HuD-IR neurons. Graphs A) Myenteric plexus and B) Submucosal plexus. Mean and standard deviation of the number of panganglionic neurons in the jejunum of the rats from the control group (CG), untreated infected group (UIG), control group treated with *E. purpurea* (TCG) and the infected group treated with *E. purpurea* (TIG). The UIG and TIG were infected with 500 oocysts of *Toxoplasma gondii*, RH strain (genotype I). C) Representative photomicrograph showing the distribution of neurons in the myenteric plexus (black arrows) and submucosal plexus (white arrows) in the CG. Immunohistochemical technique. 20x objective lens; 20 μm bar.

4. DISCUSSION

Oral infection by *T. gondii* causes changes in the intestinal wall by direct action of the parasitic transposition in the acute phase, and by indirect action of the immune and inflammatory response in the acute and chronic phases (4, 7). The intestine has a specialized local immune response to maintain the barrier between light and the interior of the human body. However, under inflammatory conditions, there may be changes in this immune and physical barrier, which allows microbial products to enter. Consequently, the inflammatory response becomes systemic and local inflammation is perpetuated (16, 17, 18).

Inflammation caused by *T. gondii* is considered a model for the study of inflammatory bowel diseases (IBD) (19) and, given the high number of people infected by this parasite, understanding this mechanism and finding ways to prevent or treat it are essential, as it may be related to the etiology or worsening of IBD.

In this study, the animals were previously treated with an *E. purpurea* extract in order to stimulate their immune system and prepare them for a more efficient response when infected. The difference in the host-parasite interaction between infected / immunostimulated animals and the infected control animals was significant in the small intestine, which is a new finding of this study.

The inflammatory response triggered by the infection, which was studied 28 days later, cannot be considered intense, as there were no serious histopathological changes. However, the infected animals showed inflammatory changes, such as an increased number of IELs and goblet cells. It also caused morphological changes such as atrophy of villi and collagen composition.

Treatment of the animals with *E. purpurea* prior to infection showed potential to control inflammatory response. The number of IELs and goblet cells was smaller in comparison with the untreated infected animals, which leads us to think that immunostimulation prevented its increase or resolved more quickly during the days of the experiment.

IELs are protective and immunoregulatory. They proliferate at the site of inflammation and may persist in the long term over the inflamed tissue (20). In this study, infection led to an increase in the number of GCs producing neutral mucins and sulfomucins, and the treatment further increased these numbers. This evidences the important role of mucins and mucus in mucosal immunity, since they provide assistance in the selectivity and regulation of microorganisms in the microbiota, thus, contributing to the reduction or prevention of pathogenic microorganisms. Furthermore, studies have shown that the abundant mucus in sulfomucins and antimicrobial peptides gives the host greater protection against infections triggered by *T. gondii* (21).

The intestinal mucosa has some restructuring dynamics of both the epithelial constitution and the lamina propria. They indicate the immunological moment experienced by the host at the time of analysis. The villi suffered atrophy with the infection, and the treatment with *E. purpurea* partially prevented this atrophy or a regeneration process in progress towards normality. Collagen plays an important role in the composition of the extracellular matrix of the submucosa, as well as in inflammatory response. The amount of type I collagen, which is the most abundant form, and whose main role is to provide resistance to traction stress, was increased during infection, even with the treatment. Type III provides support to local structures, in addition to participating in the tissue regeneration process (22). It was reduced in infected animals and increased in treated ones, which evidences the contribution of *E. purpurea* to the regeneration of the extracellular matrix.

These partial results show the potential of this vegetable as an herbal medicine against toxoplasmosis. Yet, further studies are needed to verify the alterations in the jejunum of rats and their possible consequences.

5. CONCLUSION

Chronic infection with 500 oocysts of *T. gondii* and treatment with *E. purpurea* caused increase in the total wall, muscle tunic increase, reduction in villi width, reduction of the number of IELs, in addition to altering collagen remodeling in the extracellular matrix increasing the percentage of types I and III collagen in the jejunum of rats. Although nerve cells were preserved, this set of changes can interfere in the functioning of the jejunum. Given these results and the need for new treatments for infection caused by this parasite, further research is necessary to assess the effects of *E. purpurea*.

FINANCIAL SUPPORT

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES (001) and Universidade Paranaense.

ACKNOWLEDGEMENTS

Laboratory of Neurogastroenterology at the State University of Maringá.

REFERENCES

1. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012 Sep;139(11):1375–424.
2. Bolais PF et al. A. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro , Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. *Parasit Vectors*. 2017;1–8.
3. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):364–9.
4. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. Vol. 34, *Seminars in Immunopathology*. 2012. p. 793–813.
5. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995;172(6):1561–6.
6. Ajzenberg D. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis ? *Trends Parasitol*. 2008;(May):299–303.
7. Pittman KJ, Knoll LJ. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2015;79(4):387–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26335719><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4557073>
8. Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan WJ. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(13):2355–73.
9. Mennechet FJD, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina Propria CD4 + T Lymphocytes Synergize with Murine Intestinal Epithelial Cells to Enhance Proinflammatory Response Against an Intracellular Pathogen . *J Immunol*. 2002;168(6):2988–96.
10. Farré R, Vicario M. Abnormal Barrier Function in Gastrointestinal Disorders. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* [Internet]. 2016. p. 251–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/164_2016_107
11. Radke J, Burrows JN, Goldberg DE, Sibley LD. Evaluation of current and emerging anti-malarial medicines for inhibition of *Toxoplasma gondii* growth in vitro. *ACS Infect Dis* [Internet]. 2018;acsinfecdis.8b00113. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29998728><http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.8b00113>
12. Falci-parum INP, Reynolds MG, Roos DS. A Biochemical and Genetic Model for Parasite Resistance to Antifolates. *J Appl Biomed*. 1998;273(6):3461–9.
13. Junior AG et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) Moench on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* [Internet]. 2016;(L). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5167-2>
14. Kumar KM, Ramaiah S. Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. *Int J Pharma Bio Sci*. 2011;2(4):304–14.
15. Choi W, Jiang M, Chu J. Antiparasitic effects of *Zingiber officinale* (Ginger) extract against *Toxoplasma gondii*. 2013;15–26.
16. Wilhelm CL, Yarovinsky F. Apicomplexan infections in the gut. *Parasite Immunol*. 2014 Sep;36(9):409–20.
17. Prandota J. The importance of *Toxoplasma gondii* infection in diseases presenting with headaches. headaches and aseptic meningitis may be manifestations of the jarisch-herxheimer reaction. *Int J Neurosci*. 2009;119(12):2144–82.
18. Steven M. Singer, Marc Y. Fink VVA. Autoimmune diseases, gastrointestinal disorders and the microbiome in schizophrenia: More than a gut feeling. *Physiol Behav*. 2019;176(3):139–48.
19. Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunol Cell Biol*. 2012 Aug;90(7):668–75.
20. Ravanbakhsh N KA. The role of mast cells in pediatric gastrointestinal disease. *Ann Gastroenterol*. 2019;(32):338–45.
21. Vicentino-Vieira SL et al. *Toxoplasma gondii* infection causes structural changes in the jejunum of rats infected with different inoculum doses. *Life Sci* [Internet]. 2017;191(October):141–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.10.032>
22. Beckman MJ, Shields KJ, Diegelmann RF. Collagen. *Biomed Eng (NY)*. 2004;1847–56.

keywords: RH strain; phytotherapeutic treatment; toxoplasmosis.

ANÁLISE DO DUODENO DE *Rattus norvegicus* SUBMETIDOS A INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* (CEPA RH) E TRATADOS COM *Echinacea purpurea*

Mariana Buranelo¹, Maria José Pastre², Henrique Cazanti Sona³, Bruna Micheli Amaral Oliveira⁴, Lainy Leiny de Lima⁵, Claudia Nara de Almeida Lino Bratti⁶, Aline Rosa Trevizan⁷, Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁸

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

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

³Acadêmico de Graduação em Biologia, Laboratório de Neurogastroenterologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

⁵Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁶Doutora, Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁷Acadêmica de Pós-Graduação (Pós doutorado), Programa de Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

⁸Docente, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR
E-mail: mariana_buranello@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é o parasita intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, um problema de saúde pública que afeta cerca de um terço da população humana mundial (1). No Brasil, até 80% da população apresenta anticorpos para esse parasito (2) e aproximadamente 30% dos seres humanos infectados apresentam uma infecção crônica e assintomática. Os maiores riscos à saúde são encefalites em pacientes imunocomprometidos, retinopatias e defeitos congênitos na transmissão vertical (3). Os felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, e adquirem-no ao se alimentarem de presas infectadas e liberam oocistos nas fezes (4). Os humanos são hospedeiros intermediários e a infecção ocorre principalmente pelo consumo de água ou alimentos contaminados (5).

A classificação mais comum das cepas do *T. gondii* utiliza o locus SAG2 e distribui o parasito em três linhagens clonais, os genótipos I, II e III (8). A cepa RH, utilizada nesse estudo, pertence a linhagem tipo I, possui alta virulência e mortalidade em roedores (9,10).

Após a ingestão dos oocistos, a infecção se inicia na mucosa intestinal. O duodeno é o primeiro segmento do intestino delgado, local onde ocorre maior liberação do *T. gondii* (11). Os parasitos na forma de taquizoítos, atravessam a barreira epitelial e se espalham por todo o organismo hospedeiro, estabelecendo uma infecção crônica (12). Na transposição intestinal o parasito causa um estado de alerta na mucosa, provocando uma resposta imune com recrutamento de células de defesa para o local da lesão. Estas podem influenciar na motilidade intestinal, secreção e reparos teciduais (13,14).

Atualmente, o tratamento da toxoplasmose é realizado com o uso de pirimetamina combinado com sulfadiazina, que inibem as enzimas diidrofolato redutase e dihidropteroato sintase, bloqueando a síntese de DNA do parasito (15), porém muitas cepas já são resistentes (16). Nesse sentido, extratos de plantas têm grande importância na produção de substâncias para o desenvolvimento de novos medicamentos. A *Echinacea purpurea* (*E. purpurea*) é uma planta nativa da América do Norte, utilizada com fins medicinais pelos nativos americanos e possui uma variedade de ingredientes bioativos com ações antivirais, anti-inflamatórias, imunorregulatórias e imunestimulantes, apresentando resultados promissores em estudos *in vitro* e *in vivo* em camundongos infectados por *T. gondii* (17-19). Desta forma, o presente estudo busca avaliar os efeitos teciduais do tratamento por 28 dias com doses de 100 mg/kg de *E. purpurea*, no duodeno de *Rattus Norvegicus* frente a infecção crônica causada pelo *T. gondii* (cepa RH).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) sob nº 7633021018.

2.1 Animais e infecção

Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus*, Wistar, machos (n=6), com 94 dias de vida, distribuídos em GC (Grupo controle), GI-NT (Grupo infectado e não tratado), GC-EP (Grupo controle e tratado) e GI-EP (Grupo infectado e tratado). Os grupos infectados receberam 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH) por via oral. Os animais foram mantidos em biotério setorial com temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e foto-período de 12 horas (6h - 18h), ração padrão e água filtrada *ad libitum*. A infecção foi confirmada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no sangue coletado da cauda dos ratos pelo teste de aglutinação direta, considerando positivo títulos acima de 25. Os ratos dos grupos GC-EP e GI-EP foram tratados com 100 mg/kg de *E. purpurea*, 28 dias antes e 28 depois da infecção diariamente por via oral. A *E. purpurea* foi preparada a fresco em concentração de 4% de extrato aquoso em 100 mL de água destilada. Os ratos dos grupos GC e GI-NT receberam água fervida pela mesma via.

2.2. Processamento histológico

Os ratos foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de isoflurano e realizada laparotomia vertical para retirada do duodeno. Os duodenos foram retirados e fixados em paraformaldeído tamponado 4%. Após, foram incluídos em parafina para obtenção de cortes transversais semi-seriados de $4 \mu\text{m}$, submetidos a desparafinização e às técnicas: Hematoxilina e Eosina (HE), a fim de quantificar os linfócitos intra-epiteliais e mensurar a espessura total da parede, túnica muscular, tela submucosa, criptas e vilos; Ácido periódico de Schiff (PAS), para contagem de células caliciformes produtoras de mucinas neutras; Alcian-Blue (AB pH 2,5,) para células caliciformes produtoras de mucinas ácidas não sulfatadas ou sialomucinas; Alcian-Blue (AB pH 1,0), para contagem de células caliciformes produtoras de mucinas ou sulfomucinas sulfatadas, e a coloração de Picro Sirius Red contra corados com hematoxilina de Mayer, para a mensuração da área ocupada pelas fibras colágenas dos tipos I e III.

2.3. Análise morfométrica

Foram realizadas com a objetiva de 10x. Cada análise foi realizada com 80 medidas de cada estrutura, distribuídas pela circunferência do duodeno de cada rato.

2.4. Contagem de células caliciformes (CCs) e linfócitos intra-epiteliais (LIEs)

Em microscopia óptica, na objetiva de 100x, a circunferência duodenal foi dividida em 4 quadrantes, a partir dos quais foram contadas 160 células por quadrante no epitélio da túnica mucosa, totalizando 2.560 células do epitélio intestinal de cada animal e dentre essas células foram contadas as CCs (colorações AB pH 1,0, AB pH 2,5 e PAS) e os LIEs (coloração de HE) presentes. Foi calculada a proporção de células caliciformes/100 e LIE/100 células epiteliais.

2.5. Análise de fibras colágenas totais, do tipo I e do tipo III

Utilizamos imagens de microscopia óptica na objetiva de 20x, associada a um polarizador de luz. Foram quantificadas as áreas ocupadas e coradas pelos colágenos dos tipos I e III, na tela submucosa em μm^2 com o auxílio do *software* Image Pro Plus®. As fibras colágenas tipo I e III foram quantificadas pela área polarizada em vermelho e verde, respectivamente.

2.6. Análise estatística

Utilizamos o *software* Bioestat 5.3®. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. Os dados apresentaram distribuição livre e, portanto, foram apresentados em mediana e percentis (Mediana; P25; P75). Foi realizado o teste de variância Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparar os grupos. O nível de significância é de 5%.

3. RESULTADOS

A infecção foi confirmada pela imunofluorescência indireta que detectou a presença de IgG Anti-*T. gondii* no sangue dos animais infectados. O resultado foi negativo para os animais não infectados.

A infecção provocou redução no número de LIEs nos animais do grupo GI-EP em relação ao GC-EP. Houve redução no número de células caliciformes produtoras de mucinas neutras no grupo GI-NT em relação ao GC. As células caliciformes produtoras de sulfomucinas dos animais do grupo GI-EP apresentaram um aumento quando comparadas ao GI-NT e ao GC-EP. Observou-se redução nas células caliciformes produtoras de mucinas ácidas não sulfatadas ou sialomucinas nos animais do grupo GC-EP quando comparados ao GC. Houve aumento na área ocupada pelo colágeno tipo I nos animais do grupo GI-EP em relação ao GC, GI-NT e GC-EP e no grupo GC-EP em relação a GC. Na área do colágeno tipo III foi observado redução no grupo GC-EP em relação ao GC, no entanto, ocorreu um aumento no grupo infectado GI-EP em relação ao GC-EP (Os resultados podem ser observados na tabela 1).

Tabela 1. Mediana \pm Percentis da proporção de linfócitos intra-epiteliais (LIEs), células caliciformes (CCs) e área dos colágenos tipo I e tipo III por μm^2 presentes na túnica mucosa do

duodeno de ratos do grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), grupo controle tratado com *Echinacea purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GI-EP).

Parâmetro	Técnica	GC	GI-NT	GC-EP	GI-EP
LIES	HE	12.83; 12.05; 13.81	11.58; 10.89; 12.44 ^b	14.26; 13.53; 14.52 ^{bc}	10.41; 9.23; 13.91 ^c
CCs	PAS	12.50; 11.96; 13.06 ^a	9.35; 8.95; 10.44 ^a	11.02; 9.97; 11.81	11.09; 10.71; 11.26
CCs	AB pH 1,0	9.82; 9.53; 10.74	9.64; 8.77; 9.83 ^b	9.59; 8.93; 9.95 ^c	10.76; 10.03; 11.20 ^{bc}
CCs	AB pH 2,5	10.21; 9.81; 10.74 ^a	9.59; 9.34; 9.77	8.86; 8.44; 9.11 ^a	9.27; 8.92; 9.77
Colágeno tipo I	Picosirius	8.22; 5.71; 11.34 ^a	8.78; 6.16; 12.42 ^b	10.63; 7.07; 14.09 ^{ac}	11.82; 9.77; 15.78 ^{abc}
Colágeno tipo III	Picosirius	10.28; 7.39; 14.26 ^a	10.09; 7.22; 12.71	6.98; 5.61; 8.56 ^{ac}	9.06; 7.14; 12.46 ^c

Valores seguidos por letras iguais na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Houve redução na túnica muscular dos animais do grupo GI-EP (90.5; 82.1; 96.2 μm) em relação ao GI-NT (119.2; 107.8; 130.3 μm). Não foi observado alterações significativas na tela submucosa e na parede intestinal total entre os grupos. Houve aumento na largura das criptas no grupo GI-EP (30.5; 28.3; 32.8 μm) em relação ao GC (20.9; 19.0; 23.3 μm), sem alterações na profundidade das criptas entre os grupos. Houve aumento na largura dos vilos no grupo GI-EP (105.9; 97.8; 107.6 μm) em relação GC (377.6; 343.2; 421.2 μm), GI-NT (78.8; 71.2; 81.3 μm) e GC-EP (85.1; 79.0; 95.3 μm), entretanto não houveram alterações na altura dos vilos (Figura 1).

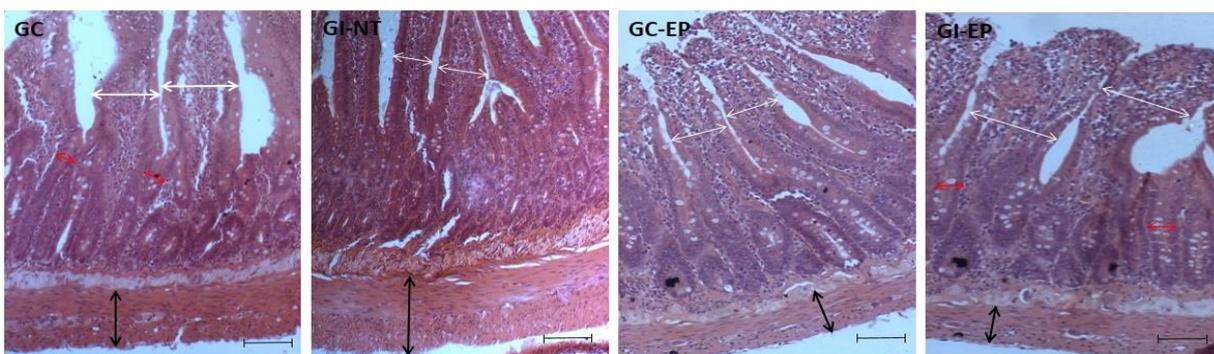


Figura 1. Fotomicrografia de cortes transversais do duodeno de ratos do grupo controle (GC), grupo infectado e não tratado (GI-NT), grupo controle tratado com *Echinacea purpurea* (GC-EP) e grupo infectado e tratado com *Echinacea purpurea* (GI-EP) corados por HE.

As setas pretas indicam a espessura da túnica muscular, demonstrando atrofia dessa túnica no GI-EP em relação ao GI-NT. As setas vermelhas indicam o aumento na largura das criptas no GI-EP em relação ao GC e as setas brancas, o aumento da largura dos vilos no GI-EP em relação à todos os outros grupos. Aumento de 100x, Barra: 50 μm .

4. DISCUSSÃO

Novos fármacos para o tratamento da toxoplasmose estão sendo estudados e um trabalho recente sugeriu que o extrato de *E. purpurea* tem ação protetoras na infecção por diferentes cepas de *T. gondii* (17).

Quando o parasita se dissemina pelo organismo precisa transpor a barreira intestinal causando danos no tecido (12). Os LIEs fazem parte da linha de defesa contra patógenos invasores por via oral, como o *T. gondii*, e sua principal função é proteger o epitélio intestinal contra o ataque de microrganismos patogênicos e agressões inflamatórias (20). O maior recrutamento de células imunes acontecem na fase aguda da infecção, foi demonstrado, anteriormente, que durante a infecção crônica pelo *T. gondii*, o número de LIE no duodeno, possivelmente, já havia se reestabelecido (21). Por outro lado, a redução em seu número nos animais infectados e tratados com a *E. purpurea* pode ser explicada devido a atividade anti-inflamatória da planta e sua capacidade de regular a defesa do hospedeiro contra a invasão de patógenos.

Células caliciformes têm um papel importante na manutenção e integridade do epitélio intestinal, por produzirem mucinas, peptídeos antibacterianos e outros peptídeos que auxiliam no combate a antígenos luminais, complementando a primeira linha de defesa contra lesões físicas e químicas (22). Neste estudo, houve redução na proporção de células caliciformes que produzem mucinas neutras nos animais infectados e tratados em relação aos não infectados. No entanto, as que secretam sulfomucinas (AB pH, 1,0) aumentaram no grupo infectado e tratado em relação aos demais grupos, indicando maior proteção intestinal contra agentes abrasivos e maior fluidez do muco, já que a densidade das mucinas ácidas é menor do que as mucinas neutras. As mudanças na composição do muco podem prevenir novas infecções por *T. gondii*, bem como a ocorrência de infecções secundárias (23).

Houve atrofia na túnica muscular nos animais do grupo infectado e tratado em relação ao não tratado. A camada muscular possui uma extensa rede de macrófagos e alguns leucócitos residentes, que podem causar um estado de hipercontratibilidade nas células musculares lisas, resultando em aumento do peristaltismo e expulsão de parasitas (24). Esse resultado corrobora com outros estudos que relataram atrofia muscular no duodeno após infecção por *T. gondii* (25). O aumento na largura dos vilos no grupo GI-EP pode indicar maior proliferação de células imunes na lâmina própria. Observamos também, um aumento na largura das criptas no grupo infectado e tratado. As criptas são responsáveis pela proliferação celular no epitélio intestinal e o aumento em sua largura pode ser pela necessidade de reequilibrar o epitélio que pode ter sido lesionado durante a invasão do parasita na parede intestinal (25).

A matriz extracelular corresponde a uma estrutura dinâmica que pode ser remodelada por condições fisiológicas ou patológicas (26). O colágeno tipo I é o mais abundante no intestino, seguido do colágeno tipo III, e o seu aumento nos animais tratados pode indicar que houve uma resposta inflamatória e reforço na estrutura da parede intestinal. As fibras que formam o colágeno tipo III são menores e mais jovens que as fibras do colágeno tipo I (27), e o seu aumento nos animais infectados e tratados com *E. purpurea* demonstra a capacidade da remodelação colágena estimulada pela ação do fitoterápico. Esses dados demonstram que a *E. purpurea* pode ser capaz de ocasionar regeneração ou cicatrização e estimular fibroblastos na produção de colágeno durante o tratamento da infecção por *T. gondii*.

5. CONCLUSÃO

A *Echinacea purpurea* apresentou atividade anti-inflamatória, demonstrada pela redução de linfócitos intra-epiteliais e pelas alterações na morfologia intestinal e atuou na remodelação do colágeno no duodeno de *Rattus norvegicus* submetidos a infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (cepa RH). Entretanto, mais estudos são necessários para compreender melhor a ação desse fitoterápico diante da infecção pelo *T. gondii*.

FINANCIADORES

CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Laboratório de Neurogastroenterologia da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. Gazzonis AL, Veronesi F, Di Cerbo AR, Zanzani SA, Molineri G, Moretta I, et al. *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy - prevalence and risk factors. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2015; 22(1):62-8.
2. Bolais PF, Vignoles P, Pereira PF, Keim R, Aroussi A, Ismail K, et al. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):88.
3. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. *Int J Parasitol*. 2009; 39(12):1385-94.
4. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1970 Dec; 157(11):1767-70.
5. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(10):634-40.
6. Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14:1089-1101.

7. Lindsay DS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology*. 2011; 138:1-3.
8. Ferezin RI, Vicentino-Vieira SL, Góis MB, Araújo EJdA, Melo GdANd, Garcia JL, et al. Different inoculum loads of *Toxoplasma gondii* induce reduction of myenteric neurons of the rat colon. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017; 26:47-53.
9. Pittman KJ, Knoll LJ. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015; 79(4):387-401.
10. Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364(1530):2749-61.
11. Spence JR, Lauf R, Shroyer NF. Vertebrate intestinal endoderm development. *Dev Dyn*. 2011; 240(3):501-20.
12. Harker KS, Ueno N, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol*. 2015; 37(3):141-9.
13. Watanabe PDS. Infecção aguda por *Toxoplasma gondii* causa mudanças no comportamento leucocitário em ratos. *Dep.de Análises Clínicas e Biomedicina*. 2016.
14. Wynn TA. Mechanism of fibrosis: therapeutic transplation for fibrotic disease, *Nat. Med*. 2013; 18:1028–1040.
15. Radke JB, Burrows JN, Goldberg DE, Sibley LD. Evaluation of Current and Emerging Antimalarial Medicines for Inhibition of *Toxoplasma gondii* Growth in Vitro. *ACS Infect Dis*. 2018; 4(8):1264-74.
16. Reynolds MG, Roos DS. A biochemical and genetic model for parasite resistance to antifolates. *Toxoplasma gondii* provides insights into pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 1998; 273(6):3461-9.
17. Gasparotto Junior A, Cosmo ML, Reis Mde P, Dos Santos PS, Goncalves DD, Gasparotto FM, et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 2016; 115(10):3999-4005.
18. Kumar KM, Ramaiah S. Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011; 2(4):304-14.
19. Gasparotto Junior A, Cosmo ML, Reis Mde P, Dos Santos PS, Goncalves DD, Gasparotto FM, et al. Effects of extracts from *Echinacea purpurea* (L) MOENCH on mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 2016; 115(10):3999-4005.
20. Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT, Kasper LH. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*, *J. Immunol*. 1998; 161:4902–4908.
21. Silva JM, Silva AV, Araújo EJA, Sant'Ana DMG. Efeitos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* sobre a parede intestinal de gatos domésticos. *Rev. Bras. Parasitol*. 2010; 19:55–61.
22. Kim YS, Samuel BH. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports*. 2010; 12(5):319-30.
23. Buzoni-Gatel D, Werts C. "Toxoplasma gondii and subversion of the immune system. *Trends in parasitology*. 2006; 22(10):448-52.
24. Bauer A.J. Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterol. Motil*. 2008; 20:81-90.
25. Trevizan AR, Vicentino-Vieira SL, Watanabe PDS, Góis MB, Melo GAN, Garcia JL, et. al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Exp. Parasitol*. 2016 Mar; 165:22-29.
26. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014; 15:786–801.
27. Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease, *Gastroenterology*. 1992; 102:1920–1929.

Palavras-chave: Toxoplasmose; intestino; tratamento.

Resumos simples

Bioquímica clínica

EFEITOS DO BOLDINE SOBRE A GLICONEOGÊNESE A PARTIR DE LACTATO EM FÍGADO DE RATOS EM PERFUSÃO

Lais Cristina de Lima Silva¹; Pâmela Alves Castilho²; Heloísa Vialle Pereira Maróstica³; Lívia Bracht⁴; Jurandir Fernando Comar⁵; Matheus Fernandes⁶; Emanuele Parreira de Lima⁷; Adelar Bracht⁸; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi⁹.

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado), Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

²Mestre, Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

³Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado), Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente, Profa. Dra, Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

⁵Docente, Prof. Dr., Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

⁶Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado), Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

⁷Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado), Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

⁸Docente, Prof. Dr., Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

⁹Docente, Profa. Dra., Departamento de Bioquímica- Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: Boldine é um alcalóide presente nas folhas do boldo chileno (*Peumusboldus*) com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anti-diabética e hepatoprotetora. **Objetivo:** Avaliar o efeito direto de uma curva de concentração de boldine sobre a gliconeogênese em perfusão de fígado. **Material e métodos:** Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UEM nº 6416011220. Foram utilizados ratos machos (Wistar) em jejum prévio (18 horas). Para a perfusão de fígado, os animais foram previamente anestesiados com xilazina+ cetamina (7 e 70mg/Kg) e o fígado posicionado em uma câmara de acrílico. O fígado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit bicarbonato (pH7,4), oxigenado a 36°C e o fluxo foi mantido constante. O substrato gliconogênico lactato (2mM) e boldine foi solubilizado neste tampão. O perfusado efluente foi coletado ao longo do tempo de perfusão e quantificado a produção de glicose e piruvato. O consumo de oxigênio foi monitorado continuamente por polarografia. **Resultados:** O lactato aumentou a produção de glicose, de piruvato e o consumo de oxigênio atingindo um estado estimulado. A infusão de boldine 200uM inibiu completamente a produção de glicose atingindo níveis basais. Avaliação de uma curva de concentração do alcalóide revela que esta inibição foi dependente de concentração. Este efeito foi amenizado após cessar a infusão do boldine, sendo parcialmente restaurado no final do período de perfusão. O consumo de oxigênio, entretanto, foi parcialmente inibido. Esta redução foi de 7,4% para a concentração de 200uM. Após cessar a infusão do alcalóide o consumo de oxigênio foi restaurado para níveis semelhantes ao período estimulado. Já, o boldine promoveu um claro aumento dependente de concentração na produção de piruvato. **Conclusão:** Considerando os efeitos acima apresentados, o boldine além de interferir com a fosforilação oxidativa mitocondrial muito provavelmente este alcalóide deve apresentar um efeito direto sobre as atividades de enzimas reguladoras da gliconeogênese hepática.

Palavras-chave: alcalóide; glicose; metabolismo hepático.

Área temática: Bioquímica clínica.

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTATIONA NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NO TECIDO CARDÍACO DE RATOS DIABÉTICOS

Erika Xavier dos Santos¹; Camila Caviquioli Sehaber²; Catchia Hermes Uliana³

¹Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus Três Lagoas (CPTL).

²Doutora em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Docente – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus Três Lagoas (CPTL).

Introdução: No diabetes mellitus (DM) complicações cardiovasculares são muito frequentes, chegando a ser a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada à doença. A hiperglicemia ativa vias metabólicas que levam principalmente a um aumento sistêmico da produção de espécies reativas de oxigênio que predominam sobre defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, estabelecendo assim, um consequente quadro de estresse oxidativo. Desse modo, avaliar os níveis de antioxidantes totais hidrossolúveis de um tecido, principalmente os de baixo peso molecular, é de extrema relevância, uma vez que agem como sequestradores de radicais livres, permitindo um balanço redox intracelular.

Objetivo: Avaliar a capacidade antioxidante total (CAT) no coração de ratos diabéticos suplementados com L-glutationa. **Material e métodos:** Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética (022/2014). Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus*, com 90 dias de idade, distribuídos em: animais normoglicêmicos (N), animais normoglicêmicos suplementados com L-glutationa (NT), animais diabéticos (D), animais diabéticos suplementados com L-glutationa (DT). Para a suplementação experimental dos ratos pertencentes aos grupos NT e DT a L-glutationa foi incorporada a ração padrão na concentração de 1%. Após 120 dias do período experimental, o coração foi coletado para a realização da determinação da CAT. A CAT foi avaliada por quimiluminescência por meio de uma reação contendo 20 μM de 2,2-azo-bis (2-amidinopropano) (ABAP) e 200 μM de luminol.

Resultados: Foi evidenciado um aumento significativo na CAT no grupo D em relação ao N ($p>0,05$). A suplementação com L-glutationa nos animais do grupo DT promoveu uma redução da CAT em relação ao grupo D ($p>0,05$). **Conclusão:** O DM causou um aumento na CAT nos animais diabéticos, possivelmente pelo sofrimento tecidual causado pelos radicais livres promovidos pelo DM, já a suplementação com L-glutationa promoveu proteção da perda da capacidade de antioxidantes de baixo peso molecular no tecido cardíaco nos animais do grupo DT.

Palavras-chave: Antioxidantes; Estresse Oxidativo; Suplementação.

Área temática: Bioquímica Clínica.

INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA POR BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS: VALORIZAÇÃO DO LAUDO LABORATORIAL DE HEMOCULTURA

Felipe Carnaval Chitolina¹; Alessandra Arruda Lemos¹; Giovanna Natsumi Eire¹; Jhonny Kendy Okuma ¹; Natália de Oliveira Bizetti Cano¹; Daniela Dambrosio Altafini^{2,3}; Nathalie Kira Tamura³; Josmar Mazucheli⁴; Maria Cristina Bronharo Tognim⁵.

¹Acadêmico(a) de Graduação em Medicina, Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade Estadual de Maringá.

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

³Hospital Universitário Regional de Maringá, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá.

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

Introdução: A infecção de corrente sanguínea (ICS) é causa frequente de morbimortalidade e elevação dos custos hospitalares. As bactérias Gram-negativas (BGN) estão entre os principais patógenos, sendo associadas a quadros de maior gravidade. O uso de antibióticos para os quais a bactérias apresenta resistência *in vitro* demonstrado no laudo de hemocultura é uma das principais causas de falha terapêutica e surgimento de bactérias multirresistentes. **Objetivos:** Verificar a adequabilidade da prescrição antimicrobiana após laudos de hemocultura positivos para ICS-GN de pacientes internados em um hospital escola. **Materiais e Métodos:** Estudo retrospectivo realizado no período de 2013 a 2018. Foram coletados dados dos laudos laboratoriais de hemoculturas positivas BGN e análise do prontuário médico anexado ao Sistema de Gestão da Assistência de Saúde do Sistema Único de Saúde – GSUS. Os dados foram organizados no Microsoft® Excel 2016. A terapia foi considerada adequada quando o antibacteriano utilizado empiricamente ou após a emissão do laudo (até 3 dias após) estava descrito como ativo *in vitro* (antibiograma) contra o BGN causador da ICS. Teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a relação entre “Óbito” e “Adequação”. Estudo aprovado pelo COPEP-UEM (CAAE 63610816.0.0000.0104). **Resultados:** No período analisado 239 hemoculturas foram positivas para BGN. *Escherichia coli* foi mais prevalente com 26,5% dos isolados seguido de *Klebsiella pneumoniae* 20,4%, *Pseudomonas aeruginosa* 14,5%, *Acinetobacter* spp. 7,2% e *Enterobacter cloacae* com 6,8%. Houve um elevado número de pacientes onde a terapêutica não seguiu o laudo da hemocultura e destes 40,7% foram a óbito. Para os pacientes onde a terapia foi adequada apenas 18,9% morreram. A análise estatística entre as variáveis “Óbito” e “Adequação” demonstrou associação entre as variáveis ($p=0.012$). **Conclusão:** O estudo relata a importância dos resultados do laudo final da hemocultura e antibiograma como ponto de referência para a antibioticoterapia, visando assim, uma melhor conduta e maior sucesso terapêutico nas ICS-BGN.

Palavras-chave: Antibiograma; Hemocultura; Bactérias Gram-negativas.

Área temática: Microbiologia.

Epidemiologia

O PERFIL SOCIOECONÔMICO DE ADOLESCENTES DE UMA ESCOLA PRIVADA NO MUNICÍPIO DE IVATUBA (PR)

Paulo Henrique Faria Pereira¹; Thiago César Frediani Sant'Ana²; Ana Carolina Alarcão³; Kesia Palma-Rigo⁴.

¹Acadêmico de Graduação em Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

²Coordenador de Pesquisa e Extensão, Faculdade Adventista Paranaense

³Coordenadora do curso de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

⁴Docente – Departamento de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

Introdução: O perfil socioeconômico pode ser um fator de grande influência na determinação do estilo de vida dos adolescentes. Os hábitos alimentares e as práticas esportivas são desenvolvidos, em certa parte, pela influência social do grupo ao qual o adolescente está inserido. A escola desempenha um papel fundamental no processo de difusão de hábitos saudáveis de vida. **Objetivo:** Identificar o perfil socioeconômico familiar de adolescentes de uma rede de ensino adventista em Ivatuba/PR. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal, realizado com 66 adolescentes entre 14 e 17 anos em uma rede privada de ensino. Realizou-se para análise dados parciais, do perfil socioeconômico do projeto: Aprovado pelo COPEP sob o número: 15201519.8.0000.0104. **Resultados:** Do grupo avaliado, 52,23% já trabalhou, porém apenas 2,98% ainda desenvolve atividade remunerada. No contexto educacional familiar, os alunos declararam que em 53,73% dos lares o pai possui Ensino Superior, enquanto 64,17% dos lares a mãe possui o Ensino Superior, em 25,37% das famílias, o pai possui o Ensino Médio e 28,35% a mãe possui o Ensino Médio. O perfil de renda demonstrou uma estratificação diversificada, sendo que 11,94% das famílias recebem até 2 salários mínimos; 5,97% recebem entre 2 e 3 salários; 31,34% recebem entre 3 e 5 salários; 25,37% recebem entre 5 e 10 salário; e 8,96% recebem mais que 10 salários mensais. **Conclusão:** A população estudada é composta predominantemente por adolescentes das classes B e C, com o predomínio de pais com escolarização superior e baixa frequência de estudantes desenvolvendo atividade remunerada, o que permite uma maior disponibilidade para o desenvolvimento das atividades escolares. A posterior, estes dados serão analisados correlacionando-se os hábitos alimentares e estilo de vida dos adolescentes.

Palavras-chave: Adolescente; perfil socioeconômico; educação.

Área temática: Epidemiology

ESTUDO RETROSPECTIVO DE CASOS DE TUBERCULOSE NO ESTADO DO PARANÁ: 20 ANOS DE NOTIFICAÇÃO

Andressa Lorena Ieque¹; Amanda Dias Leme²; Henderson Júnior Narciso³; Lincoln Luís Silva⁴; Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli^{5,6}; Rosilene Fressatti Cardoso^{5,6,7}; Vera Lucia Dias Siqueira^{5,6}; Regiane Bertin de Lima Scodro^{5,7}

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

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

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

⁶Docente – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁷Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: A tuberculose (TB) é uma doença causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* que na maioria dos casos atinge o pulmão (TB pulmonar), mas que também pode atingir vários outros órgãos (TB extrapulmonar). A TB encontra-se entre as 10 maiores causas de morte no mundo e, por esse motivo, dados epidemiológicos de seus casos tornam-se importante para a implantação de medidas públicas de saúde. **Objetivo:** conhecer a prevalência e o perfil dos casos das formas pulmonar e extrapulmonar da tuberculose no estado do Paraná, por meio de uma análise retrospectiva de 20 anos. **Material e métodos:** Os dados foram coletados pela 15^a Regional de Saúde do estado do Paraná, usando o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Inicialmente, os dados foram avaliados de acordo com a idade, sexo e desfecho da população. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética (4.422.975). **Resultados:** Durante os 20 anos analisados, foram notificados e confirmados 56.665 casos de TB no estado do Paraná, sendo que 82% destes referiam-se à forma pulmonar, 15% à extrapulmonar e 3% à associação das duas formas. Ao avaliar o número de casos por ano, não foi observada diferença relevante entre os 20 anos, demonstrando uma distribuição estável ($5 \pm 1\%$ casos/ano). De modo geral, a TB afetou mais paciente do sexo masculino (68%) e da faixa etária de 20 a 49 anos de idade (64%). Entre as formas extrapulmonares, as comuns foram a pleural, seguida pela ganglionar periférica e miliar. Com relação aos óbitos, foi observado mais mortes nos pacientes que apresentaram as duas formas associadas (19%), que nos que apresentavam apenas a forma pulmonar (9%) ou extrapulmonar (13%). **Conclusão:** Nos últimos 20 anos no estado do Paraná, a TB afetou mais homens da faixa etária adulta, sendo mais letal nas formas extrapulmonar ou extrapulmonar associada à pulmonar.

Palavras-chave: Tuberculose; Epidemiologia; Prevalência.

Financiador: Capes

Área temática: Epidemiology

OPENDATA: O AVANÇO DA VACINAÇÃO CONTRA A COVID-19 NO BRASIL

Deisiany Gomes Ferreira¹; Marina Cristina Gadêlha²; João Ricardo Vissoci³; Melyssa Negri⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Técnica laboratorial- Laboratório de Micologia Médica, Universidade Estadual de Maringá

³Docente – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A COVID-19, causada pelo coronavírus denominado SARS-CoV-2 apresenta alta transmissibilidade, mais de 200 milhões de casos e é responsável por uma síndrome respiratória aguda grave, variando entre casos assintomáticos até o óbito, até o presente com 4 milhões de mortes. No Brasil, o número de óbitos ultrapassou 550 mil e em Janeiro de 2021, iniciou-se a vacinação e paralelamente, o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) disponibiliza bancos de dados a fim de auxiliar a vigilância da vacinação no país. **Objetivo:** Avaliar a vacinação contra a COVID-19 no Brasil, por meio do acesso à base de dados públicos. **Material e métodos:** O presente estudo utilizou o banco de dados contendo os registros de vacinação contra COVID-19, disponível no site OpenDataSUS, na Rede Nacional de Dados em Saúde no período de 14/01/2021 a 03/08/2021. **Resultados:** Aproximadamente 107 milhões de pessoas receberam a primeira dose da vacina e 43 milhões de pessoas receberam a segunda dose, 20,1% da população brasileira foi totalmente vacinada. Foram vacinados indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária de no mínimo de 18 anos. São Paulo (59,48%), Rio Grande do Sul (55,35%) e Mato Grosso do Sul (51,78%) apresentam a maior porcentagem da população com no mínimo 1 dose, enquanto Amapá (35,33%), Pará (37,1%) e Roraima (38,44%) apresentam as menores porcentagens. **Conclusão:** O acompanhamento dos dados referente a vacinação da população, é importante não só para pesquisas epidemiológicas, mas também na gestão de políticas públicas, a fim de conter a pandemia da COVID-19. Com essas informações, novas estratégias podem ser formuladas para uma melhor imunização de todos no Brasil.

Palavras-chave: DATASUS; COVID-19; Vacinação.

Área temática: Epidemiologia

PERFIL DOS ATENDIMENTOS AMBULATORIAIS RELACIONADOS A DERMATOFITOSE NO PARANÁ ENTRE 2016 E 2020

Beatriz Vesco Diniz¹; Melyssa Negri²

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Dermatofitoses são doenças causadas por fungos filamentosos queratinofílicos, que afetam pelos, pele e unhas, causando prejuízos ao paciente; são, também, porta de entrada para infecções sistêmicas. Por não serem de notificação compulsória no Brasil, a epidemiologia destas micoses é fragmentada. O Sistema de Informações Ambulatoriais (SIA) possui potencial para estudos de doenças infecciosas, pois armazena dados de procedimentos ambulatoriais realizados via Sistema Único de Saúde (SUS) com abrangência nacional. **Objetivo:** Caracterizar o perfil dos atendimentos relacionados a dermatofitoses no Paraná entre 2016 e 2020, registrados no SIA/SUS. **Material e métodos:** Dados secundários, retrospectivos, foram baixados utilizando o software RStudio[®] versão 1.3.959, através do pacote microdatasus. Os registros foram filtrados pela Classificação Internacional de Doenças (CID) principal (B35.0-B35.9), estado e período. A Tabela SIGTAP (Tabela de Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS) foi utilizada para identificar os procedimentos realizados. Os dados foram tabulados e analisados no Excel[®]. **Resultados:** Foram registrados, no total, 1231 procedimentos no período avaliado. 61% referiam-se ao gênero feminino. A faixa etária mais frequente foi de 40 a 59 anos (34,69%), raça/cor branca foi predominante (86,19%). Curitiba teve o maior número de registros (65,64%). Unhas (49,39%), barba/couro cabeludo (11,62%) foram os locais com micoses mais frequentes. Os procedimentos predominantes foram exame anatomopatológico (37,04%) e consulta médica em atenção especializada (27,70%). Não foram encontrados procedimentos específicos para diagnóstico ou tratamento de micoses. **Conclusão:** As dermatofitoses no Paraná predominaram em pacientes femininos; brancos; entre 40 e 59 anos. O SIA/SUS apresenta dados relacionados a dermatofitoses, contudo, não são específicos acerca do diagnóstico ou tratamento, pois a Tabela SIGTAP apresenta poucos códigos para micoses. Isso impossibilita uma análise abrangente dos dados a fim de implementar políticas públicas adequadas para informar, prevenir, diagnosticar e tratar a população, evidenciando a negligência às micoses no sistema de saúde público brasileiro.

Palavras-chave: Dermatofitoses; Assistência ambulatorial; Epidemiologia.

Financiador (es): CAPES, CNPq

Área temática: Epidemiologia

TEGUMENTARY LEISHMANIASIS IN ANIMALS NATURALLY INFECTED IN BRAZIL: SYSTEMATIC REVIEW

Jéssica Pereira Florindo¹; Juliana Valentini²; Franchesco Niccolas Bertote Guarda¹; Maria Helena Marcanssoni¹; Maria Valdrinez Campana Lonardoni³; Jorge Juarez Vieira Teixeiras³; Eduardo Monguilhott Dalmarco^{2,4}; Iara Fabricia Kretzer Ana Maria Batista⁴; Izabel Galhardo Demarchi^{2,3}

¹Graduation on Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

²Department of Clinical Analysis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³Graduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

⁴Pharmacy Graduate Program (PPGFar), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Introduction: Leishmaniasis is a neglected tropical infectious disease that represents a significant challenge for global health. The epidemiological profile is complex since the variety of vectors, *Leishmania* species and hosts. **Objective:** This systematic review synthesizes the epidemiological profile of LT (Tegumentary Leishmaniasis) in animals naturally infected in Brazil. **Material and methods:** We attempted the “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis checklist” recommendations. For search and eligibility phases was used PECOS (acronym for Population; Exposure; Comparator; Outcomes; and Study design) strategy. Latin American and Caribbean Center for Health Sciences Information, Web of Science and U.S National Library of Medicine databases were used to recover potential articles. For eligibility, the blind and independent pairs reviewers selected the studies based on inclusion and exclusion criteria. Studies published in Portuguese, English and Spanish were recovered, and time was not limited. The article's data were extracted into standardized tables. An expert solved the discrepancies. **Results:** Forty-nine studies were included. The majority were carried out in the North and South of Brazil, and the majority in Paraná. Forty-seven studies reported at least one positive case of natural *Leishmania* infection. The animal most captured and with the highest number of positives was *Canis lupus familiaris* (dogs). *Leishmania (Viannia) braziliensis* was the species responsible for most of the infections detected. The most used diagnostic methods were, respectively, Indirect immunofluorescence, Indirect immunofluorescence and Polymerase Chain Reaction. Most of the cases occurred in humid tropical areas and with agriculture and remaining forest areas. The infection rate was over 10% in most studies. **Conclusion:** The results show the role of these animals in the cycle of disease transmission in humans and vectors. Since there is no valuable and accessible vaccine for LT, the formulation and intensification of public strategies are required to control the disease.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; disease reservoirs; Brazil.

Funding: This study will be financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel] – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

Thematic area: Epidemiology.

INTOXICAÇÃO EXÓGENA POR TRAZODONA: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS NOTIFICADOS EM UM CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES

Regivaldo Florentino Rodrigues¹; Bianca Detomasi Teixeira¹; Elidiane Andressa Rodrigues¹; Alan Fernando Nonato Silva¹; Marcia Regina Jupi Guedes²; Magda Lúcia Félix de Oliveira³; Simone Aparecida Galerani Mossini⁴

¹Acadêmica (o) de Pós-Graduação (Residência) em Residência Integrada Multiprofissional em Saúde na Atenção à Urgência e Emergência, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

²Enfermeira Supervisora, Centro de Controle de Intoxicações (CCI/HUM)

³Docente, Departamento de Enfermagem, Centro de Controle de Intoxicações (CCI/HUM)

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

Introdução: Fármacos neuropsicoativos representam parcela significativa das intoxicações medicamentosas no Brasil. No grupo dos antidepressivos, a intoxicação por trazodona caracteriza-se por quadros de sedação ou sonolência, ataxia, hipotensão, tonturas, bradicardia, perda de coordenação muscular, náuseas e/ou vômitos podendo ocorrer casos mais graves com coma e morte. **Objetivo:** Traçar perfil epidemiológico das intoxicações por Trazodona, notificadas em um centro de controle de intoxicações de um hospital de ensino. **Material e métodos:** Estudo transversal, retrospectivo das intoxicações por Trazodona como agente tóxico principal, notificadas ao Centro de Controle de Intoxicações (CCI/HUM) no período de março de 2019 a março de 2021. **Resultados:** Foram notificados 4122 casos, 0,53% (22) causados por Trazodona. A maioria, 81,82%, eram pacientes do sexo feminino, com predominância nas faixas etárias de 18-29 anos e 30-39 anos, ambas com 27,27%. Quanto à escolaridade, 27,3% tinham Ensino Superior Completo, e 22,73%, como profissão do lar. Quanto à circunstância da intoxicação, 100% dos casos foi por tentativa de suicídio (TS). Em 72,73% dos casos, o fármaco era de uso contínuo. Não foi notificado óbito. **Conclusão:** Intoxicação por exposição a medicamentos é um grave problema de saúde pública devido à falta de controle e medidas eficientes de prevenção, associadas ao fácil acesso da população a um número crescente de fármacos, muitos destes com alto grau de toxicidade. Os resultados evidenciaram uma população feminina, jovem, como vítimas das ocorrências, todas por TS, o que torna o cenário mais preocupante. Outro dado importante é que o agente tóxico é um fármaco de uso contínuo das vítimas, o que demonstra que, apesar da trazodona ser utilizada no tratamento de sintomas depressivos, o uso isoladamente não inibe a TS. Ações de prevenção e intervenção são a melhor forma de evitar o suicídio. O conhecimento da epidemiologia da TS por intoxicação exógena, apresenta-se como uma ferramenta importante.

Palavras-chave: Epidemiologia; Tentativa de suicídio; Antidepressivos.

Financiador (es): Ministério da Saúde

Área temática: Epidemiologia

ANÁLISE GEOESPACIAL DAS INTERNAÇÕES POR DOENÇAS DO APARELHO CIRCULATÓRIO POR REGIONAL DE SAÚDE NO BRASIL

Amanda de Carvalho Dutra²; Mariá Romano Bitencourt²; Marcos Rogério Bitencourt²; Rogério do Lago Franco²; Samile Bonfim de Oliveira¹; Fernanda Silva Oliveira¹; Michele Fernandes do Amaral Nascimento¹; Matheus Jacometo Coelho de Castilho¹; Marcia Rosângela Neves de Oliveira²; Maria Dalva de Barros Carvalho⁴; Luciano de Andrade^{3;4}

1Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em ciências da saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

2Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em ciências da saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR 3Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá/PR

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

Introdução: As doenças do aparelho circulatório são as que possuem maior número de hospitalizações no Brasil, e a detecção de locais e áreas vulneráveis são essenciais para o manejo epidemiológico adequado. **Objetivo:** Analisar a distribuição espacial das taxas de internações por doenças do capítulo IX do CID-10 - Doenças do aparelho circulatório nas regionais de saúde do Brasil, entre os períodos de 2016 a 2020 e sua associação com disparidades regionais. **Material e métodos:** Estudo ecológico, descritivo, transversal e analítico, utilizando análise espacial de dados por áreas. Trata-se de dados secundários obtidos no Sistema de Informações sobre internações hospitalares, sem filtro de idade (SIH / DATASUS) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Índices de Moran Global e Local foram aplicados para verificar a presença de autocorrelação espacial e modelagem por meio de regressão espacial (OLS e Spatial Lag - SAR), buscando identificar a associação entre indicadores socioeconômicos e as taxas de internações a partir do capítulo IX. **Resultados:** Identificamos uma autocorrelação espacial significativa para as taxas de internações ($I = 0,642$, $p < 0,001$), ou seja, apresentando clusters de regionais de saúde, com altas taxas de internações de doenças do aparelho circulatório. Na análise de regressão espacial, o modelo *spatial lag* foi o que melhor explicou 60% da variância das taxas de internações e foi positivamente associada às variáveis de renda per capita (coeficiente=0.075758, $p < 0,001$), quanto maior a renda maior as taxas de internações, para escolaridade á uma associação negativa (coeficiente=-0.988126, $p < 0,001$). **Conclusão:** Conclui-se que reconhecer áreas vulneráveis onde intervenções públicas podem ocorrer, facilita a alocação de recursos de saúde, aplicações em novas políticas públicas e prevenção de doenças. Além do mais, variáveis de acessibilidade e disponibilidade dos serviços de saúde devem ser investigadas.

Palavras-chave: Epidemiologia; Doenças circulatórias; Análise espacial.

Financiador (es): GETS-Grupo de Estudos e Tecnologias em Saúde

Área temática: Epidemiologia.

PERFIL DE SONO DE ADOLESCENTES DE UMA ESCOLA PARTICULAR DO NOROESTE DO PARANÁ

Thaís de Almeida Roela¹; Wanderson R Oliveira²; Ana Carolina Alarcão³; Kesia Palma-Rigo⁴; Carla Betânia Huf Ferraz Campos⁵

¹Acadêmica do Curso de Licenciatura em Pedagogia do Instituto Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

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

³Coordenadora do curso de psicologia da Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

⁴Professora na Faculdade Adventista Paranaense e professora colaboradora no programa de pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia na UEM, Maringá/PR

⁵Professora na Faculdade Adventista Paranaense e Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia na UEM, Maringá/PR

Introdução: O sono insuficiente é altamente prevalente, principalmente no período escolar e entre adolescentes, sendo que esse problema se agrava com a transição para o Ensino Médio. **Objetivo:** Analisar o perfil de sono dos adolescentes entre 14 e 18 anos de uma escola particular do noroeste do Paraná. **Material e métodos:** A proposta apresentada nesse projeto, são dados parciais do projeto: “Biomarcadores para a síndrome cardiometabólica e sua relação com as condições da vida perinatal”. Aprovado pelo Comitê de Ética (COPEP), sob número 15201519.8.0000.0104. O levantamento desta pesquisa foi realizado com 67 adolescentes entre 14 e 18 anos durante os meses de outubro e novembro de 2019 que estavam matriculados numa escola particular do noroeste do Paraná. Os alunos que aderiram ao projeto assinaram o Termo de Assentimento e seus responsáveis o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os adolescentes responderam o questionário validado sobre qualidade do sono. Devido aos dados ainda serem parciais, a análise de dados se limita apenas a descrição dos dados encontrados. **Resultados:** Foram analisados 67 alunos, sendo 33 do sexo feminino e 34 do sexo masculino. Desses alunos, 64% dormem após as 23 horas, sendo assim, 67% dos adolescentes entrevistados dormem 7 horas ou menos por noite. Quando interrogados sobre a qualidade do sono, 70% alega que é Boa ou Muito Boa, entretanto, 80% relataram dificuldade para dormir e todos relatam que apresentaram pelo menos um episódio no mês onde precisaram se manter acordados durante uma atividade social, 27% apresentam falta de entusiasmo em suas atividades habituais e 14% dos alunos fez uso de medicamento para auxiliar a dormir. **Conclusão:** Sendo assim, podemos observar que os adolescentes pesquisados apresentam dificuldade com o sono, dormindo menos do que o recomendado para a sua faixa etária e isso tem acarretado consequências em sua qualidade de vida.

Palavras-chave: Sono; Adolescência; Qualidade de vida.

Área temática: Epidemiologia

DEPRESSÃO EM ADOLESCENTES: ESTUDO GEOESPACIAL ENTRE A DISTÂNCIA DE ESCOLAS E ÁREAS PARA PRÁTICA ESPORTIVA DE UMA CIDADE DE PEQUENO PORTE

Ademilson José Bernardineli¹; Lincoln Luis Silva²; Claudia Regina Marchiori Antunes Araújo³; Raissa Bocchi Pedroso⁴

¹ Mestre em ciências da saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM) - Maringá, Paraná, Brasil.

² Doutorando do programa de pós graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná, Brasil.

³ Docente do curso de enfermagem do Instituto Adventista Paranaense (IAP) – Ivatuba, Paraná, Brasil.

⁴ Docente do programa de pós graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná, Brasil.

Introdução: Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que em todo mundo a depressão é uma das principais causas de incapacidade entre adolescentes. Contudo, praticar esportes promovem benefícios psicológicos à saúde. **Objetivo:** Realizar um estudo geoespacial relacionando a distância entre escolas e áreas de prática esportiva de uma cidade de pequeno porte (menos de 50.000 habitantes). **Material e métodos:** Análise geoespacial foi realizada por meio de banco de dados cartográficos fornecido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) da cidade de Marialva (31.959 habitantes) que conta com 5 escolas estaduais (E1 a E5) e 12 áreas para prática esportiva (A1 a A12). A construção de mapas temáticos foi realizada com base no georreferenciamento do município usando o software QGIS (versão 3.10.6). **Resultados:** O estudo revelou a menor distância de um caminho feito a pé entre a escola e o local de prática esportiva. Obtemos as distâncias entre E1 e A1 de 479,30m; E2 e A1 de 779,73m; E3 e A1 de 488,26m; E4 e A5 de 588,80m; E5 e A12 de 150m. A1 é o local mais próximo das escolas centrais, e a maioria destes locais são campos de futebol. Adolescentes ativos têm chances significativamente menores de apresentar sofrimento psicológico que os inativos e não praticar atividade física aumenta a probabilidade de desenvolver depressão ao longo da vida. Quanto aos espaços para prática esportiva, uma das barreiras para pouca atividade física entre mulheres se refere à ausência de local apropriado. **Conclusão:** Os espaços públicos urbanos de muitas destas localidades carecem de estrutura adequada para prática esportiva e não sendo acolhedoras principalmente para as adolescentes, deixam de contribuir satisfatoriamente com a saúde mental. Sendo assim, promover os espaços públicos a espaços mentalmente saudáveis por meio de políticas inclusivas e acolhedoras para adolescentes se faz urgentemente necessário.

Palavras-chave: Adolescente; Depressão; Cidade pequena.

Área temática: Epidemiologia

FREQUÊNCIA ALIMENTAR DE ADOLESCENTES DE UMA REDE DE ENSINO ADVENTISTA

Rafael Felipe Oliveira de Moraes Vieira¹; Iohana Krissis Silva Brandão¹; Wanderson Rocha Oliveira²; Ana Carolina Anarcão³; Kesia Palma-Rigo⁴.

¹Acadêmico(a) de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

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

³Coordenadora do curso de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

⁴Docente na Faculdade Adventista Paranaense e Docente Colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A prática alimentar inadequada na adolescência está associada com o aumento de predisposição ao desenvolvimento da obesidade e doenças crônicas, como diabetes, hipertensão arterial e dislipidemias. Neste sentido, a escola apresenta um papel fundamental no incentivo à prática alimentar saudável. **Objetivo:** Identificar a frequência de consumo de alimentos por adolescentes de uma rede de ensino adventista em Ivatuba/PR. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo transversal, realizado com 66 adolescentes entre 14 e 17 anos. Realizou-se para análise dados parciais do projeto: Biomarcadores para a síndrome cardiometabólica na adolescência e sua relação com as condições da vida perinatal. Aprovado pelo COPEP sob o número: 15201519.8.0000.0104. **Resultados:** O arroz branco ou integral é o alimento mais frequentemente consumido (85% ≥ 4 vezes por semana e 14% < 4 vezes por semana). Observou-se uma baixa frequência alimentar no consumo de carnes e peixes, sendo os valores de porcentagem maior no consumo em < 4 vezes por semana ou nunca/raramente. Em contrapartida, na categoria de "Leguminosas e ovos", há um alto consumo de Feijão (74% ≥ 4 vezes por semana e 17% < 4 vezes por semana), de Ovo (15% ≥ 4 vezes por semana e 68% < 4 vezes por semana) e de Queijos (48% ≥ 4 vezes por semana). Observou-se uma baixa porcentagem na frequência no consumo de alimentos processados e industrializados, sendo o Chocolate o mais consumido (26% ≥ 4 vezes por semana e 67% < 4 vezes por semana). **Conclusão:** Nesta população, a frequência alimentar contradiz outros estudos que sugerem o alto consumo de alimentos processados e industrializados na adolescência.

Palavras-chave: Adolescente; Alimentação; Comportamento Alimentar.

Área temática: Epidemiology

ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS PSICOEMOCIONAIS E USO DE MEDICAMENTOS POR ADOLESCENTES

Radyjia de Lima Pinto¹; Wanderson Oliveira²; Carla Betania Huf Ferraz Campos⁴; Ana Carolina Alarcão³; Kesia Palma-Rigo^{4,5}

¹ Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

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

³ Coordenadora do curso de Psicologia, Faculdade Adventista Paranaense

⁴ Docente – Faculdade Adventista Paranaense e Docente colaboradora no programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

⁵ Docente colaboradora no programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O uso racional de medicamentos tem sido importante para controle e prevenção de doenças, entretanto o consumo indevido, associado a fatores psicoemocionais, pode aumentar os riscos para o desenvolvimento de outras doenças. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, 29% dos óbitos ocorridos no Brasil são provocados por intoxicação medicamentosa. Observa-se um aumento no uso de medicamentos por adolescentes, além de manifestação precoce de doenças psicoemocionais. **Objetivo:** Realizar uma análise descritiva da ocorrência de doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) e uso crônico de medicamentos por adolescentes de uma escola particular em Ivatuba no Paraná; **Métodos:** Neste estudo observacional transversal em alunos do Instituto Adventista Paranaense, aprovado pelo COPEP com número 15201519.8.0000.0104, foram entrevistados 60 alunos com idade entre 14 e 17 anos. A coleta de dados ocorreu entre novembro e dezembro de 2019, utilizando uma parte do questionário PNAUM - Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos no Brasil. **Resultados:** 32/60 (53,3%) dos entrevistados apresentaram alguma doença relacionada ao SNC ou doenças crônicas, 28/32 (87,5%) relataram apresentar sintomas dessas doenças, 22/60 (36,6%) dos participantes tomam algum medicamento, destes, 7/22 (31,8%) utilizam um segundo medicamento, em sua maioria psicotrópicos. Sendo que 11/22 (50%) usam medicamento para controle da ansiedade e 4/22 (18,1%) para TDAH. Dos alunos que tomavam medicamentos 13/22 (59%) apresentaram efeitos colaterais. No entanto, 14/22 (63,6%) relataram melhora nos sintomas, 6/22 (27,2%) melhora no desempenho acadêmico e 3/22 (13,6%) não observaram melhora. **Conclusão:** Este estudo aponta para uma manifestação precoce de doenças psicoemocionais em mais da metade da população estudada, além do uso de medicamentos em mais de 30% dos alunos. A manifestação precoce de doenças psicoemocionais, associada ao uso de medicamentos psicotrópicos pode apontar para um maior risco de ocorrência de doenças psicossomáticas a longo prazo.

Palavras-chave: Adolescente; Psicotrópicos; Transtornos mentais.

Área temática: Epidemiologia.

NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA EM ADOLESCENTES

Larissa Millnitz¹; Wanderson Rocha Oliveira²; Ana Carolina Alarão³; Kesia Palma-Rigo⁴

¹Acadêmica de Graduação em Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense.

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

³Coordenadora do Curso de Psicologia na Faculdade Adventista Paranaense.

⁴Docente na Faculdade Adventista Paranaense e no Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia.

Introdução: Estudos apontam que a adolescência é uma relevante fase do desenvolvimento para a prevenção de doenças que se manifestam na vida adulta. Sabe-se que a realização de exercícios físicos de forma periódica é uma ferramenta importante para a prevenção de doenças. O objetivo deste estudo é avaliar o grau de atividade física em adolescentes. **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo COPEP com 15201519.8.0000.0104. Neste estudo observacional transversal 65 alunos com idade entre 14 e 17 anos de uma escola particular em Ivatuba foram entrevistados. As entrevistas foram realizadas entre novembro e dezembro de 2019 utilizando um questionário de avaliação da atividade física validado para adolescentes. **Resultados:** 100% dos participantes desse estudo praticam um esporte, sendo que vôlei aparece como o mais praticado, 35% do grupo. 56% das meninas praticam esporte por mais de 1 hora por dia, 44% praticam 1 hora ou menos. Em relação aos meninos, 36% praticam esporte por mais de 1 hora e 64% praticam 1 hora por dia ou menos. Quanto a frequência semanal, verificou-se que os meninos praticam exercícios com uma frequência maior que as meninas (64% e 37,5%, respectivamente). 84% das meninas e 73% dos meninos praticam a atividade a mais de seis meses. **Conclusão:** Uma análise parcial dos dados aponta que na população estudada, a porcentagem de meninos e meninas que realizam atividade física é similar, contudo eles apresentam preferências por esportes diferentes e os meninos realizam exercício físico com maior frequência.

Palavras-chave: Adolescente; Exercício físico.

Área temática: Epidemiology

TAXA DE INTERNAMENTO POR TRANSTORNOS NEURÓTICOS, RELACIONADOS COM STRESS E SOMATOFORMES ANTES E DURANTE A PANDEMIA DO COVID-19

Claudia Regina Marchiori Antunes Araújo¹; Léo Sá de Souza²; Ademilson José Bernardineli³

¹Docente do curso de enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

²Academico do curso de enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense

³Docente do Centro Universitário Ingá - UNINGÁ

Introdução: O Brasil apresenta o maior índice de ansiedade no mundo e o quinto em depressão, e a pandemia agravou ainda mais esses indicadores. **Objetivo:** avaliar a taxa de internamento por transtornos neuróticos, relacionados com stress e somatoformes no Brasil, antes e durante o período da pandemia por COVID-19. **Material e Métodos:** Os dados foram obtidos do Sistema de Internação Hospitalar do SUS do DATASUS. Foram selecionadas todas as internações cujo diagnóstico principal está contido nas categorias F40 a F48 da lista de morbidade da Classificação Internacional de Doenças. Foi calculado a taxa de incidência por 100 mil habitantes para cada ano separadamente (2019 e 2020) por Estados do Brasil, macrorregiões, por sexo e faixa etária. **Resultados:** 16 estados e o Distrito Federal apresentaram queda nas taxas de internamento em 2020, e 9 estados apresentaram aumento. A região Centro-Oeste foi a que apresentou a maior taxa, sendo também a única que mostrou aumento (2,60 em 2020 para 2,69 em 2021). As regiões Norte e Nordeste apresentaram as menores taxas (0,36 em 2020 e 0,24 em 2021). A análise por sexo evidenciou que em todas as regiões e nos dois anos analisados, a incidência no sexo feminino foi superior ao sexo masculino. A faixa etária de 20 a 39 anos e 40 a 59 anos foi a que mostrou a maior taxa de internamento nos dois anos analisados, e a faixa etária dos 80 anos e mais foi a única que apresentou um aumento dos internamentos. **Conclusão:** A diminuição nas taxas de internamentos identificadas na maioria das regiões e estados pode estar refletindo as restrições de consultas e internamentos impostas. O maior impacto na saúde mental da população feminina e em idosos com mais de 80 anos revela a vulnerabilidade desta população no que se refere às medidas de isolamento social.

Palavras-chave: Assistência à saúde mental; Pandemia; Covid-19.

Área temática: Epidemiologia

Farmacognosia

EFEITO DA LUZ UV-C NA PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES EM CULTURAS *in vitro* DE *Cereus hildmannianus* (K.) Schum.

Éverton da Silva Santos¹; Aline Savam², José Rivaldo dos Santos Filho¹; Thaila Fernanda Oliveira da Silva¹; Arildo José Braz de Oliveira³; Regina Aparecida Correia Gonçalves³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Labipros, departamento de Farmácia.

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Labipros, departamento de Farmácia.

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Labipros, departamento de Farmácia.

Introdução: *Cereus hildmannianus* (Cactaceae) é uma espécie de cacto que apresenta aplicações farmacológicas e industriais. Um dos principais grupos de metabólitos secundários relatados na espécie são os alcalóides, exibindo um amplo espectro de atividades biológicas. A biotecnologia de plantas medicinais é uma ferramenta utilizada visando a produção sustentável de substâncias bioativas, aliadas a técnicas elicitoras, como também na preservação das espécies evitando coletas indiscriminadas na natureza.

Objetivo: Utilizar elicitação com luz UV-C em culturas de calos de *C. hildmannianus* visando o aumento na bioprodução de metabólito secundário de interesse. **Material e métodos:** As culturas de calos *C. hildmannianus* (triplicata) foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS), e elicitados com diferentes tempos de exposição à luz UV-C de 10, 20, 40 e 60 min a uma distância de 90 cm (culturas controle sem exposição), após foram incubadas por 45 dias a 32 °C e fotoperíodo de 16 h ($15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As extrações foram realizadas utilizando aparato de Soxhlet (EtOH 70%; 6 h), obtendo-se os extratos brutos etanólicos (EEUV₁₀; EEUV₂₀; EEUV₄₀; EEUV₆₀, e EEC) e a quantificação dos alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD). Os resultados foram expressos em equivalentes de tiramina ($\mu\text{g ETim mg}^{-1} \text{PS}$); e tirosina ($\mu\text{g ETir mg}^{-1} \text{PS}$). **Resultados:** Os resultados obtidos demonstraram uma maior bioprodução do alcalóide tiramina quando as culturas de calos foram expostas a 20 min de exposição à luz UV-C ($1,39 \pm 0,31 \mu\text{g ETim mg}^{-1} \text{PS}$) comparados às culturas controle ($p < 0,05$).

Conclusão: À luz UV-C se mostrou uma ferramenta biotecnológica alternativa, apresentando baixo custo, de fácil acesso e sustentável, com um aumento da bioprodução de alcalóides na espécie, no qual os mesmos já demonstraram atividades biológicas.

Palavras-chave: Cactos; Elicitores; Fitoquímicos.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Área temática: Pharmacognosy.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO APOLAR DAS FLORES DE *Tabernaemontana catharinensis*

José Rivaldo dos Santos Filho¹; Camila Ferreira Amaral³; Éverton da Silva Santos¹; Blendon-lee Silva Martins²; Regina Aparecida Correia Gonçalves⁴, Arildo José Braz de Oliveira⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A utilização de plantas medicinais está presente na humanidade desde os primórdios, não apenas pelo seu efeito alimentar, mas também por suas ações de cura e terapia, como a *Tabernaemontana catharinensis* (*T. catharinensis*), pertencente à família Apocynaceae. **Objetivo:** Avaliar o potencial antioxidante das frações apolares obtidas por maceração das flores de *T. catharinensis*. **Material e métodos:** As frações apolares foram obtidas pelo método de maceração a frio, utilizando como solventes extratores hexano (fração hexânica; FH) e clorofórmio (fração clorofórmica; FC), mantendo uma proporção de 1:25 (p/v) de droga vegetal:solvente extrator. O período de extração foi de 48 h, seguido por uma re-extração por 24 h, para cada solvente, com proteção da luz. As frações foram filtradas (filtração simples), rotaevaporadas (35-40 °C), liofilizadas e submetidas a análise do potencial antioxidante pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol Trolox mg}^{-1}$ peso seco (PS), e apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). **Resultados:** Os resultados mostraram que a FC apresentou atividades antioxidantes médias superiores em relação a FH para os métodos DPPH e ABTS, sendo $514,7 \pm 0,9$ e $156,8 \pm 2,3$, para FC, e $339,8 \pm 3,2$ e $99,7 \pm 1,8$, para a FH, respectivamente. Já para o método FRAP, a FH apresentou melhor atividade antioxidante média em relação a FC, sendo $271,1 \pm 1,1$, para a FH, e $206,7 \pm 4,8$, para a FC. **Conclusão:** Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que ambas as frações apolares obtidas a partir das flores de *T. catharinensis* apresentam um potencial antioxidante satisfatório e promissor, possibilitando a avaliação de atividades biológicas correlacionadas a esta atividade.

Palavras-chave: *Tabernaemontana catharinensis*; Antioxidante; Flores.

Financiador (es): CNPq; Capes; Uem.

Área temática: Farmacognosia.

CAPACIDADE DE QUELAÇÃO DOS ÍONS FERRO A PARTIR DO EXTRATO OBTIDO DE RESÍDUO DE CAULE DE *Stevia rebaudiana*

Thaila Fernanda Oliveira da Silva¹; Susana Tavares Cotrim Ribeiro¹; Everton da Silva Santos¹; Beatriz de Souza Boszczovski²; Arildo José Braz de Oliveira³; Regina Aparecida Correia Gonçalves³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Graduação – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: *Stevia rebaudiana* é uma planta de interesse comercial devido a presença de esteviosídeo em suas folhas. A investigação fitoquímica e atividades biológicas relacionadas à utilização dos caules desta planta, que são descartados pela indústria, representam alternativas para obtenção de compostos ativos. Os íons ferro são essenciais na fisiologia humana, no entanto, em quantidades elevadas pode causar danos fisiológicos. Substâncias quelantes de íons ferro também são relevantes em questões ambientais, atuando como bioremediadores. **Objetivo:** Avaliar a capacidade de quelação de íons ferro com a fração precipitada (CS-P) obtido do extrato aquoso do resíduo caule de *S. rebaudiana*. **Material e métodos:** O método utilizado para testar a capacidade de quelação dos íons ferro com CS-P foi adaptado de Rattanakit et al., (2019). O sulfato ferroso (Fe^{2+}) foi adicionado a diferentes concentrações da amostra (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg mL⁻¹). Logo após, foi adicionado tampão acetato e ácido gálico e realizada a leitura das absorbâncias a 570 nm em espectrofotômetro. O mesmo teste foi realizado para o cloreto férrico (Fe^{3+}). Os ensaios ocorreram em triplicata para ambas as soluções de íons ferro. O EDTA foi utilizado como padrão. O resultado foi determinado em porcentagem. **Resultados:** Para ambos os testes, tanto o FeSO_4 como o FeCl_3 apresentaram um aumento da porcentagem de sequestro de ferro em relação ao aumento da concentração de CS-P. Os maiores resultados de quelação dos íons de ferro ocorreram nas concentrações de 4,0; 8,0 e 16 mg.mL⁻¹, sendo de 30,81%; 42,81% e 43,42% para o FeSO_4 e de 29,95%; 38,29% e 41,06% para o FeCl_3 . **Conclusão:** A amostra CS-P foi capaz de quelar e estabilizar os dois estados de oxidação do ferro. Dessa forma, a investigação de compostos que diminuem o efeito nocivo do excesso de ferro é importante para a área da saúde e ambiental.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*; capacidade quelante; resíduo industrial.

Financiador (es): UEM, CAPES, CNPq e Stevia Soul.

Área temática: Farmacognosia.

Farmacologia

EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DE TRÊS CUMARINAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS EM UM MODELO DE PLEURISIA EM RATOS

Luana Eloisa Leal¹; Bruna Lopes Correia²; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi³; Jurandir Fernando Comar³; Ciomar Aparecida Bersani-Amado⁴; Lívia Bracht^{3,4}

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: As cumarinas são uma classe de compostos fenólicos e dentre elas a 1,2-benzopirona, a umbeliferona e a esculetina, possuem efeitos anti-inflamatórios comprovados por estudos *in vivo*. Todavia, não existem trabalhos que tenham investigado os efeitos de cumarinas sobre a inflamação pulmonar ou pleural. **Objetivo:** Avaliar o efeito anti-inflamatório das cumarinas 1,2-benzopirona, umbeliferona e esculetina em um modelo de inflamação pleural aguda em ratos. **Material e métodos:** A pleurisia foi induzida em ratos Wistar, pela injeção de uma suspensão de carragenina na cavidade intra-pleural (CEUA/UEM nº. 3183190121). As cumarinas 1,2-benzopirona (20; 50; 100 e 200 mg/Kg), umbeliferona (200; 400 mg/Kg) e esculetina (400 mg/Kg) foram administradas por gavagem oral em dose única, uma hora antes da indução da pleurisia. Após 4 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta do exsudato inflamatório intra-pleural. O número de leucócitos totais foi determinado em câmara de Neubauer e para a contagem de mononucleares e polimorfonucleares foi utilizada a coloração de May-Grünwald-Giemsa. **Resultados:** O tratamento com 1,2-benzopirona reduziu de maneira dose-dependente o volume do exsudato inflamatório. A redução foi de 84%, 66% e 27% nas doses de 200, 100 e 50 mg/Kg, respectivamente. Adicionalmente, esta substância provocou uma redução expressiva e dose-dependente do recrutamento de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) para a cavidade pleural, sendo de 68% para polimorfonucleares e de 65% para mononucleares na dose de 200 mg/Kg. Os tratamentos com umbeliferona e esculetina na dose de 200 mg/Kg não foram capazes de reduzir o volume do exsudato inflamatório ou o recrutamento de leucócitos. Todavia, na dose de 400 mg/Kg, a umbeliferona reduziu significativamente o número de leucócitos presentes na cavidade pleural em 27%. **Conclusão:** Das três cumarinas avaliadas, a 1,2-benzopirona foi mais eficaz em reduzir a inflamação pleural nos animais.

Palavras-chave: 1,2-benzopirona; Esculetina; Umbeliferona.

Financiador (es): CAPES - CNPq

Área temática: Farmacologia.

PLANEJAMENTO MOLECULAR DE AZA-HETEROCICLOS ANÁLOGOS DO ANTIVIRAL X77 COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DO SARS-CoV-2

Arthur Antunes Ferrarezi¹; Érika Seki Kioshima²; Bernard Maigret³; Arildo José Braz de Oliveira⁴; Fernanda Andreia Rosa⁵; Regina Aparecida Correia Gonçalves⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Pesquisador – Laboratório Lorrain de Pesquisa em Informática e suas Aplicações, Universidade de Lorraine, Nancy/FR

⁴Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A Covid-19, causada pelo SARS-CoV-2, caracteriza-se por sintomas respiratórios moderados a graves. No Brasil, foram confirmados mais de 20 milhões de casos e aproximadamente 566 mil óbitos. Atualmente não existem fármacos específicos para combatê-la, justificando a urgência pela busca de moléculas originais que consigam bloquear a replicação do SARS-CoV-2. Nesse contexto, o uso de ferramentas computacionais, aliadas ao conhecimento farmacológico dos aza-heterociclos, poderá contribuir com a descoberta de agentes antivirais específicos e promissores.

Objetivo: Planejamento de análogos pirazolínicos do antiviral X77 para buscar novos inibidores da protease Principal (M^{pro}) do SARS-CoV-2, por meio de ancoragem molecular. **Material e métodos:** Utilizou-se a estrutura cristalográfica da M^{pro} (código 6w63) obtida do *Protein Data Bank*, e o software GOLD (*Cambridge Crystallographic Data Centre*), para avaliar o modo de ligação dos análogos. O planejamento procedeu-se pela análise do X77 e identificação dos elementos estruturais envolvidos nas interações com o sítio catalítico da enzima. Após isso, foram desenhadas estruturas contendo o fragmento diarilpirazol, as quais foram ancoradas no sítio ativo da M^{pro} e avaliadas quanto ao seu modo de ligação. **Resultados:** 720 análogos foram propostos e classificados de acordo com os valores de pontuação do GOLD. Destes, 40 análogos com pontuação superior à do X77 foram analisados. Aqueles com maior afinidade bloquearam a díade catalítica (His41 e Cys145) e a orientação espacial foi dependente do volume dos fragmentos moleculares presentes no esqueleto diarilpirazol. Anéis aromáticos *para*-substituídos, cicloalcanos e heterociclos contendo átomos de nitrogênio doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, mostraram contribuir positivamente para a afinidade pela M^{pro} . **Conclusão:** Os resultados de Ancoragem Molecular permitiram identificar 40 análogos pirazolínicos de X77 promissores para inibição da M^{pro} . Estudos posteriores de Dinâmica Molecular e inibição *in vitro* permitirão a otimização dos mesmos e contribuirão para a pesquisa de novos fármacos antivirais específicos para o SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; M^{pro} ; Pirazol.

Financiador (es): CAPES, CNPq, Fundação Araucária

Área temática: Farmacologia

Fisiologia

MALNUTRITION DURING ADOLESCENCE INDUCES CHANGES IN CARDIOVASCULAR SYSTEM IN RATS

Anna Rebeka Oliveira Ferreira¹; Maria Natalia Chimirri Peres² Maiara Vanusa Guedes Ribeiro³; Mariane Carneiro da Silva⁴, Gabriel Kian Guimarães Lopes⁵, Silvano Piovani⁶, Paulo Cezar Freitas Matias⁷; James Andrew Armitage⁸; Kesia Palma-Rigo^{9,10}

^{1,2}Graduate Student (Doctorate), Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá, PR

³Graduate Student (Masters), Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá, PR

⁴Graduate Student (Masters), Cell Biology, State University of Maringá, Maringá, PR

⁵Graduate Student in Biochemistry, State University of Maringá, Maringá, PR

⁶Graduate Student (Post-Doctoral), Cell Biology, State University of Maringá, Maringá, PR

⁷Teacher, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, State University of Maringá, Maringá, PR

⁸Teacher, School of Medicine, Deakin University, Australia

⁹Teacher Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

¹⁰Teacher, Adventist Institute of Parana, Ivatuba, PR

Introduction: Exposure to low protein diet in perinatal life induces hypertension related to cardiovascular autonomic dysfunction in adulthood. However, it is not known if this insult during adolescence affect the cardiovascular system. **Objective:** This study aims to evaluate whether low protein diet during adolescence induces hypertension related to autonomic dysfunction in adult male rats. **Methods:** The research ethics committee approved the study under CEUA nº 4833210519. Thirty-day-old Wistar rats were fed a low protein diet (4% protein as casein) for 30 days and subsequently fed a 20.5% normal protein diet for a 60-day recovery period (LP). Control animals (NP) were fed a 20.5% protein diet throughout life. At 120 days of age, direct measurements of arterial pressure were recorded from conscious animals. Statistically significant differences were evaluated by T-Student test. **Results:** LP rats were hypophagic (-13%; $p < 0,021$) until 60 days. LP animals has smaller body weight (-10%; $p < 0,0003$) and body length (-4%; $p < 0,015$), hyperphagia (+21%; $p < 0,001$), hyperglycemia (+13%; $p < 0,0081$) but the lipid profile and visceral fat deposits were similar to NP. Mean arterial pressure (MBP) was increase in LP (20%, $p < 0,002$) but heart rate was unchanged. In the spectral analysis, the LP rats showed a greater amplitude in the low frequency zone (LF) of MBP (+41%; $p < 0,035$). In the pulse interval, the LP group showed an increase in LF, LF/HF ratio and total variability (+73%, 45% and 37%, respectively; $p < 0,014$, $p < 0,048$ and $p < 0,011$) but the high frequency zone (HF) was similar to NP. The LF-MBP decrease and depressor response to the ganglionic blocker, hexamethonium (30 mg/kg, iv), was greater in the LP group (57% and 36%; $p < 0,032$ and $p < 0,006$, respectively). **Conclusions:** Low protein diet during adolescence leads to hypertension later in life, sustained by a greater sympathetic activity.

Keywords: Malnutrition; High blood pressure; Autonomic nervous system.

Support: CNPQ and Capes.

Subject area: Physiology

RATOS ADOLESCENTES TRATADOS COM RITALINA® SÃO MAIS RESPONSIVOS À INSULINA NA IDADE ADULTA

Maria Natália Chimirri Peres¹, Anna Rebeka Ferreira Oliveira¹, Maiara Vanusa Guedes Ribeiro², Silvano Piovan³, Lucas Paulo Jacinto Saavedra⁴, Milene Aparecida Bobato de Melo⁴, Gabriel Kian Guimarães Lopes⁵, Paulo Cesar de Freitas Mathias⁶, Késia Palma-Rigo⁷⁻⁸

¹ Pós-graduanda (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Universidade Estadual de Maringá

² Pós-Graduando (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Universidade Estadual de Maringá

³ Pós Graduando (Pós-Doutorado) em Biologia Celular, Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Universidade Estadual de Maringá

⁴ Pós-graduanda (Doutorado) em Biologia Celular, Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Universidade Estadual de Maringá

⁵ Aluno de Graduação em Bioquímica, Laboratório de Biologia Celular da Secreção, Universidade Estadual de Maringá

⁶ Professor - Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá

⁷ Professor - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

⁸ Professora - Faculdade de Enfermagem, Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba (PR) Brasil

Introdução: A prevalência do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) aumentou nos últimos anos na infância e na adolescência. Assim, o tratamento mais utilizado é a administração de Metilfenidato, princípio ativo do medicamento Ritalina®. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento com Ritalina® na adolescência sobre a composição da gordura corporal e o metabolismo da glicose de ratos adultos. **Material e métodos:** Ratos Wistar machos receberam Ritalina® na dose de 5 mg / kg de peso corporal de 30 a 60 dias de vida (grupo Rit), os animais controle receberam solução salina 0,9% no mesmo volume (grupo Sal). CEUA N° 5343210520. **Resultados:** Aos 60 e 120 dias não houve aumento do peso corporal dos animais Rit em relação ao grupo Sal ($p > 0,4$). Aos 60 dias os animais Rit tiveram triglicerídeos 28,33% aumentados em relação aos animais Sal ($p < 0,002$), enquanto aos 120 dias em relação a este mesmo parâmetro o grupo Rit foi 25,2% menor em relação ao grupo Sal ($p < 0,02$). Quanto às gorduras corporais, aos 60 dias, houve uma diminuição de 26,5% e 22,8% nas gorduras perigonadal e mesentérica, respectivamente, no grupo Rit ($p < 0,3$ e $p < 0,2$), em relação ao mesmo parâmetro, aos 120 dias, houve aumento de 28,5% na gordura mesentérica dos animais Rit ($p < 0,2$). Houve aumento de 17,8% no grupo Rit, aos 60 dias ($p < 0,02$) em relação ao teste de tolerância à insulina (ITT), no mesmo parâmetro, aos 120 dias, os animais Rit tiveram um aumento de 33,3% em relação ao grupo Sal ($p < 0,008$). **Conclusão:** O tratamento com Ritalina® na adolescência gera um aumento das gorduras corporais durante o tratamento, porém, houve aumento da tolerância à insulina tanto durante o tratamento quanto na vida adulta levando a crer que estes animais estão produzindo mais insulina.

Palavras-chave: Ritalina®; Adolescência; Programação metabólica.

Área temática: Fisiologia

FEMALE WISTAR RATS SUBMITTED TO PROTEIN-CALORIC RESTRICTION DURING THE LACTATIONAL PERIOD PRESENT ALTERATIONS IN BIOMETRIC PARAMETERS WITHOUT ALTERING THE GLUCOSE METABOLISM

Anna Carolina Huppel de Souza¹; Sarah Rickli de Oliveira², Camila Cristina Ianoni Matusso³, Rodrigo Vargas³, Lucas Paulo Jacinto Saavedra³, Scarlett Rodrigues Raposo⁴, Mariane Carneiro da Silva⁴, Paulo Cezar de Freitas Mathias⁵, Isabela Peixoto Martins⁶.

¹Undergraduate Student in Biomedicine, State University of Maringá

²Undergraduate Student in Biological Sciences, State University of Maringá

³Graduate Student (Doctorate) in Biological Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

⁴Graduate Graduate (Masters) in Biological Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

⁵Professor - Department of Biotechnology, Cell Biology and Genetics (DBC), State University of Maringá

⁶Professor – Department of Morphological Sciences (DCM), State University of Maringá

Introduction: Perinatal malnutrition is a public health problem that brings consequences for the physiological system and economy due to the development of chronic metabolic diseases in adulthood. The experimental study of nutritional insults such as protein restriction during lactation, a sensitive period of maturation, are essential to understand the metabolic programming and the DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) concept. Currently, findings demonstrate a lean phenotype associated with glucose metabolism imbalance in adult male offspring protein restricted at lactation. **Objective:** We hypothesize that maternal protein restriction during lactation potentially causes a thin phenotype associated with metabolic dysfunctions in adult female offspring. We evaluated the metabolic effects of a low maternal protein diet during lactation in offspring of adult females. **Methods:** At birth, mothers were divided into two groups: NP, diet with normal protein during lactation (n = 3 liters, 20.5% protein) and LP, diet with low protein content during the first two weeks of lactation (n = 3 liters, 4% protein) in the Sectorial Bioterium of the Secretion Cell Biology Laboratory, ethical approval nº 8625310521. At 90 days of age, the offspring were submitted to intravenous glucose tolerance test (ivGTT), intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) and euthanasia. **Results:** We observed a lower body weight (22%, $p < 0.0001$) and increased relative food intake (19%, $p < 0.0005$) in the LP group. Retroperitoneal, mesenteric, periovarian, and periuterine fat pads decreased in LP animals by approximately 26% ($p < 0.0001$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, respectively). However, there was no difference between groups in brown adipose tissue. Interestingly, the LP group demonstrated normal ivGTT glucose levels and no difference in insulin sensitivity, as demonstrated by Kitt. **Conclusion:** Nutritional insult during lactation brought significant biometric changes, mainly a lean phenotype, for the offspring of adult females, without alterations in the parameters of glucose metabolism, validating a sexual dimorphism.

Palavras-chave: Lactation; Protein restriction; Metabolic programming.

Área temática: Physiology.

Imunogenética

ALELOS HLA RAROS E BEM DOCUMENTADOS NA POPULAÇÃO DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA ATENDIDA PELO LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA DA UEM

Kayane Harumi Mashiba¹; Lucas Eduardo Massucato¹; Fernanda Pelisson Massi²; Dara Maria dos Santos Felix³; Quirino Alves de Lima Neto⁴; Rafael Campos Bezerra⁴; Mariana de Souza Terron Monich⁴; Larissa Danielle Bahls Pinto⁴; Jeane Eliete Laguila Visentainer⁴

¹Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

³Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Imunogenética da UEM, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

A região gênica HLA é conhecida por ser altamente polimórfica, assim, para cada *locus* HLA, milhares de alelos são possíveis. Tais alelos são classificados como raros ($fa \leq 0,00001$), comuns ($fa \geq 0,001$) ou bem documentados (BD), sendo estes encontrados com maior frequência apenas em uma população específica. Diante dos avanços nas metodologias de tipificação HLA e o crescente uso de técnicas de alta resolução, como o sequenciamento por Sanger (Sequence based typing - SBT) e/ou NGS (*Next-Generation Sequencing*), a identificação alelos considerados raros tem sido frequente. A classificação dos alelos HLA, baseada em suas frequências é importante, pois influencia nas tomadas de decisão em laboratórios de histocompatibilidade quanto realizar ou não testes complementares à metodologia de triagem (*Sequence-Specific Oligonucleotide* – SSO). Portanto, o presente trabalho objetivou verificar as frequências dos alelos raros encontrados em genotipagens realizadas no Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM) para identificar quais destes são BD na nossa população. Foi realizada a contagem manual dos alelos raros identificados e confirmados por SBT na população atendida pelo LIG-UEM entre janeiro/2018 e abril/2021. Classificou-se os alelos como raros ou BD de acordo com o catálogo CWD 2.0.0 (Mack et al., 2013) e os bancos de dados *Allele Frequencies* e Rede Brasil de Imunogenética (Projeto Raros). Foram realizadas 13.099 genotipagens HLA dos *loci* A, B e DRB1 de Doadores Voluntários de Medula Óssea (DVMO) e identificados 49 alelos raros. Os alelos *HLA-A*02:52*, *HLA-A*23:17*, *HLA-A*31:15*, *HLA-A*68:17*, *HLA-B*15:31* e *HLA-B*39:13* foram identificados em pelo menos 5 indivíduos não aparentados e os alelos *HLA-B*39:14* e *HLA-B*52:21*, em 4 indivíduos não aparentados dentro de haplótipos específicos. Desta forma tais alelos, classificados como raros pelo catálogo CWD 2.0.0, que se baseia na frequência dos alelos nas populações europeia e norte americana, passaram a ser considerados BD nesta população brasileira, que tem por característica alta miscigenação.

Palavras-chave: Genes HLA; Tipagem HLA; Frequência alélica.

Área temática: Imunogenética

POLIMORFISMO DE DELEÇÃO APOBEC3A/B NO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Eliza Pizarro Castilha¹; Rafaela Roberta de Jaime Curti²; Nádia Calvo Martins Okuyama²; Thaílla Cristina Faria Pacheco³; Sarah Lott Moretto²; Janaina Nicolau de Oliveira²; Mariane Ricciardi da Silva³; Giulia Mariane Fortunato³; Rayssa Menon Santos³; Glauco Akelington Freire Vitiello⁴; Karen Brajão de Oliveira⁴.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁴Docente – Departamento de Patologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

Introdução: O papilomavírus humano (HPV) é capaz de infectar pele e mucosas, sendo um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical, em conjunto com fatores individuais, como polimorfismos genéticos. Foi relatado que a Enzima Editor do mRNA da Apolipoproteína B, semelhante a polipeptídeo catalítico (APOBEC) participa da patogenia molecular do câncer e da restrição viral do HPV. Um polimorfismo de deleção (APOBEC3A/B), no gene desta enzima, é capaz de influenciar a susceptibilidade ao câncer. **Objetivo:** Avaliar o papel do polimorfismo de deleção APOBEC3A/B no desenvolvimento do câncer cervical. **Material e métodos:** Amostras de 355 pacientes do sexo feminino, foram obtidas após aprovação do comitê de ética da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 05505912.0.0000.5231). O grupo controle foi constituído de 275 amostras HPV negativas e sem lesões cervicais e o grupo caso de 80 amostras HPV positivas com câncer cervical. Após extração de DNA das amostras pela técnica de salting out, o polimorfismo APOBEC3A/B foi identificado pela técnica de PCR alelo-específico seguida de eletroforese em gel de poliácridamida corado com solução de nitrato de prata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste do qui-quadrado para comparar a proporção genotípica e alélica entre os grupos, valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** A frequência de genótipos no grupo controle foi de 66,90% homozigotos selvagens, 26,55% heterozigotos e 6,55% homozigotos deletados. No grupo caso, a frequência de genótipos observados foi de 65% homozigotos selvagens, 27,50% heterozigotos e 7,50% homozigotos deletados. Não houveram diferenças significativas na frequência dos genótipos ($P=0,933$) nem na distribuição alélica ($P=0,691$) entre os grupos. **Conclusão:** A presença do alelo variante, assim como a distribuição genotípica do polimorfismo de deleção de APOBEC3A/B não demonstraram associação ao câncer cervical. Mais estudos são necessários a fim de esclarecer o papel da APOBEC3A/B no desenvolvimento do câncer cervical.

Palavras-chave: APOBEC; Câncer do colo do útero; Polimorfismo.

Área temática: Imunogenética.

Imunologia

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DENGUE EM AMOSTRAS DE PACIENTES EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO PARANÁ

Nadya Garcia de Oliveira¹; Bruno Costa Buranello²; Gilberto Akira Hirayama³; Dennis Armando Bertolini⁴;

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

² Bioquímico – Laboratório de Análises Clínicas/ Hospital Universitário Regional de Maringá, Maringá/PR

³ Técnico Administrativo – Laboratório de Análises Clínicas/ Hospital Regional de Maringá, Maringá/PR

⁴ Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A dengue é uma doença infecciosa, transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti* e atualmente se trata de um problema de saúde pública no mundo. No Paraná, segundo dados do SINAN, o número de casos prováveis de dengue registrados em 2018 foi de 1.070, já em 2019 no mesmo período, ocorreram 39.200 notificações. **Objetivo:** Verificar a sensibilidade e a especificidade de técnicas utilizadas para o diagnóstico de dengue em determinado Hospital do Noroeste do Paraná e em um laboratório de referência na capital do Estado. **Material e métodos:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº 4.271.688). Trata-se de um estudo quantitativo, de natureza descritiva. Os resultados dos testes da proteína NS1 por teste rápido e detecção do RNA do vírus por RT-qPCR no período de 01/2019 a 02/2020 foram acessados pelo sistema GSUS. Os dados coletados foram compilados em uma planilha no Excel e analisados. O teste Kappa foi realizado utilizando o software BioEstat 5.3. **Resultados:** Dos 204 testes rápidos para NS1 realizados, 29 (14,2%) apresentaram resultado reagente e destes, 24 (82,7%) obtiveram resultado detectável por RT-qPCR. Dentre os 175 pacientes com resultado do teste rápido para NS1 não reagente, 19 (10,8%) obtiveram resultado detectável por RT-qPCR. Em 5 (13,5%) casos obteve-se resultado positivo para NS1 e não detectável para a pesquisa da partícula genética do vírus no plasma do mesmo paciente. A sensibilidade e especificidade encontradas foi de 55,8% e 96,9% respectivamente. Na análise de concordância entre os dois testes, o valor do teste Kappa foi de 0,88. **Conclusão:** Concluímos que o teste rápido para pesquisa do antígeno NS1 do vírus da dengue apresentou baixa sensibilidade e alta especificidade quando comparado ao RT-qPCR, no entanto, a concordância entre os dois testes foi quase perfeita.

Palavras-chave: Dengue; RT-PCR em tempo real; NS1.

Área temática: Imunologia.

EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E INTERAÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7 COM VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma cruzi*

Lucas Felipe dos Santos¹; Gabriella Ferreira Rodrigues²; Maria Isabel Lovo-Martins³; Aparecida Donizette Malvezi⁴; Raquel Pires Nakama⁵, Philenon Pinge-Filho⁶.

¹ Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Microbiologia no laboratório de Imunopatologia Experimental. Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

² Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

³ Pós-doutoranda no laboratório de Imunopatologia Experimental. Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR. Docente Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina.

⁴ Acadêmica de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR

⁵ Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Experimental no laboratório de Imunopatologia Experimental. Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

⁶ Docente – Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

Introdução: Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, a resposta imunológica é importante para o controle do parasitismo e sobrevivência do hospedeiro. Macrófagos são células com reconhecida ação tripanocida que produzem diversos mediadores inflamatórios, como os eicosanóides, atuando no controle da carga parasitária e no desenvolvimento da infecção. Contudo, o parasito apresenta mecanismos de evasão, como as vesículas extracelulares de *T. cruzi*, que participam da comunicação intercelular ao carregarem moléculas funcionais que sinalizam para células do hospedeiro modulando a resposta imunológica a favor do parasito. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da aspirina (ASA) sobre a ação exercida pelas vesículas extracelulares de *T. cruzi* cepa Y (EvY) na infecção por *T. cruzi* Y em macrófagos *in vitro*. **Materiais e métodos:** Macrófagos Raw 264.7 foram tratados com ASA (1h), seguido do tratamento com EvY (24h) e infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* (18h). A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Nos macrófagos infectados foi determinado o índice de internalização do parasito e quantificado nitrito como estimativa da produção de óxido nítrico (NO). Estatística avaliada por One-Way ANOVA com testes de comparações múltiplas. **Resultados:** As concentrações de ASA utilizadas não apresentaram citotoxicidade. Macrófagos expostos à EvY e posteriormente infectados por *T. cruzi* apresentaram menor produção de NO e aumento do número de formas amastigotas internalizadas no citoplasma celular. Entretanto, quando os macrófagos foram tratados com ASA antes da exposição às EvY e subsequente infecção com tripomastigotas, houve maior produção de NO, assim como menor internalização de amastigotas, em comparação com os controles (macrófagos expostos somente às EvY e infectados). **Conclusão:** Acetilação da ciclooxigenase pela ASA em macrófagos tornou essas células menos susceptíveis aos efeitos das EvY, uma vez que a produção de NO ficou semelhante ao controle infectado sem EvY e não houve aumento da internalização de parasitos.

Palavras-chave: doença de Chagas; vesículas extracelulares; aspirina.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Área temática: Imunologia.

Microbiologia

HYP-P123 INTRACELLULAR UPTAKE ON *Fusarium solani*

Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado¹; Karina Mayumi Sakita¹; Glaucia Sayuri Arita¹; Camila Barros Galinari¹; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini¹; Gabriel Batista Cesar²; Renato Sonshine Gonçalves³; Wilker Caetano³; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁴; Érika Seki Kioshima⁴

¹Graduate student (PhD degree), Program of Bioscience and Physiopathology, University of Maringá-PR

²Doctor, Department of Chemistry, State University of Maringá-PR

³Professor Doctor, Department of Chemistry, State University of Maringá-PR

⁴Professor Doctor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá-PR

Introduction: Hypericin nanoencapsulated in P-123 (Hyp-P123) is a photosensitizer (PS) widely used in inactivation photodynamic (PDI). Hyp-P123 in the presence of oxygen, when excited by a specific wavelength, promotes photochemical reactions, causing cell damage, inactivating microorganisms. This approach has shown to be promising due to its high effectiveness rate and low toxicity. *Fusarium solani* have been observed as emerging opportunistic pathogen, causing skin infections (keratitis and onychomycosis) to systemic infections disseminated, and the conventional antifungals classically used against this genus shows low activity. In this sense, Hyp-P123-PDI could be used as an option for photoinactivation *F. solani*. **Objective:** To evaluate the Hyp-P123 intracellular uptake on planktonic cells of *F. solani* for action PDI in the future. **Material and methods:** *F. solani* were suspended in 1×10^5 conidia/mL and added Hyp-P123 concentration (6.25 $\mu\text{mol/L}$), incubated 2h/dark/ at 25°C. Then, the suspension was washed twice and resuspended in sterile saline. Conidia Hyp-P123 binding and uptake was measured by a Flow Cytometer BD FACSCalibur™ providing excitation spectrum in the range 550–750 nm for detecting the fluorescence emission of PS, 10.000 events were counted. Hyp-P123 fluorescence were quantified using an index of variation (IV) obtained from the equation $(M_r - M_c)/M_c$, in which M_r is the median fluorescence for the conidia with Hyp-P123, and M_c is the median fluorescence for the conidia control without Hyp-P123. Intracellular uptake of Hyp-P123 were visualized in Fluorescence Microscope-EVOS™ **Results:** The fluorescence intensity of Hyp-P123 in conidia examined by flow cytometer, shows the PS has penetration on conidia with IV = 2.65. In addition the intracellular uptake of Hyp-P123 in *F. solani* was demonstrated by fluorescence microscopy at 2 h post-incubation. **Conclusion:** These results pointed that Hyp-P123 is able to permeate on *F. solani*, indicating as PS could be activity in PDI.

Keywords: Intracellular uptake; Hypericin-P123; *Fusarium solani*.

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

Thematic area: Microbiology.

STANDARDIZATION OF PROTEIN EXTRACTION AFTER ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY FOR PROTEOMIC APPROACH

João Vitor de Oliveira Silva¹, Jean Eduardo Meneguello², Nianki Mayumi Paiva Hinokuma³, Máira Dante Formagio¹, Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá⁴ and Jane Martha Graton Mikcha⁴

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, PR

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

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

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

Introduction: The increase of antibiotics resistant bacteria generates the need for new antimicrobial approaches. In this context, an alternative technique is antimicrobial photodynamic therapy (aPDT). This therapy is based on the interaction of oxygen, a dye called photosensitizer (PS), and a visible light source that activates reactive oxygen species culminating in the death of microorganisms. Several studies reported the efficacy of aPDT with Erythrosine (ERY) against *Staphylococcus aureus*, but there is a lack of information about the bacterial cellular response after aPDT-ERY. **Objective:** Standardize protein extraction of *S. aureus* after aPDT-ERY for proteomic approach and also to future photoinactivation studies. **Methods:** The bacterial suspension of *S. aureus* (10^7 UFC/mL) was treated with ERY (10^{-5} mol/l) and irradiated by green LED for 10 min. Growth control (GC) (bacteria and phosphate-buffered saline), photosensitizer control (PC) (bacteria and ERY without light), and light control (LC) (bacteria exposed to LED in the absence of photosensitizer) have also been tested. Colony-forming unit counting (UFC) and protein extraction was performed simultaneously, as an efficacy measure of the treatment. The samples treated and untreated were filtered with a membrane filter of $0.45 \mu\text{m}$ and a lysis buffer was added for step of protein extraction. Protein quantification was performed by Bradford assay. **Results:** aPDT-ERY significantly reduced in ~ 3.4 log CFU/ml log while no photokilling effects were observed in control groups (7.4 logs CFU/ml). The mean results of each group of protein quantification used to assess the efficiency of extraction were: 1577.3, 1518.9, 1387.7, and 1190.5 $\mu\text{g/ml}$, for samples treated with ERY, GC, PC, and LC, respectively. **Conclusion:** Results demonstrated that the technique used for protein extraction was effective after aPDT and that bacterial killing by photoinactivation did not impose issues for the next steps of proteomic analysis.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy; Erythrosine; *Staphylococcus aureus*; Proteome.

Thematic area: Microbiology.

EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF A PRENYLATED FLAVONOID ISOLATED FROM GREEN PROPOLIS: A SYSTEMATIC REVIEW

Jakeline Luiz Corrêa¹; Marcos Luciano Bruschi²; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski³; Melyssa Fernanda Norman Negri³

¹ Postgraduate student (PhD degree) in Health Sciences, State University of Maringá

² Professor – Laboratory of Research and Development of Drug Delivery Systems, Department of Pharmacy, State University of Maringá

³ Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá

Introduction: Due to the high incidence of fungal infections worldwide, there is a growing demand for the development of new therapeutic approaches. The largest group of compounds isolated from propolis are the flavonoids, which are characterized by broad biological activity, in which the apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) corresponds to one of the most studied phenolics, mainly due to its antioxidant activity, however, its antifungal activity is also being investigated. **Aim:** Review current knowledge about the antifungal effect of apigenin, a prenylated flavonoid isolated from green propolis. **Material and methods:** A systematic review was carried out using articles from the PubMed database from the last ten years (period from January/2011 to January/2021), and which met all the inclusion and exclusion criteria, in which only original articles, in English and with an abstract available for evaluation, were included, and excluded reviews and systematic reviews. **Results:** A total of 107 articles were identified and after applying the inclusion and exclusion criteria and the full reading, 28 articles were selected to participate in the research. The studies collected in this systematic review provide evidence that apigenin has the potential to inhibit the growth of *Candida* species, ability to inhibit biofilm formation, in addition to presenting antifungal activity for the clinical treatment of dermatophytosis. **Conclusion:** Apigenin demonstrates antifungal activity, however, many studies are currently limited, which reinforces the need for further studies, despite that, the information already available will serve as a basis for directing future research focused on the development of specific and safe antifungals.

Keywords: Natural products; Apigenin; Antimicrobial.

Financier: CAPES

Thematic area: Microbiology.

TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA SOLÚVEL EM ÁGUA ASSOCIADA A ÁCIDOS ORGÂNICOS FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Luana Carolina Martins Rosa¹; Vanessa de Carvalho Rodrigues²; João Vitor de Oliveira Silva³; Leticia Graziela Zavadzki Silva⁴; Maíra Dante Formagio⁵; Andreia Farias Pereira Batista²; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá⁵; Fernanda Vitória Leimann⁶; Jane Martha Graton Mikcha⁶

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

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

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

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

⁶Docente – Departamento Acadêmico de Alimentos e Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão, Campo Mourão/PR.

Introdução: *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes etiológicos envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos. Os alimentos podem ser contaminados em qualquer etapa da produção e as metodologias utilizadas nem sempre são efetivas para o controle microbiano. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma nova técnica que consiste em uma reação fotoquímica capaz de causar danos celulares, ocasionando a morte do microrganismo. **Objetivo:** Avaliar o efeito fotodinâmico de curcumina solúvel em água (TFD-WSC) em pH ácido frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Material e métodos:** Os ensaios de fotoinativação foram realizados com diluições seriadas de WSC (31,25 a 3,90 µg/ml) em pH 5,0 ajustado com os ácidos cítrico e láctico. A suspensão bacteriana foi submetida ao tratamento com WSC em diferentes concentrações e tempos de iluminação com LED azul. Posteriormente, as amostras foram semeadas em Tryptic Soy Agar e incubadas a 35°C por 24h, os resultados foram expressos em log UFC/mL. **Resultados:** TFD-WSC na presença de ácido láctico resultou em inativação total da bactéria após os tempos de 2,5, 5, 10 e 15 minutos e WSC a 31,25 e 15,62µg/mL. Na TFD-WSC com o ácido cítrico não foram recuperadas células viáveis após 10 e 15 minutos de exposição a luz e WSC a 3,90µg/mL e 7,81µg/mL, e com WSC a 7,81 µg/mL após 5 minutos de iluminação. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a terapia fotodinâmica mediada por WSC foi eficaz para controle deste patógeno de origem alimentar, sendo o ácido cítrico mais efetivo.

Palavras-chave: Controle microbiano; Fotoinativação; Curcumina.

Área temática: Microbiologia

EXPRESSÃO DE GLUTATIONA REDUTASE DE *Aspergillus fumigatus* COMO ALVO PARA NOVOS ANTIFÚNGICOS

Maria Eduarda Gobara de Moura¹; Vitoria Monteiro de Araújo Viela²; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues Vendramini³; Karina Mayumi Sakita⁴; Isis Regina Grenier Capoci⁵; Érika Seki Kioshima Cotica⁶

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Bolsista de desenvolvimento tecnológico e industrial (DTI-2) finep, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

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

⁶Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Aspergilose invasiva (AI) é uma das infecções fúngicas mais prevalentes no Brasil, com significativa gravidade ao paciente, causada pela inalação de conídios do fungo *Aspergillus spp.* Os antifúngicos disponíveis para tratamento podem apresentar toxicidade e exigem longo período de uso. Uma alternativa é desenvolver novas terapias antifúngicas. A glutiona redutase (GLR) é um potencial alvo farmacológico. As espécies reativas de oxigênio, podem ser tóxicas às células, para evitar isso, cabe à GLR neutralizá-las, estudos já mostraram que inibir GLR implicaria em prejuízos na sobrevivência das células fúngicas. **Objetivo:** Padronizar a expressão da proteína recombinante GLR de *Aspergillus fumigatus*, para posteriormente validar novos inibidores desta enzima. **Material e métodos:** Para a expressão da GLR foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3), contendo vetor plasmidial pET-21a. Com pré inóculo de 5% + 20mL de cada meio de cultura, iniciou-se a indução quando incorporado o agente indutor de expressão, isopropil- β -tio-galactopiranosídeo (IPTG). Diferentes condições foram avaliadas objetivando a melhor expressão de GLR: três meios de cultura para selecionar qual a bactéria melhor expressaria a proteína, sendo eles: Luria Bertani (LB), Terrific Broth (TB) e 4YT; tempos de indução (0h, 1h, 2h, 4h, 6h, *Overnight*); e temperaturas de 30°C e 37°C. As amostras foram centrifugadas, e pellets ressuspensos em tampão 2x para análise em gel SDS-PAGE 12%. **Resultados:** Com análise de SDS-PAGE foi visualizada a proteína recombinante, considerando peso molecular de aproximadamente 52kDa, avaliou-se condições ótimas para sua expressão, sendo que indução em meio TB, a 30°C por 6h, foi o ideal para obtenção de GLR. Além da comprovação de sua solubilidade. **Conclusão:** Avanços são necessários no tratamento da Aspergilose invasiva, visto sua gravidade e problemática frente aos antifúngicos disponíveis. Por isso, a busca por padronizar a expressão de possíveis alvos como a GLR, que auxiliará no desenvolvimento de melhores terapias para AI.

Palavras-chave: Aspergilose invasiva; Glutiona redutase; Proteína recombinante.

Área temática: Microbiologia

ATIVIDADE DE DERIVADOS DE TIOSSEMICARBAZONAS EM *Mycobacterium tuberculosis*

Ana Paula Desiree de Oliveira¹; Eloísa Gibin Sampiron²; Andressa Lorena Ieque², Tamires Leite Valverde²; Emanuelle Finatto Dala Rosa³; Rosilene Fressatti Cardoso⁴; Fabio Vandresen⁵; Regiane Bertin de Lima Scodro⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina/PR

Introdução: A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* que pode levar o indivíduo à morte. O tratamento para TB sensível é poliquimioterápico e de longa duração. Apesar de bem estabelecido, o surgimento de micobactérias resistentes a medicamentos e a dificuldade de adesão ao tratamento incita a busca de novas substâncias com atividade antimicobacteriana. As tiossemicarbazonas mostram boa atividade biológica e teve como representante usado no tratamento da TB a tiacetazona. **Objetivo:** Avaliar a atividade de derivados de tiossemicarbazonas contra a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv. **Material e métodos:** Foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de oito derivados de tiossemicarbazonas pelo método *resazurin microtiter assay plate* (REMA). **Resultados:** Dos oito derivados testados, quatro apresentaram CIMs promissoras com valores entre 7,8 e 31,25 µg/mL. Os outros derivados apresentaram CIM >250 µg/mL (maior concentração testada). Todos os derivados possuem a mesma estrutura química, com variações no elemento ligado ao anel benzênico; dessa forma, observou-se que no derivado (6), o elemento cloro na posição *para*, foi o que apresentou melhor atividade anti-*M. tuberculosis* (7,8 µg/mL). **Conclusão:** Pode-se observar que metade dos derivados de tiossemicarbazonas apresentou CIM contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv com valores otimistas, sendo necessário outros estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Concentração inibitória mínima; *Mycobacterium tuberculosis*; Tiossemicarbazonas.

Financiador (es): (CAPES)/CNPq.

Área temática: Microbiologia.

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA MEDIADA POR CURCUMINA SOLÚVEL EM ÁGUA PARA CONTROLE DE *Staphylococcus aureus*

Letícia Graziela Zavadzki Silva¹; Luana Carolina Martins Rosa²; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá³; Fernanda Vitória Leimann⁴; Jane Martha Graton Mikcha³.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

⁴Docente – Departamento Acadêmico de Alimentos e Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão, Campo Mourão/PR

Introdução: *Staphylococcus aureus* é uma das principais bactérias envolvidas em casos de doenças transmitidas por alimentos, apresentando capacidade de se multiplicar e produzir enterotoxinas responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica. A inativação fotodinâmica (IF) é uma técnica promissora para controle microbiano que envolve a ação sinérgica entre um composto fotossensibilizador (FS) e luz em comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio, capazes de inativar ou causar morte de microrganismos. A curcumina é utilizada como FS e vem sendo estudada por ser de origem natural e por se apresentar eficiente para a inativação de uma ampla gama de microrganismos. **Objetivo:** Analisar a eficácia da inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus*, utilizando curcumina solúvel em água (WSC) como fotossensibilizador e LED azul. **Material e métodos:** *S. aureus* ATCC 25923 foi cultivado e a suspensão bacteriana foi tratada com WSC nas concentrações de 31,25µg/mL; 15,62µg/mL e 7,81µg/mL definidas em estudos prévios do grupo de pesquisa. As amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro e iluminadas com LED azul (440nm a 460nm) por 15, 10, 5 e 2,5 minutos. Após irradiação nos diferentes tempos, as amostras foram semeadas em *Trypticase Soy Agar*, incubadas a 35°C por 24h e então realizada a contagem de colônias comparando-as com o controle (sem WSC) e os resultados foram expressos em log UFC/mL. **Resultados:** Comparado ao controle, foi possível observar diminuição de aproximadamente 5 log UFC/mL nos tempos 15 e 10 minutos e de aproximadamente 4 log UFC/mL nos tempos 5 e 2,5 minutos na menor concentração testada de WSC (7,81µg/mL). Nas concentrações de 15,62µg/mL e 31,25µg/mL não foram recuperadas células viáveis em todos os tempos testados. **Conclusão:** IF mediada por WSC apresentou resultados promissores com potencial efeito antibacteriano contra um importante patógeno de interesse alimentar.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica; *Staphylococcus aureus*; Curcumina.

Financiador (es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Área temática: Microbiologia

COINFECTION OF SARS-CoV-2 AND HIV IN A PATIENT IN MARINGÁ CITY, BRAZIL

Deborah de Castro Moreira¹; Gabriella Letícia Bonone²; Dennis Armando Bertolini³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

Introduction: Since a coronavirus disease 19 (COVID-19) emerged in China in 2019, the Centers for Disease Control and Prevention have cautioned that people living with human immunodeficiency virus syndrome may be a risk group. **Aim:** Report an identified death case involving coinfection of SARS-CoV-2 and HIV. **Material and methods:** We performed a retrospective review of medical records of patients with COVID-19 admitted to the Regional University Hospital of Maringá (HUM). **Results:** On 17 April 2021, a 28-years-old man was admitted to the respiratory emergency care of the HUM with fatigue, dyspnea and ventilator chest pain. The patient denied comorbidity and reported episodes of diarrhea, fever, coughing, sore throat and weight loss in the last 3 months. On admission, physical examination revealed a respiratory rate of 20 irpm, and oxygen saturation of 88%, which reached 92-94% while he was given mask flow oxygen. The RT-PCR assay and chest computed tomography confirmed SARS-CoV-2 pneumonia with findings of multiple ground-glass opacities and approximately 75% of the lung parenchyma involvement and blood routine test, revealed a severe lymphopenia ($523.1/\text{mm}^3$). After 8 days of hospitalization and clinical improvement, the patient was discharged. In June, he returned to service, with SARS-CoV-2 reinfection, where he was diagnosed with HIV coinfection and died. Lymphopenia got worse with a low CD4+ T-lymphocyte (54), two serologic tests HIV-positive results and high viral load detected (99.934 copies/ml). **Conclusion:** We described a patient with HIV and COVID-19 coinfection. It could be possible that since his first hospitalization the patient already had AIDS, and the lymphopenia and weight loss may be related to the latent HIV infection rather than to a clinical manifestation of SARS-CoV-2, but the similarity symptoms could have difficult the diagnosis, what warn about overlapping symptoms possibility and delayed diagnosis of coinfections.

Palavras-chave: HIV; SARS-CoV-2; Coinfection.

Financiador (es): Capes.

Área temática: Microbiologia.

MUDANÇAS NOS HÁBITOS NAS COMPRAS E USO DE DELIVERY DURANTE A COVID-19

Francini Martini Mantelo¹; Nicole Lohana de Souza²; Nianki Mayumi Paiva Hinokuma³; Paula Aline Zanetti Campanerut Sá⁴; Jane Martha Graton Mikcha⁵

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

²Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

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

Introdução: Atualmente tem sido motivo de grande aflição para saúde pública mundial a pandemia de COVID-19. Apesar das recentes vacinas desenvolvidas, o vírus continua se espalhando. O comportamento da população tem papel importante na propagação e manutenção da pandemia. Avaliar o conhecimento e percepções da população quanto à pandemia é útil na elaboração de protocolos e planos de mitigação mais eficazes. **Objetivo:** Avaliar o conhecimento e comportamento da população nos hábitos e cuidados durante as compras e uso do *delivery* na pandemia da COVID-19. **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo COPEP-UEM (parecer nº4.112.462). Estudo transversal, em que foi aplicado questionário utilizando *Google Forms*, o link gerado foi compartilhado com o público nas redes sociais. Como medida de risco considerou-se razão de chance (*Odds Ratio*), com IC 95% calculada a partir do ajuste do modelo de regressão logística. Diferenças de prevalências, entre hábitos antes e durante a pandemia foram testadas pelo teste de McNemar. **Resultados:** O estudo contou com a participação de 1.061 respondentes de todo Brasil, sendo 87% do sexo feminino e 69,9% da faixa etária de até 35 anos. Observou-se que 90,2% dos participantes presumem que higienizar embalagens com água e sabão ou álcool 70% pode eliminar o coronavírus. As pessoas passaram a frequentar supermercados mais vezes durante o mês. Daqueles participantes que têm como primeira ação lavar as mãos ao chegar em casa após as compras (n=278), somente 35,25 % tinham esse hábito antes da pandemia. Sobre limpeza das embalagens dos alimentos recebidos por *delivery*, 71,85% dos participantes têm como hábito limpá-las durante a pandemia, sendo que, destes, 95,22% não possuíam este hábito antes da pandemia. **Conclusão:** Foi possível observar mudança significativa quanto a higienização de embalagens de alimentos recebidos por *delivery*, além de mudança significativa no hábito de lavar as mãos ao chegar em casa.

Palavras-chave: Conhecimento; COVID-19; Segurança de alimentos.

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Área temática: Microbiologia.

DIABETIC HOST SUSCEPTIBILITY TO FUNGAL INFECTIONS: MURINE MODEL OF *TINEA CAPITIS*

Camila Barros Galinari¹; Pollyanna Cristina Vicenzi Conrado¹; Glaucia Sayuri Arita¹; Valéria Aparecida Baquetti Mosca¹; Raquel Cabral Melo²; Tiago de Paula Bianchi³; Erika Seki Kioshima Cotica⁴; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça⁴; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski⁴

¹Graduate student (Doctorate degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

²Master in Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

³Graduate student of Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

⁴Professor, Department of Clinical Analyzes and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR.

Introduction: Diabetes mellitus (DM) is characterized as a chronic metabolic disorder, resulting in hyperglycemia. It is known that diabetic patients are more susceptible to developing traumas and ulcerations, which serve as an entry point for pathogenic microorganisms. For dermatophytosis, the presence of DM results in a 2.5 times higher chance of developing this ringworm. **Aim:** To evaluate the pathogenic difference of *Microsporum canis* infection in diabetic and non-diabetic mice. **Materials and methods:** The procedures were approved by the CEUA-UEM (nº 5708300418). Male swiss mice were divided into two groups: diabetic (GDM) and non-diabetic (GNDM). Induction of Type I DM was performed with single dose of 200 mg/kg Alloxan (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) intraperitoneally in animals with food restriction for 8 hours. Diabetogenic status was considered when glycemic doses were greater than 180 mg/dL. The infection was realized for three days with cell suspension containing 1×10^6 conidia/mL. Clinical evaluation of the lesions was visually examined and recorded on the 4th, 10th, and 16th day of the infection, using a score to analyze the presence of erythema, scaling, itching, edema, tegument damage, and hair loss. While euthanasia, to perform the quantification of colony forming units (CFU) in the skin, were performed on the 10th and 16th days. **Results:** Clinical evaluations showed that GDM had statistically significantly more edema, tegument damage, and erythema compared to GNDM, both on study day 4th ($p = 0.0004$) and 10th ($p = 0.0042$). However, the two groups averaged between 3 to 4 \log_{10} CFU/g skin on both evaluation days, showed no statistical difference. **Conclusion:** Our results corroborate the clinical characteristics of diabetic patients, and this condition is probably interconnected with the abnormal neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and cellular immunity presented in these individuals.

Keywords: Skin dermatophytosis; Animal model; Diabetes mellitus.

Funders: CAPES and CNPq

Thematic Field: Microbiology

ANÁLISE DAS DOSAGENS SÉRICAS DE VITAMINA D E B12 NA EVOLUÇÃO DO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM COVID-19

Gabriella Letícia Bonone¹; Déborah de Castro Moreira²; Dennis Armando Bertolini³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

Introdução: A deficiência de vitamina D tem sido relacionada ao aumento na incidência de infecções das vias aéreas superiores, além disso, pacientes que testaram positivo para o SARS-CoV-2 também apresentaram baixos níveis de vitamina D sérica. A vitamina B12 também possui papel importante na regulação da imunidade, sua carência afeta a produção de hemácias e gera prejuízos na resposta a infecções virais como a COVID-19, enquanto seus níveis elevados podem indicar diminuição da função hepática. **Objetivo:** Analisar o nível sérico das vitaminas D e B12 em amostras de pacientes internados, acometidos por COVID-19 e com sintomas graves da doença. **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, conforme Parecer n° 4.268.659. Foram coletadas amostras de sangue de 40 pacientes internados na ala COVID do Hospital Universitário Regional de Maringá, sendo 21 (52,5%) pacientes na UTI e 19 (47,5%) na enfermaria. As amostras foram centrifugadas e o soro armazenado a -20°C. As dosagens séricas foram realizadas por intermédio de métodos de quimioluminescência. **Resultados:** 65,5% (25, sendo 13 da UTI e 12 da enfermaria) dos pacientes apresentaram dosagens séricas dentro dos limites de referência para os dois marcadores, 22,5% (9, sendo 6 da UTI e 3 da enfermaria) apresentaram a vitamina D sérica abaixo dos valores de referência e 15% (6, sendo 2 da UTI e 4 da enfermaria) apresentaram B12 sérica elevada. **Conclusão:** As dosagens de vitamina D e B12 séricas podem ser consideradas como possíveis marcadores para avaliação do prognóstico dos pacientes com COVID-19, visto que parte dos que estavam na UTI apresentaram deficiência de vitamina D, enquanto parte dos pacientes da enfermaria apresentaram dosagem sérica de B12 elevada, indicando possível diminuição da função hepática pela COVID-19. Porém, são necessários estudos mais abrangentes para avaliar tal possibilidade.

Palavras-chave: COVID-19; Vitamina B12 sérica; Vitamina D sérica.

Financiador (es): Capes/CNPq.

Área temática: Microbiologia.

FREQUÊNCIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ISOLADOS DA SECREÇÃO OROTRAQUEAL EM PACIENTES COM COVID-19

Heloisia Moreira Dias Pereira¹; Mayara Assumpcao Lolis Baveloni²; Beatris Truizzi Silva³, Monica de Souza Ferreira de Mattos⁴, Mirian Nicéa Zarpellon⁵; Sheila Alexandra Belini Nishiyama⁶, Maria Cristina Bronharo Tognim⁶

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR.

²Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

³Residente em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

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

⁵Farmacêutica Bioquímica do Hospital Universitário de Maringá, Maringá, PR

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

Introdução: Pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV) em pacientes com COVID-19 estão relacionadas às maiores complicações respiratórias e aumento de mortalidade, sendo o monitoramento dos microrganismos isolados de secreção traqueal (TOT) de grande importância. **Objetivo:** Avaliar a frequência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das principais bactérias isoladas em TOT de pacientes com COVID-19 hospitalizados no Hospital Universitário de Maringá entre 06/20 à 05/21. **Material e métodos:** Trata-se de um estudo observacional transversal retrospectivo, baseado nos dados do software EpiCenter™. A coleta da secreção orotraqueal foi realizada por um profissional treinado em frasco estéril tipo bronquinho. Foi considerada positiva cultura com contagem de colônias superior à 1.000.000 de unidades formadoras de colônia/mililitro de secreção-UFC/mL. A identificação e antibiograma foram realizados no sistema automatizado Phoenix-BD™. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEM-CAAE 63610816.0.0000.0104. **Resultados:** Durante o período do estudo 95 pacientes apresentaram bactérias em TOT, totalizando 147 isolados bacterianos. A grande maioria - 90% eram bacilos Gram-negativos (BGN), sendo *Acinetobacter spp.*-Ac (n=58) o BGN mais prevalente; seguido de *Klebsiella pneumoniae* - Kp (n=26), e *Pseudomonas aeruginosa* - Pa (n=25). Entre 10% de Gram-positivos, *Enterococcus faecalis* foi o mais frequente, com um isolado resistente a vancomicina, e *Staphylococcus spp.* foram 67% resistentes a oxacilina. A resistência entre os BGN mais frequentemente isolados (Ac, Kp e Pa) foi extremamente preocupante. Até mesmo para os carbapenêmicos, principal opção terapêutica para BGN, a resistência foi de 96% dos isolados. Para fluoroquinolonas, sulfametoxazol-trimethoprima e aminoglicosídeos a resistência destes BGN foi de 97%, 85% e 80% respectivamente. **Conclusão:** A preocupante verificação de coinfeções como PAV em pacientes positivos para SARS-CoV-2 por bactérias altamente resistentes aos antibacterianos, nos alertam para que sejam implementadas estratégias para controle da disseminação de patógenos hospitalares multirresistentes, sobretudo, no cenário da COVID-19.

Palavras-chave: Pneumonia associada à ventilação mecânica; SARS-CoV-2; Resistência bacteriana.

Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Área temática: Microbiologia.

MUDANÇAS NAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO DE ALIMENTOS DURANTE A COVID-19

Nianki Mayumi Paiva Hinokuma¹; Nicole Lohana de Souza¹; Francini Martini Mantelo¹; Luana Carolina Martins Rosa¹; João Victor de Oliveira Silva²; Maíra Dante Formaggio²; Daiane Pereira Camacho³; Eraldo Schunk Silva⁴; Jane Martha Graton Mikcha⁵; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá⁵.

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Diretora, Vigilância em Saúde do Município de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente, Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

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

Introdução: Durante a pandemia de COVID-19 muita atenção foi dispensada aos cuidados com alimentos e superfícies, nesse sentido, autoridades sanitárias intensificaram as recomendações do uso de boas práticas de manipulação e preparo de alimentos. **Objetivo:** Diante deste cenário, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações de comportamento relacionadas à higienização e cuidados com os alimentos durante a pandemia. **Material e métodos:** Foi realizada uma pesquisa transversal pela plataforma Google Formulário com um questionário de 42 perguntas sendo 3 relacionadas especificamente à higienização no preparo dos alimentos. O link com o questionário foi compartilhado por e-mails e redes sociais (24 de julho a 23 de outubro de 2020). A análise dos resultados foi realizada pelo software SAS (Statistical Analysis Software) e teste de McNemar. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá (parecer nº 4.112.462). **Resultados:** Participaram da pesquisa 1.061 indivíduos. A maioria (61,73%) afirmou que a lavagem de mãos é a primeira ação realizada antes de preparar algum alimento, sendo que 96,18% já tinham esse comportamento antes da pandemia. Com relação a higienização de frutas e verduras durante a pandemia, a opção mais selecionada foi o uso de água sanitária (n= 398), sendo que 45,23% não utilizavam esse produto antes da pandemia. A segunda forma de higienização de frutas e verduras mais selecionada foi o uso de água e sabão (n= 311), sendo que 56,59% não tinham este hábito antes da pandemia. Quanto à limpeza da pia, bancadas e superfícies da cozinha, 71,81% (n=762) utilizavam água e sabão antes da pandemia. Dos participantes que utilizam álcool 70% (n= 147), 53,74% não faziam isso antes da pandemia. **Conclusão:** De forma geral, práticas de higiene como a lavagem das mãos e boas práticas de manipulação e preparo de alimentos foram intensificadas nesse período.

Palavras-chave: Manipulação de alimentos; Segurança de alimentos; COVID-19.

Área temática: Microbiologia.

ANALYSIS OF THE HIPERICIN+P123 PHOTOTREATMENT TOLERANCE OF *Candida albicans* AFTER FIVE-CONSECUTIVE EXPOSURES

Tiago de Paula Bianchi¹; Camila Barros Galinari²; Pollyanna Cristina Vicenzi Conrado²; Renato Sonchini Gonçalves³; Wilker Caetano⁴; Érika Seki Kioshima Cótica⁵; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski⁵; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁵

¹Graduate student of Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

²Graduate student (Doctorate), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá, PR

³Professor, Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, PR

⁴Professor, Department of Physics, State University of Maringá, Maringá, PR

⁵Professor, Department of Clinical Analyzes and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR

Introduction: Photodynamic Inactivation (PDI) is a promising alternative for the treatment of cutaneous fungal infections. This methodology uses the combination of a specific light source and a photoactive chromophore, such as hypericin, to generate reactive oxygen species. Due to the non-specific target of these molecules, low visibility has been given to the possibility of fungal tolerance induced by PDI, although there are already reports of resistance in tumor cells. Therefore, it is of great value to analyze the possibility of tolerance of PDI, regarding its topical and disruptive character. **Objective:** To analyze the development of tolerance in *Candida albicans* (ATCC90028) after five successive exposures to PDI with hypericin encapsulated in P123 (hip-P123). **Material and Methods:** Five successive PDI assays were performed analogously to Broth Microdilution (CLSI,2008). For this, hip-P123 was tested in 0.03125-16 μ mol/L and the fluence used was 37.8J.cm⁻²(650nm). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination was characterized by a reduction $\geq 2\log_{10}$ [CFU/mL]. The yeasts remaining in the subinhibitory concentration (Sub-MIC) were used for subsequent assays. **Results:** Yeasts first exposed to PDI were inhibited by the 1 μ mol/L of hip-P123. Cells from Sub-mic (0.5 μ mol/L) of this test were exposed a second time, showing increased susceptibility to PDI with MIC of 0.25 μ mol/L. The exposure of Sub-mic fungi from the second experiment (0.125 μ mol/L) evidenced a fungicidal character ($>3\log_{10}$ [CFU/mL]) of the 1 μ mol/L concentration on the third test. Likewise, the fourth exposure regressed the MIC to 0.5 μ mol/L, matching the subinhibitory condition of the previous assay. In the last exposure, it was possible to verify the inhibition of *C. albicans* to 1 μ mol/L, matching with the susceptibility profile of the first exposure to PDI. **Conclusion:** Thus, it was possible to experimentally verify that after 5 successive exposures of PDI mediated by hip-P123, *C. albicans* did not develop a condition of PDI tolerance.

Key-word: Hypericin; Photodynamic inactivation; Tolerance.

Financier(s): National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Thematic Field: Microbiology.

PHOTOINACTIVATION OF *Candida albicans* BY CURCUMIN-SCAFFOLD: PRELIMINARY RESULTS

Gabriela Franco de Oliveira Barbosa¹; Gabriel Batista Cesar²; Wilker Caetano³; Érika Seki Kioshima Cótica¹; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski¹; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça¹

¹Undergraduate student, Biomedicine – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá/PR

²Professor – Department of Chemistry, Unicentro

³Professor – Department of Chemistry, State University of Maringá

⁴Professor – Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá

Introduction: Photodynamic inactivation is a very promising methodology used in many fields of medicine and it is based on the interaction of a photosensitive compound and light source at specific wavelength in the presence of oxygen. This association produces reactive-oxygen species able to cause the death or the inactivation of cells. The association of this technique with nanotechnological products, such as the polymeric scaffolds, has been studied as an improvement of photodynamic permitting a greater administration of this technique. Curcumin, utilized as a photosensitizer, is a natural product known by its pharmacological, antibacterial, antifungal properties. Among the main etiologic agents of fungal infections, *Candida* spp. highlight out by being opportunistic and resistant to the conventional antifungals and causing superficial or systemic infections. **Objective:** To evaluate the fungicidal effect of curcumin saturated in a polymeric scaffold. **Material and methods:** The tests were based on the methodology of disk diffusion by EUCAST with some modifications for photodynamic procedures. The pre-incubation was tested at 15, 30, and 60 minutes, using *Candida albicans* ATCC 90028 (1.0×10^7 CFU/mL) and polymeric scaffolds synthesized with polymers F108 (3% and 5%) and PCL (10% and 12%) saturated with curcumin 0.7%. After the pre-incubation, the system was irradiated with LED (440-460nm) with fluence approximately of 30 J/cm^2 for 15 minutes. Antifungal activity was evaluated based on the growth of the colonies at the application site of the scaffolds. **Results:** It was possible to observe that polymeric scaffolds prevented the growth of colonies at the application site at 30 minutes of pre-incubation. **Conclusion:** According to preliminary tests, the results appoint that scaffolds saturated with curcumin were able to photoinactivate the fungal growth at the application site, being possible to continue these assays aiming the treatment of cutaneous lesions.

Keywords: Photodynamic therapy; Curcumin; *Candida albicans*.

Financial support: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), 424262/2018-5.

Thematic area: Microbiology.

INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS: VALORIZAÇÃO DO LAUDO LABORATORIAL DE HEMOCULTURA

Jhonny Kendy Okuma¹; Alessandra Arruda Lemos²; Giovanna Natsumi Eire³; Felipe Carnaval Chitolina⁴; Natália de Oliveira Bizetti Cano⁵; Daniela Dambroso Altafini^{2,3}; Cecília Saori Mitsugui³; Josmar Mazucheli⁴; Maria Cristina Bronharo Tognim⁵.

¹Acadêmico(a) de Graduação em Medicina, Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade Estadual de Maringá.

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

³Hospital Universitário Regional de Maringá, Universidade Estadual de Maringá.

⁴Docente – Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá.

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

Introdução: Bactérias Gram-positivas (GP) têm sido reportadas como principal grupo bacteriano causador de Infecção da corrente sanguínea (ICS). O uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento das ICS-GP tem propiciado uma maior disseminação de bactérias multirresistentes. Dessa forma, é de extrema importância o laudo laboratorial da hemocultura para definir o tratamento mais adequado da ICS. **Objetivo:** Verificar o tratamento empírico e sua adequação após laudo final da hemocultura de pacientes com ICS-GP. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo, com análise de prontuários de pacientes com ICS-GP, internados no Hospital Universitário de Maringá (HUM) no período de 2013 a 2018. Os dados foram coletados através Sistema de Gestão da Assistência de Saúde do Sistema Único de Saúde no Laboratório de Análises Clínicas do HUM. Foram incluídos 455 pacientes, destes 217 ICS-GP (47,7%). Os resultados foram organizados no software Microsoft Excel 2007-(Microsoft®), *p*-valor foi calculado pelo teste do qui-quadrado. O estudo foi aprovado pelo COREA-HUM/COPEP-UEM (CAAE 63610816.0.0000.0104). **Resultados:** A principal espécie encontrada foi o *Staphylococcus aureus* (43%) seguido de *Staphylococcus epidermidis* (21%) e *Enterococcus faecalis* (11%). Quanto à adequação do antimicrobiano no tratamento da ICS, verificou-se que dos pacientes analisados, em 32% (N = 71) o antimicrobiano foi adequado ao laudo final da hemocultura. Para este grupo de pacientes a sobrevida ocorreu em 50 pacientes (70,5%) e 21 (29,5%) faleceram. Para 78 pacientes (35,9%) o tratamento não foi adequado e, neste caso, 47% foram a óbito. Um total de 12,4% faleceu ou recebeu alta antes do resultado da hemocultura e em 18,9% dos casos os dados foram inconclusivos. A terapia adequada foi significativamente relevante ($p=0,025$) para a sobrevida dos pacientes. **Conclusão:** Os resultados demonstram a importância do laudo laboratorial da hemocultura no tratamento do paciente, pois a partir dele pode-se adequar o uso do antimicrobiano reduzindo as taxas de morbimortalidade.

Palavras-chave: Hemocultura; Bactérias gram-positivas; Antimicrobianos.

Área temática: Microbiologia

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PHOTODYNAMIC THERAPY MEDIATED BY HYPERICIN IN P-123 ON CLINICAL ISOLATE OF *Trichophyton rubrum*

Juliana Aparecida Fernandes¹, Pollyanna Cristina Vincenzi Conrado², Bárbara Cipulo Legabão¹, Renato Sonchini Gonçalves³, Érika Seki Kioshima Cotica⁴, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁴.

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

²Graduate student (Doctorate degree), Program of Bioscience and Physiopathology, State University of Maringá, Maringá-PR

³Professor Doctor, Department of chemistry, State University of Maringá, Maringá-PR

⁴Professor Doctor, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá-PR.

Introduction: The photodynamic therapy (PDT) is a method based on the use of a photosensitizer compound that is activated by the exposure to visible light in specific wavelength. The PDT has become a valuable strategy to improve an alternative therapeutic instead of the traditional antifungals. Besides the local application of the light induced by PDT, different morphological structures surrounded receives the effect of ionizing radiations, reducing the risk of a fungus develop resistance. In this context, the Hipericin (Hy) has been shown to be a good PS, which permeabilizes the lipid bilayer of the fungal cell membrane with ease, able to penetrate both microconidia and hyphae structures of the filamentous fungus, which demonstrates clinical relevance of using in PDT in different areas of medical mycology.

Objective: The aim of this work is to evaluate the antifungal activity of P123-Hy-PDT on the *Trichophyton rubrum*. **Material and methods:** The PDT has been performed with a clinical isolate from *T. rubrum* 1,0x10⁶ conidia/mL, and hipericin-P123 was tested at concentrations of (50 µmol to 0,09 µmol). The plate was incubated for 2 hours (dark) and it was irradiated with LED (440-460nm) at 9,0 mw/cm² at 20min, representing a fluency of 10,79 J/cm². Subsequently, the samples were plated on Agar Sabouraud Dextrose and incubated at 37°C for 7 days for evaluation of the minimum fungicidal concentration. The result was compared with a control without action of PDT, and statistically analyzed with *test t* of Student. **Results:** It was possible to assess the P123-Hy-PDT was able to have fungicidal action at the concentration of 0,78 µmol (p<0.05). **Conclusion:** Although preliminary, these results indicates that P123-Hy-PDT activity at low concentrations of hypericin are able to photoinactivate the species of *T. rubrum*, which is an important fungus in cases of dermatophytosis.

Keywords: Photodynamic therapy; Hipericin; *Trichophyton*.

Financial support: CAPES and CNPq,424262/2018-5.

Thematic area: Microbiology.

TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE: REVISÃO SISTEMÁTICA

Bárbara Cipulo Legabão¹; Juliana Aparecida Fernandes¹; Gabriela Franco de Oliveira Barbosa²; Terezinha Inez Estivalet Svidzinski³; Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça³

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

²Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

Introdução: A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungo do gênero *Sporothrix*. Apesar do aumento do número de casos nos últimos anos, o tratamento antifúngico é ainda limitado. Recentemente, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como alternativa para o tratamento desta micose. **Objetivo:** Fazer uma revisão sistematizada para o conhecimento sobre a eficácia da TFD no contexto da fotoinativação das espécies de *Sporothrix* por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. **Material e métodos:** Foi realizada uma busca eletrônica sistematizada conduzida em duas bases de dados: *Web of Science (WOS)* e *Pubmed*. A estratégia de pesquisa utilizada incluiu dois blocos: um relacionado à terapêutica da esporotricose e o outro relacionado ao tratamento fotodinâmico. No *Pubmed* foram utilizados os *Mesh Terms* ((*Sporothrix*) OR (*Sporotrichosis*)) AND (*Therapeutics*) no primeiro bloco. Para o segundo bloco, foram inseridos os *Mesh terms* (*Antifungal agents*) AND ((*Photochemotherapy*) OR (*Photosensitizing agents*)). Após essa etapa, foi feito o cruzamento dos dois blocos. No *WOS* foi utilizado o *Field Tag Ti=Title*, considerando a seguinte estratégia: primeiro bloco ((*Sporothrix*) OR (*Sporotrichosis*)) AND ((*Therapy*) OR (*treatment*) OR (*inactivation*)). No segundo bloco (*Photodynamic therapy* OR *Photodynamic inactivation*) AND (*in vivo* OR *in vitro*). A partir disso, foi realizado o cruzamento entre os dois blocos. Foram excluídos os artigos que estavam duplicados em ambas as bases de dados, revisões e os que não foram publicados no período de 2010 a 2020. **Resultados:** Foram selecionados seis artigos originais que relataram importante remissão clínica e/ou micológica em humanos e animais. Os fotossensibilizadores azul de metileno, ácido aminolevulínico e seu derivado metil, ácido metil aminolevulínico foram capazes de provocar inativação das formas infectantes e parasitárias das espécies de *Sporothrix* spp. **Conclusão:** Apesar de preliminares, os resultados obtidos mostraram que a TFD pode ser promissora para a esporotricose.

Palavras-chave: Esporotricose; Tratamento; Terapia fotodinâmica.

Financiador (es): Capes.

Área temática: Microbiologia.

BIOFILME MISTO POR LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTE COM ONICOMICOSE

Alana Salvador¹, Flávia Franco Veiga², Melyssa Negri³

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

Introdução: Onicomicose é uma infecção crônica causada por fungos nas unhas, acometidas principalmente por dermatófitos, seguidos por leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. Atualmente, a etiopatogenia dessa micose está associada à formação de biofilme na unha, esse fato pode estar associado à dificuldade de tratamento, reinfecções e cronicidade da lesão. Neste contexto, é importante ressaltar que leveduras *Exophiala dermatitidis* e *Candida parapsilosis* são capazes de formar biofilme em diferentes superfícies, além de serem potenciais agentes da onicomicose, sendo que a última tem grande impacto epidemiológico. **Objetivo:** Avaliar a capacidade de formação de biofilme misto entre as leveduras *E. dermatitidis* e *C. parapsilosis*. **Material e métodos:** As leveduras foram isoladas de paciente com onicomicose de acordo com o comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá, aprovada no número 615.643/2014. A formação de biofilme foi realizada *in vitro* e avaliado a cada 24h em um período total de 72h (24h, 48h e 72h). A quantificação do biofilme se deu a partir do número de fungos cultiváveis em unidades formadoras de colônia (UFC); quantificação da biomassa do biofilme total por método de coloração cristal violeta (CV) e atividade metabólica por ensaio de redução do sal tetrazólio (XTT). **Resultados:** O UFC manteve-se estável durante o período para ambas as espécies. CV reduziu em 48 h, aumentando novamente no terceiro dia (2,307; 1,19403; 3,42985 ABS₆₂₀) enquanto XTT demonstrou aumento constante ao decorrer do tempo (0,06866; 0,50746; 0,82388 ABS₄₉₂). **Conclusão:** As leveduras foram capazes de formar biofilme em cooperação, com número de células constante e atividade metabólica aumentando, a estabilidade da biomassa total varia em decorrência do estágio de maturação do biofilme ao longo dos tempos.

Palavras-chave: Biofilme; Levedura negra; *Candida parapsilosis*.

Financiador (es): CAPES, CNPq, Fundação Araucária.

Área temática: Microbiologia.

RECOMBINANT PROTEIN OF THIOREDOXIN SYSTEMS FROM *Aspergillus fumigatus*

Vitória Monteiro de Araújo Vilela¹; Maria Eduarda Gobara de Moura¹; Karina Mayumi Sakita²; Franciele Abigail Vilugron Rodrigues Vendramini³; Isis Regina Capoci⁴; Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁴; Érika Seki Kioshima⁴

¹Undergraduate student in Biomedicine – Group of Technologies Applied to Fungal Infections, State University of Maringá, Maringá-PR.

²Postgraduate student (PhD degree) in Biosciences and Physiopathology, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

³Technological and Industrial Development Scholarship (DTI-2), Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

⁵Teacher – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

Introduction: The treatment of invasive fungal infections has several limitations regarding the limited arsenal of antifungal agents associated with adverse effects. Then, new antifungals agents are imperative. The flavoenzyme thioredoxin reductase (TRR1) is a promising drug target, which is part of a complex system known as thioredoxin, whose protection of cells against oxidative stress. **Aim:** To optimize the heterologous expression of thioredoxin reductase (AfTrr1p) and thioredoxin (AftrxAp) from *Aspergillus fumigatus*. **Material and methods:** To construct the plasmid, the gene was chemically synthesized using preferential codon from *Escherichia coli* and cloned into pET21a vector (Novagen). The expression of proteins was performed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) system. Three media were tested using the small-scale expression method: Luria Bertani (LB), Terrific Broth (TB) and 4YT medium. These cultures were incubated at 220 RPM and 37°C until OD600 = 0.4 to 0.6. and Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (1 mM) was added. Then, two induction temperatures were tested: at 30°C and 37°C to 220RPM. The different induction times were collected: 0h, 1h, 2h, 4h, 6h and 18h. The bacterial pellet of all time was collected and resuspended with SDS-PAGE protein sample buffer (2x). These proteins were boiled at 100°C for 5 minutes and analyzed by SDS-PAGE. **Results:** The TB medium at 37°C showed the best induction condition for both proteins (AfTrr1p and AftrxAp). While at 30°C the ideal medium for AfTrr1p was TB and for AftrxAp it was LB. **Conclusion:** Induction optimization is important for working with recombinant proteins. The best conditions are important to continue experiments and characterization of this new therapeutic target.

Keywords: Recombinant protein; *Aspergillus*; Thioredoxin.

Financier: CNPq.

Thematic areas: Microbiology.

CO-INFECÇÃO BACTERIANA EM PACIENTES COM COVID-19: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Gabriel de Moraes Borges¹; Francine Maery Dias Ferreira-Romanichen²

¹Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Centro Universitário Ingá - UNINGÁ

²Docente - Centro Universitário Ingá - UNINGÁ

Introdução: O indivíduo com COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, pode apresentar sintomas semelhantes aos da gripe. Sobretudo, o agravamento dos quadros pode ocasionar lesões pulmonares graves e subsequente insuficiência de múltiplos órgãos. Em pandemias de gripe anteriores, como da influenza, as co-infecções foram associadas a uma maior gravidade da doença, maior uso de recursos de saúde e maior risco de morte. Esta correlação, ainda não é tão clara no que se refere ao SARS-CoV-2, uma vez que os demais coronavírus não apresentam taxas tão relevantes de co-infecção bacteriana. **Objetivo:** identificar padrões microbiológicos em indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2, em busca de quais bactérias apresentam maior incidência de co-infecção, através de uma revisão sistemática. **Material e métodos:** foi realizado um levantamento de trabalhos selecionados nas bases de dados LILACS, Medline (Pubmed) e ScienceDirect, para extrair aqueles que possuíam relatos relacionados à co-infecções bacterianas de pacientes, simultaneamente infectados pelo SARS-CoV-2, publicados de abril de 2020 a maio de 2021. **Resultados:** Foram encontrados 762 trabalhos a partir dos descritores: / "COVID-19"; "co-infection"; "bacteria" /. Dos quais, 26 foram incluídos. A causa mais frequente das exclusões, foram referentes a ausência de dados de co-infecção. As bactérias mais frequentemente identificadas entre os pacientes co-infectados foram *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*. O último em questão, é uma causa frequente de co-infecção em outras infecções respiratórias, como na gripe. Além destas, *Klebsiella pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* foram alguns dos frequentes patógenos relatados. *Acinetobacter* spp., foi o gênero de bactérias mais recorrente em pacientes que necessitam de ventilação mecânica invasiva em terapia intensiva. **Conclusão:** Deste modo, as co-infecções estão presentes em pacientes hospitalizados pela COVID-19 e apresentam agravo no quadro clínico. Contudo, a incidência de co-infecção é inferior às demais infecções virais respiratórias como da influenza, embora, os microrganismos mais recorrentes sejam os mesmos.

Palavras-chave: Co-infecção; COVID-19; Bactéria.

Área temática: Microbiologia.

SELEÇÃO DE EPÍTOPOS PARA DIAGNÓSTICO DA COVID-19 E REAÇÕES CRUZADAS

Rafaela Daleffe Pepino¹; Amauri Donadon Leal Junior²; Érika Seki Kioshima³;

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

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

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

Introdução: A pandemia do coronavírus, responsável por causar uma síndrome respiratória aguda grave, derivada do vírus SARS-CoV-2, surgiu em dezembro de 2019 causando uma grave crise da saúde pública se espalhando globalmente. Até o momento, vacinas vêm sendo produzidas e aplicadas. No entanto, vários casos ainda continuam acontecendo mesmo em países, cuja taxa de vacinados é elevada, indicando que a necessidade de testes de diagnóstico ainda será uma demanda presente. Adicionalmente, o Brasil ainda vive uma situação descontrolada e com a possibilidade de reações cruzadas com outros arbovírus endêmicos como é o caso dos arbovírus Dengue, Zika e Chikungunya. **Objetivo:** Identificar epítomos imunodominantes na glicoproteína S e N a fim de desenvolver quimeras, por meio de ferramentas biotecnológicas, para uso em kit de diagnóstico, que deverão catalisar o processo e torná-lo mais específico, simples, rápido e seguro. **Material e métodos:** As sequências de aminoácidos das proteínas S e N do SARS-CoV-2, Dengue (quatro sorotipos), Zika e Chikungunya depositadas na plataforma UniProt foram analisadas para identificar regiões de baixa identidade. Uma análise tridimensional foi realizada para avaliar a exposição destas regiões na partícula viral para selecionar os melhores epítomos. A especificidade, sensibilidade e dobramento das quimeras das regiões selecionadas foram avaliadas com auxílio da bioinformática nas plataformas UniProt e VMD (Visual Molecular Dynamics). **Resultados:** A busca das sequências através do BLAST e UniProt permitiu a identificação de seis epítomos da proteína S e cinco da proteína N que poderão contribuir com o desenvolvimento de vacinas ou diagnósticos mais específicos para o combate da Covid-19. **Conclusão:** As ferramentas *in silico* permitiram identificar epítomos expostos com baixo grau de identidade, possibilitarão a construção de uma quimera para o desenvolvimento de soluções em nível molecular, mais econômica, eficaz e específica.

Palavras-chave: Coronavírus; Expressão de proteínas; Bioinformática.

Financiador (es): CAPES/ CNPq

Área temática: Microbiologia

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO COMPOSTO SINTÉTICO LMM6

Maíra Dante Formagio¹; João Vitor de Oliveira Silva¹ Andreia Farias Pereira Batista²; Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá³; Isis Regina Grenier Capoci³; Érika Seki Kioshima Cotica³; Jane Martha Graton Mikcha³

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) Ciências de Alimento, Universidade Estadual de Maringá

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

Introdução: As doenças transmitidas por alimentos são um grave problema de saúde pública e um desafio à indústria alimentícia. Por isso, há uma necessidade da busca de novos compostos contra os patógenos de origem alimentar. O composto sintético LMM6 pertence à classe dos 1,3,4-oxadiazóis, e os derivados desta classe possuem um amplo espectro de atividades biológicas como antibacteriana, antituberculosa, antifúngica e antiviral. Dessa forma, LMM6 é um possível candidato com atividade antibacteriana e pode ser uma alternativa contra diferentes bactérias. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana da substância sintética LMM6 frente às diferentes cepas bacterianas. **Material e métodos:** Foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35128 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Listeria innocua* ATCC 33090. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo. Foram testadas concentrações de 1000 a 0,48 µg/ml. A suspensão padronizada do inóculo (aproximadamente 10⁶ UFC/mL) foi adicionada em cada poço. Após 24 h de incubação a 35 °C, a CIM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento de bactérias pela leitura visual. A concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada inoculando 10 µL de poços sem crescimento bacteriano, em meio de cultura específico para cada bactéria. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h e a MBC foi definida como a menor concentração de compostos nos quais não se visualizou crescimento bacteriano em placas de ágar. **Resultados:** LMM6 apresentou valor de CIM de 0,97 µg/ml para *S. aureus* e não inibiu o crescimento dos demais patógenos na maior concentração avaliada. Não foi observado efeito bactericida de LMM6 para nenhuma das cepas testadas. **Conclusão:** O composto LMM6 apresentou potencial antibacteriano apenas contra um patógeno de origem alimentar.

Palavras-chave: 1,3,4-oxadiazóis; Atividade antibacteriana; Composto sintético.

Financiador (es): CAPES.

Área temática: Microbiologia.

Morfologia

TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE REDUZ O PESO DO FÍGADO DE RATOS DE DIFERENTES IDADES SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA

Diogo Rodrigues Jimenes¹, Silvano Piovan², Fernanda Cândido³, Sara Suellen de Carvalho Oliveira⁴, Dêmis Roger da Silva⁵, Carmem Patrícia Barbosa⁶

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

²Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-Doutorado) em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Graduada em Biologia, Universidade Cesumar, Maringá/PR.

⁴Acadêmica de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Acadêmico de Graduação em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁶ Professora de Anatomia Humana do Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: O excesso de gordura na dieta, além de causar obesidade, pode favorecer o desenvolvimento de hiperinsulinemia que, por sua vez, predispõe aumento do conteúdo lipídico hepático, tornando o fígado mais gorduroso e mais pesado. Considerando que a obesidade tem se apresentado como um gravíssimo problema de saúde mundial, estudos têm sido realizados para melhor compreender seus diversos aspectos. Dentre eles, o modelo de dieta hiperlipídica (HFD) tem se destacado. Ademais, estudos recentes têm demonstrado o quanto a prática de exercícios físicos de alta intensidade é capaz de prevenir inúmeros males. **Objetivo:** Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de 8 semanas de Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT, do inglês) em esteira sobre o peso do fígado de ratos Wistar machos. **Material e métodos:** Os animais foram divididos em duas idades (7 e 9 meses), sendo cada idade subdividida em 4 grupos (n=10): GCT (grupo controle treinado alimentado com ração padrão), GCS (grupo controle sedentário alimentado com ração padrão), GT-HFD (grupo treinado alimentado com HFD) e GS-HFD (grupo sedentário alimentado com HFD). Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para remoção cirúrgica e pesagem do fígado. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UEM, sob parecer nº 5230050620. Dados com $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** Animais dos grupos GS-HFD de 7 e 9 meses de idade apresentaram maior peso do fígado quando comparados aos animais dos grupos GCS de 7 e 9 meses ($p < 0,05$). Em relação ao treinamento, observou-se menor peso do fígado no grupo GT-HFD7 quando comparado ao grupo GS-HFD7 ($p < 0,05$). **Conclusão:** A oferta da dieta HFD aumenta o peso do fígado de ratos Wistar com 7 e 9 meses de idade e o HIIT é eficaz na redução deste parâmetro em animais mais jovens.

Palavras-chave: Gordura hepática; Exercício; Obesidade.

Área temática: Morfologia.

IMPACT OF NEONATAL METFORMIN AND ADULTHOOD HIGH-FAT DIET ON FIBERS OF THE PROSTATIC EXTRACELLULAR MATRIX

Celso Vítor Alves Queiroz Calomeno¹; Henrique Rodrigues Vieira²; Julia Calvi Mori³, Paulo Cezar de Freitas Mathias⁴; Gessilda Alcantara Nogueira de Melo³, Jaqueline de Carvalho Rinaldi³.

¹Undergraduate Student in Biotechnology, State University of Maringá.

²Graduate Student in Biological Sciences, State University of Maringá.

³Graduate School a Master's Degree in Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá/PR in Biological Sciences State University of Maringá.

⁴Teacher in Genetics and Cell Biology - DBC, State University of Maringá, Department of Biotechnology, Maringá, PR, Brazil.

Introduction: The prostate is a good model to study the epithelial-stromal relationship, as its maintenance depends on this interaction. The stromal extracellular matrix (EM) is a complex structural network that surrounds and supports the epithelial compartment. Some studies suggest metabolic diseases such as diabetes and obesity can impair the EM organization. However, previous work has shown that metformin was able to reduce the damage triggered by obesity. **Objective:** In this sense, we investigated if the neonatal treatment with metformin could prevent the prostatic EM damage promoted by high-fat diet in adult rats. **Material and Methods:** Twelve dams (9 pups each) were distributed in two experimental groups: saline (S; 0.9% of NaCl/day) and metformin (M; 100mg/Kg/day). The male offspring received S or M daily via intraperitoneal injection until postnatal day 12 (PND). At postnatal day 60 (PND60) males were subdivided in normal fat diet (S-NFD and M-NFD; 4.5% fat) or high fat diet (S-HFD and M-HFD; 35% fat). The animals were euthanized at PND90 and the prostate ventral (VP) were dissected, weighed and used for EM analysis. Picrosirius-red, Gomori reticulin and Fucsin-resorcin were used to evidence the collagen, reticulin and elastic fibers respectively. A descriptive analysis was done to evaluate the prostatic EM status in all groups (Ethical Approval by CEUA/UEM 5869020418). **Results:** Collagen fibers were distributed throughout the stroma. Reticulin fibers showed a thick and undulated aspect located beneath the epithelium. Elastic fibers were between muscle cells underlying the secretory epithelium and around blood vessels. **Conclusion:** The preliminary data of this study revealed that neonatal exposure to metformin could prevent stromal EM damage promoted by a high-fat diet in adulthood. Quantitative data is needed to confirm these observations.

Key-words: collagen; histopathology; ventral prostate.

Financial Support: CNPq.

Area: Morphology.

HIPERTROFIA DOS NEURÔNIOS DO PLEXO PROSTÁTICO DE RATOS *WISTAR* ADMINISTRADOS COM 5-FLUOROURACIL

Letícia Ganem Rillo Paz Barateiro¹; Lainy Leiny de Lima²; Pedro Luiz Zonta de Freitas³; Lilian Catarim Fabiano⁴; Nilza Cristina Buttow⁵; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁵

¹Graduada em Biomedicina pela Universidade Estadual de Maringá

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

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) pelo Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular na Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

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

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

Introdução: A quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU) promove efeitos colaterais a diferentes órgãos, porém os dados são escassos. Como a atividade prostática é coordenada por estímulo hormonal e nervoso, faz-se importante estudar os impactos do 5-FU sobre a inervação autônoma da próstata.

Objetivo: Analisar a morfometria de neurônios do plexo prostático de ratos após administração de 5-FU. **Material e métodos:** Este estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (parecer: 4422140918). Dez ratos *Wistar* machos foram organizados em dois grupos (n=5): grupo controle (GC), administrado via intraperitoneal com solução fisiológica; grupo quimioterapia (G5-FU), administrado pela mesma via com 15 mg/kg de 5-FU por quatro dias seguidos, 6 mg/kg por mais quatro dias alternados e dose final de 15 mg/kg no 14^o dia experimental. A administração no GC ocorreu nos mesmos dias e no volume total ao qual foram iguais as doses do G5-FU. No 15^o dia, realizou-se a eutanásia de ambos os grupos. A próstata foi dissecada e processada histologicamente com inclusão em parafina. Cortes com 5 µm de espessura foram corados com Giemsa para a realização da morfometria de 100 neurônios/animais presentes no gânglio pélvico principal situado no lobo prostático dorsolateral. Por fim, realizou-se a estatística pelo teste *Mann Whitney* e os resultados foram expressos em média ± erro padrão. **Resultados:** As áreas do corpo neuronal (GC: 181,80 ± 3,66; G5-FU: 194,20 ± 3,66) e núcleo (GC: 67,51 ± 1,10; G5-FU: 77,04 ± 1,30) apresentaram-se significativamente (p<0,05) maiores no G5-FU, porém não houve diferença entre as áreas do citoplasma. Isso indica uma hipertrofia neuronal frente à quimioterapia empregada, o que pode interferir na atividade secretora prostática e, conseqüentemente, no sistema reprodutor como um todo. **Conclusão:** O 5-FU alterou a morfometria dos neurônios do plexo prostático de ratos *Wistar*.

Palavras-chave: Próstata; Inervação; Quimioterapia.

Financiador(es): CAPES, CNPq, Fundação Araucária.

Área temática: Morfologia

ANÁLISE DESCRITIVA DE ESTRUTURAS CELULARES DA ARTICULAÇÃO DE JOELHO SUBMETIDA A UM PROCESSO ACELERADO DE DESCALCIFICAÇÃO COM ETDA

Fernanda Candido¹, Diogo Rodrigues Jimenes², Dimitrius Leonardo Pitol³, Carmem Patrícia Barbosa⁴

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

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Educação Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia básica, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

⁴Professora de Anatomia Humana do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM), Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: A descalcificação é essencial para o processamento de tecidos ósseos em análises histológicas, principalmente no diagnóstico de doenças como câncer ósseo. Atualmente, um dos reagentes mais comumente usados como agente descalcificante é o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10%, pois preserva a morfologia e antigenicidade do tecido, mesmo sendo seu protocolo de uso lento, podendo demorar semanas. Pesquisadores da Universidade de São Paulo demonstraram que um novo método de descalcificação utilizando o EDTA (agente quelante) combinado aos ácidos clorídrico, tartarato de sódio e potássio, e tartarato de sódio (ETDA) foi hábil em descalcificar fêmures de ratos em apenas 24 horas. **Objetivo:** Neste contexto, este estudo objetivou avaliar qualitativamente a integridade morfológica da articulação do joelho de ratos Wistar descalcificadas mediante o uso de ETDA. **Material e Métodos:** Foram utilizadas 3 articulações do joelho de ratos machos de 7 meses de idade. Para tanto, após a eutanásia, as articulações foram retiradas e fixadas em solução formalina a 10% por 48hrs e descalcificadas pela solução de ETDA por 24hrs. Para a verificação da descalcificação, foi considerada a maleabilidade do tecido o qual deveria permitir a fácil transposição da agulha e a clivagem em 24 horas. Após a evidência de descalcificação, o material foi incluído em parafina, cortados em 6 µm e corados pelas técnicas de Hematoxilina/Eosina e imuno-histoquímica, marcador anti-CD61 (2F2). Vale destacar que os animais utilizados neste estudo pertenciam a um projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (EUA-UEM), sob parecer nº 5230050620. **Resultados:** Verificou-se que houve integridade estrutural histológica das articulações avaliadas com preservação de condrócitos, cartilagem articular e imunorreatividade. **Conclusão:** A utilização da solução descalcificadora ETDA acelerou o processo de descalcificação, sem comprometer a estrutura celular do tecido ósseo, o que torna esta técnica viável para acelerar a análise microscópica, principalmente em clínicas anatomopatológicas.

Palavras-chave: Histologia; Tecido ósseo; Agente descalcificante.

Área temática: Morfologia.

AÇÃO DO *Limonium brasiliense* NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL: ESTUDO HISTOLÓGICO

Ana Paula Fiorotto¹; Driele Fernanda Schneider²; Gislaine Stella Alves Amaral³; Cléverson de Oliveira e Silva⁵; João Carlos Palazzo de Mello⁶; Luzmarina Hernandez⁴

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

²Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

³Mestre em Odontologia Integrada -- Pós-Graduação em Odontologia Integrada, Universidade Estadual de Maringá

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

⁵Docente – Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá

⁶Docente – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A prevenção da doença periodontal é um grande desafio. *Limonium brasiliense* é uma planta natural da região sul do Brasil, tem ação bacteriostática, anti-inflamatória e antioxidante e não existem estudos *in vivo* avaliando seu efeito sobre a evolução da doença periodontal. **Objetivo:** Avaliar a ação do gel *L. brasiliense* na inibição da evolução da doença periodontal induzida em ratos. **Material e métodos:** Aprovado pelo comitê de ética CEUA/UEM (nº 8930141118), foram utilizados ratos Wistar machos com 65 dias. A doença periodontal foi induzida nos segundos molares superiores, por meio da colocação da ligadura de algodão. Os animais foram divididos em sete grupos de acordo com o tratamento: controle negativo, sem indução da doença; doença periodontal sem tratamento; doença tratada com clorexidina 0,12%; doença tratada com gel veículo; doença tratada com gel de *L. brasiliense* 0,5%, 1% e 2%. As aplicações dos géis foram realizadas com *microbrush* durante 1 minuto, 2x/dia durante 11 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e as maxilas coletadas, fixadas, processadas para inclusão em parafina e coradas com Hematoxilina e Eosina. A região periodontal foi analisada quanto à presença de inflamação, integridade das fibras transeptais e perda óssea alveolar. Os parâmetros de inflamação e perda óssea foram avaliados nas regiões mesial, distal e furca. Foram atribuídos escores para cada parâmetro analisado. **Resultados:** Os resultados mostraram que o tratamento com gel de *L. brasiliense* 1% evitou o desenvolvimento de inflamação intensa. A maior frequência de integridade das fibras transeptais foi observada no periodonto dos animais tratados com *L. brasiliense* 0,5%, 1% e naqueles animais sem qualquer tratamento. O osso alveolar apresentou menor destruição naqueles animais tratados com o gel de *L. brasiliense* a 1%. **Conclusão:** A concentração de *L. brasiliense* 1% apresentou melhores resultados na redução da evolução da doença periodontal.

Palavras-chave: Histologia, Doença periodontal, Fitoterapia.

Área temática: Morfologia

IMPACTOS DA SUPEREXPRESSION DA APOLIPOPROTEÍNA CIII HUMANA NA ALTURA EPITELIAL DA PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS C57BL/6

Mikaelly Kiemy Murai¹; Jairo Augusto Berti²; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo³, Jaqueline de Carvalho Rinaldi³

¹Acadêmica de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente – Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A apolipoproteína CIII (ApoCIII) modula a produção hepática de triglicerídeos, além de interferir na captação periférica inibindo a lipoproteína lipase (LPL), assim sua superexpressão contribui para o surgimento da hipertrigliceridemia. De acordo com a literatura, a dislipidemia nos camundongos com essa superexpressão pode estar associada à obesidade, esteatose hepática não alcoólica e aterosclerose. E esses desarranjos fisiológicos poderiam afetar a próstata, um dos principais órgãos do sistema reprodutor masculino. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da superexpressão da ApoCIII na altura epitelial da próstata de camundongos transgênicos de 6 e 12 meses. **Material e métodos:** Nesse estudo experimental, aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA/UEM nº6558180517), foram utilizados 26 camundongos machos da linhagem C57BL/6 provindos do biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Estadual de Maringá, separados em quatro grupos: camundongo transgênico (T6) e não transgênico (NT6) de 6 meses e camundongo transgênico (T12) e não transgênico (NT12) de 12 meses. A próstata foi dissecada, processada e emblocada em parafina. Cortes de 5µm foram corados com hematoxilina-eosina e suas imagens obtidas através do microscópio óptico foram utilizadas para a análise da altura epitelial por meio do software Image-Pro Plus®. Os resultados foram analisados por ANOVA One-way com teste post-hoc de Tukey. **Resultados:** Na análise comparativa entre os grupos, foi observado um aumento significativo da altura epitelial no T6 (12,4±0,1) em relação ao NT6 (10,2±0,1), porém esta diferença não permaneceu aos 12 meses (T12= 10,6±0,1 vs NT12= 11,1±0,1). Também constatou que a idade não interferiu neste parâmetro entre os grupos controle (NT6 vs NT12) mas afetou os animais transgênicos, já que promoveu redução significativa da altura epitelial entre estes animais (p=0,001). **Conclusão:** Os resultados preliminares deste trabalho sugerem que a superexpressão da ApoCIII interfere na altura epitelial prostática.

Palavras-chave: ApoCIII; Hipertrigliceridemia; Transgenicidade.

Área temática: Morfologia.

AVALIAÇÃO DE NEURÔNIOS NITRÉRGICOS DO PLEXO MIENTÉRICO DO JEJUNO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATADOS COM *Echinacea purpurea*

Henrique Cazanti Sona¹; Maria Jose Pastre²; Claudia Nara de Almeida Lino Bratti³; Lainy Leiny de Lima⁴; Aline Rosa Trevizan⁵; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁶

¹Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

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

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Doutora em Biologia das Interações Orgânicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Doutora em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A infecção por *Toxoplasma gondii* perturba a homeostase do intestino. Essa é uma infecção persistente, o que torna necessário buscar novos meios terapêuticos. Os neurônios nitrérgicos são considerados motores inibitórios e controlam o peristaltismo intestinal. **Objetivo:** Avaliar o número de neurônios nitrérgicos no plexo mientérico do jejuno de ratos infectados por *Toxoplasma gondii* e tratados com *Echinacea purpurea*. **Material e métodos:** O projeto foi aprovado pelo CEUA-UEM (n^o 7633021018). Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus*, Wistar, machos (n=6), distribuídos aleatoriamente em GC (Grupo controle), GI-NT (Grupo infectado e não tratado), GC-EP (Grupo não infectado e tratado) e GI-EP (Grupo infectado e tratado). Os animais do GC-EP e GI-EP foram tratados por via oral com 100 mg/kg de *Echinacea purpurea* por 28 dias antes e 28 dias depois da inoculação oral com 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH). Após a eutanásia, o jejuno foi coletado, fixado em paraformaldeído a 4% e embebido em parafina. Foram realizados cortes de 4 μ m, que foram desparafinizados, reidratados e sofreram recuperação antigênica. Os cortes foram expostos ao anticorpo primário anti-nNOS (concentração 1:400), foi adicionado um polímero conjugado com peroxidase e revelado pelo cromógeno diamino benzidina (DAB). Realizou-se a contra-coloração com hematoxilina de Meyer e foi montada a lâmina. Quantificou-se os neurônios nNOS-IR (neurônios imunorreativos a enzima óxido nítrico sintase neuronal) presentes em 50 gânglios mientéricos na objetiva de 40x. A comparação dos dados foi realizada por teste ANOVA no software GraphPad Prism 5.01. Nível de significância foi de 5%. **Resultados:** O GI-NT (2,833 \pm 0,2634 neurônios) e GI-EP (2,697 \pm 0,2954 neurônios) sofreram redução no número de neurônios nNOS/gânglio em comparação com GC (3,417 \pm 0,4428 neurônios). **Conclusão:** A infecção crônica por 500 oocistos de *T. gondii*, bem como o tratamento com 100 mg/kg de *E. purpurea* reduziram o número de neurônios nNOS-IR/gânglio mientérico no jejuno de ratos.

Palavras-chave: Óxido nítrico; Plexo nervoso entérico; intestino delgado.

Financiador (es): Capes.

Área temática: Morfologia.

A INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* NÃO ALTERA A POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS DA PRÓSTATA DE RATOS *WISTAR*

Larissa Ayumi Ussuda¹; Giovanna de Carvalho¹; Julia Calvi Mori²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁴; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁴

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita provocada pela infecção do *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar o ser humano e principalmente os felídeos. O protozoário é capaz de afetar sistemas importantes como o nervoso e o reprodutivo, porém, na literatura há escassez de detalhes sobre a relação do parasito com a próstata. Em resposta ao *T. gondii*, o sistema imune atua através das barreiras epiteliais, leucócitos, mastócitos (M) dentre outros. Os M são células sentinelas derivadas da medula óssea que possuem grânulos contendo mediadores químicos importantes no controle da resposta inflamatória. **Objetivo:** Avaliar o impacto da infecção crônica por *T. gondii* nos mastócitos prostáticos. **Material e métodos:** (CEUA/UEM – protocolo 7633021018). Ratos *Wistar* jovens foram divididos em Grupo Controle (GC, n=3) e Grupo Infectado (GI, n=3). Os animais infectados receberam 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) por gavagem. Após 28 dias de infecção os animais foram eutanasiados, a próstata ventral (PV) foi dissecada, processada e incluída em parafina. Lâminas com até 4 cortes de 5µm foram coradas com Azul de toluidina para a contagem dos mastócitos em microscópio óptico na objetiva de 40x (área 0,016mm²). Foram contados todos os mastócitos corados presentes em 20 campos microscópicos, sendo os dados expressos em número de mastócitos por mm² (média±desvio padrão). A análise estatística foi realizada no GraphPad Prisma® 5 usando o teste T (p<0,05). **Resultados:** Foram observados mastócitos no estroma prostático nos animais de ambos os grupos. A quantificação destas células não apresentou diferença significativa entre GC (45,00±14,00) e GI (50,67±2,08). **Conclusão:** Nossos resultados preliminares demonstram que a infecção crônica por *Toxoplasma gondii* não altera a quantidade e distribuição dos mastócitos na próstata ventral de ratos.

Palavras-chave: Toxoplasmose; Próstata ventral; Cepa RH.

Financiador (es): CAPES e CNPq.

Área temática: Morfologia.

A INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* PROMOVE ALTERAÇÕES EPITELIAIS NA PRÓSTATA DE RATOS *WISTAR*

Giovanna de Carvalho¹; Larissa Ayumi Ussuda¹; Julia Calvi Mori²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana³; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo⁴; Jaqueline de Carvalho Rinaldi⁴;

¹Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente - Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii* e afeta cerca de dois bilhões de pessoas no mundo. Esse protozoário intracelular obrigatório parasita diversos órgãos e tecidos, porém pouco se sabe sobre seus impactos no sistema reprodutor masculino. **Objetivo:** Investigar se a infecção crônica desencadeada por cepa virulenta de *T. gondii* altera a morfologia prostática em ratos jovens. **Material e métodos:** Para isso, oito ratos *Wistar* de 21 dias foram distribuídos em grupo Controle (GC, n=4) e grupo Infectado (GI, n=4) (CEUA/UEM - protocolo 7633021018). O GI recebeu 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) por gavagem. Após 28 dias de inoculação do parasito, os animais foram submetidos à eutanásia. A próstata dorsolateral foi dissecada, processada e incluída em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5µm com 3 cortes semi-seriados por lâmina. Em seguida, foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina para avaliação morfológica. **Resultados:** A análise comparativa demonstrou que a morfologia glandular e a organização estromal foram semelhantes entre os grupos. Contudo, no GI foi observado um intenso infiltrado inflamatório no estroma, além da presença de células epiteliais vacuolizadas e focos de hiperplasia no parênquima glandular. **Conclusão:** Nossos resultados preliminares mostraram que a infecção de 28 dias por *T. gondii* pode causar inflamação estromal e alterações epiteliais.

Palavras-chave: Próstata dorsolateral; Toxoplasmose; Inflamação.

Financiador (es): Capes; CNPq.

Área temática: Morfologia

EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DE TRÊS CUMARINAS ESTRUTURALMENTE RELACIONADAS EM UM MODELO DE PLEURISIA EM RATOS

Luana Eloisa Leal¹; Bruna Lopes Correia²; Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi³; Jurandir Fernando Comar³; Ciomar Aparecida Bersani-Amado⁴; Lívia Bracht^{3,4}

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Docente – Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: As cumarinas são uma classe de compostos fenólicos e dentre elas a 1,2-benzopirona, a umbeliferona e a esculetina, possuem efeitos anti-inflamatórios comprovados por estudos *in vivo*. Todavia, não existem trabalhos que tenham investigado os efeitos de cumarinas sobre a inflamação pulmonar ou pleural. **Objetivo:** Avaliar o efeito anti-inflamatório das cumarinas 1,2-benzopirona, umbeliferona e esculetina em um modelo de inflamação pleural aguda em ratos. **Material e métodos:** A pleurisia foi induzida em ratos Wistar, pela injeção de uma suspensão de carragenina na cavidade intra-pleural (CEUA/UEM nº. 3183190121). As cumarinas 1,2-benzopirona (20; 50; 100 e 200 mg/Kg), umbeliferona (200; 400 mg/Kg) e esculetina (400 mg/Kg) foram administradas por gavagem oral em dose única, uma hora antes da indução da pleurisia. Após 4 horas, os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta do exsudato inflamatório intra-pleural. O número de leucócitos totais foi determinado em câmara de Neubauer e para a contagem de mononucleares e polimorfonucleares foi utilizada a coloração de May-Grünwald-Giemsa. **Resultados:** O tratamento com 1,2-benzopirona reduziu de maneira dose-dependente o volume do exsudato inflamatório. A redução foi de 84%, 66% e 27% nas doses de 200, 100 e 50 mg/Kg, respectivamente. Adicionalmente, esta substância provocou uma redução expressiva e dose-dependente do recrutamento de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) para a cavidade pleural, sendo de 68% para polimorfonucleares e de 65% para mononucleares na dose de 200 mg/Kg. Os tratamentos com umbeliferona e esculetina na dose de 200 mg/Kg não foram capazes de reduzir o volume do exsudato inflamatório ou o recrutamento de leucócitos. Todavia, na dose de 400 mg/Kg, a umbeliferona reduziu significativamente o número de leucócitos presentes na cavidade pleural em 27%. **Conclusão:** Das três cumarinas avaliadas, a 1,2-benzopirona foi mais eficaz em reduzir a inflamação pleural nos animais.

Palavras-chave: 1,2-benzopirona; Esculetina; Umbeliferona.

Financiador (es): CAPES - CNPq.

Área temática: Farmacologia.

ALTERAÇÕES CAUSADAS PELA INFECÇÃO CRÔNICA POR *TOXOPLASMA GONDII* NA DISTRIBUIÇÃO DOS FOLÍCULOS OVARIANOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Vanessa de Brito Pereira¹; Gessilda de Alcantara Nogueira de Melo ²; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana²; Jaqueline de Carvalho Rinaldi²

¹Acadêmico Graduação em Ciências biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Docente Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: Um terço da população mundial apresenta a fase crônica da infecção pelo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) de forma assintomática podendo apresentar sequelas inclusive no sistema reprodutor de machos e fêmeas. **Objetivo:** Diante disso nosso objetivo é investigar se a infecção crônica por *T. gondii* influencia na morfologia e quantificação de folículos ovarianos em camundongos C57BL/6. **Material e métodos:** 16 fêmeas foram divididas em grupo controle (GC) (que receberam solução salina) e grupo infectado (GI), cujos animais receberam 1000 oocistos por gavagem. A eutanásia ocorreu por vapor de isoflurano após 60 dias de infecção. Foram selecionadas apenas as fêmeas em estro para realização da laparotomia vertical, no qual os ovários foram coletados, dissecados, pesados, processados e incluídos em parafina. Cortes de 5µm foram corados em Hematoxilina-eosina para análise da morfologia geral da gônada, quantificação total e diferencial dos folículos ovarianos, onde cada folículo do ovário foi quantificado e classificado, sendo identificados folículos primordiais primários, secundários, maduros, e em atresia, além de corpos lúteos e folículos degenerados. O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA/UEM sob nº 4092040517. **Resultados:** Houve um aumento (~32%) no número de folículos totais no ovário do GI em relação ao dos animais do GC. Na quantificação diferencial, observou-se que este aumento ocorreu pela maior quantidade de folículos primários (34%), secundários (12%) e antrais (30%) no ovário do GI. Em contrapartida, houve uma redução de 40% nos folículos primordiais, de 18% nos de Graaf, de 26% nos atrésicos, e 10% em corpos lúteos no GI em comparação ao GC. Nos animais infectados ainda houve a presença de folículos contendo a granulosa desorganizada e ovócitos degenerados. **Conclusão:** A infecção crônica por *T. gondii* causou alterações na morfologia e quantificação dos folículos ovarianos, o que pode justificar sequelas como aborto e instabilidade da placenta de pacientes portadores da doença.

Palavras-chave: Folículo ovariano; Toxoplasmose; Morfologia.

Área temática: Morfologia

IMPACT OF QUERCETIN-LOADED-MICROCAPSULES TREATMENT ON THE TOTAL LEUCOCYTE POPULATION OF THE JEJUNUM OF RATS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Lídia Rodrigues Cicero¹; Mariana Rodrigues Sanches², Fabiana Galvão da Motta Lima¹, Lucas Casagrande¹, Carla Cristina de Oliveira Bernardo¹, João Victor Kuller³, Maysa Pacheco Alvarez da Silva⁴, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles⁵, Jacqueline Nelisis Zanon⁵

¹Postgraduate student (Doctoral degree) in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

²Postgraduate student (Master degree) in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

³Graduate Student in Biotecnology, State University of Maringá/PR

⁴Graduate Student in Biological Sciences, State University of Maringá/PR

⁵Professor Doctor, Department of Morphological Sciences, State University of Maringá-PR, Maringá/PR

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory multisystemic disease. By causing severe systemic inflammation, possibly the population of leukocytes present in the intestine is altered during the development of the disease. The most common treatment for RA is the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that are related to adverse gastrointestinal effects. In this way, natural compounds have been researched as an alternative treatment for the disease, such as quercetin, a flavonoid with potential anti-inflammatory and antioxidant activities. This study aimed to evaluate the density of leukocytes in the jejunum mucosa of arthritic rats treated with quercetin-loaded-microcapsules. Thirty male Holtzman rats were used (CEUA-UEM protocol 4462180216) and divided in 5 groups with 6 animals each: C (control), control treated with quercetin (CQ), arthritic (AIA), arthritic treated with ibuprofen 17.5mg/kg (AI) and arthritic treated with quercetin-loaded microcapsules 10mg/kg (AQ). Arthritic animals were induced by intradermal administration of Freund's complete adjuvant. The experimental period lasted 60 days with daily treatments by gavage. After this period, the animals were euthanized, the jejunum was collected. The material was prepared to perform the immunohistochemical technique for labeling the total leukocyte population by the CD45 protein. The quantitative analysis was made using the software Image Pro® Plus 4.5 and the results were analyzed by the GraphPad Prism6 and Statistica8.0 programs. In comparison between arthritic group (AIA) and control, there was an increase of 30% ($p < 0.05$) in AIA. Both treatments with quercetin (AQ) and ibuprofen (AI) were able to reduce the density of intestinal total leukocytes by 24% ($p < 0.05$) compared to the AIA. With this analysis, it is concluded that the systemic manifestations caused by arthritis causes an inflammatory process in the intestine. Quercetin treatment was effective in reducing the density of CD45-immunoreactive total intestinal leukocytes, similar action to ibuprofen, reference drug used in the treatment of arthritis.

Keywords: Intestinal immune system; Rheumatoid arthritis; Quercetin.

Thematic area: Morphology.

Neurociências

ALTERATIONS IN PERINEURONAL NET IN EXTRINSIC INNERVATION OF MICE DISTAL COLON IN CHRONIC ULCERATIVE COLITIS

Matheus Deroco Veloso da Silva¹; Camila Regina Basso¹; Larissa da Silva Bonassa²; Fábio Goulart de Andrade³; Debora de Mello Gonçalves Sant' Ana⁴; Rubina Aktar⁵; L. Ashley Blackshaw⁶; Eduardo José de Almeida Araújo⁷

¹ PhD Student in Experimental Pathology Enteric Neuroscience Laboratory, State University of Londrina, Londrina/PR

² Graduate Student in Biomedicine, Enteric Neuroscience Laboratory, State University of Londrina, Londrina/PR

³ Professor – Department of Histology, Laboratory of Histopathological Analysis, State University of Londrina

⁴ Post-doctoral student in Neuroscience, Enteric Neuroscience Laboratory, Queen Mary University of London, London/UK

⁵ Professor – Department of Morphological Sciences, Enteric Neuroscience Laboratory, State University of Maringá

⁶ Professor – Department of Neurogastroenterology, Enteric Neuroscience Laboratory, Queen Mary University of London, London/UK

⁷ Professor – Department of Histology, Enteric Neuroscience Laboratory, State University of Londrina

Introduction: In the central nervous system, the extracellular matrix can acquire specific components forming the perineuronal net (PNN). PNN controls neuronal plasticity and it can play a neuroprotective role in inflammatory situations. There are no reports of PNN in extrinsic colonic innervation during chronic ulcerative colitis (UC). **Objective:** Evaluate the PNN in the extrinsic innervation of mice distal colon with UC. **Material and methods:** Chronic UC (UC group) was induced in five C57/BL6 mice (Approved by CEUA UEL N^o 032/2015) exposed to 3 cycles of 5 days of dextran sodium sulfate 3% (DSS), interlaced 2 cycles of 5 days with pure water. The control group (CG; n = 5) received only autoclaved water during the same period. After the euthanasia, the dorsal root ganglia (L6/S1), the respective splanic nerves and the mesocolon were collected. The tissues were subjected to histoimmunofluorescence using anti-peripherin c-19 and Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA). The images are captured using confocal microscope. A thousand neurons and their prolongments were analysed using the ImageJ, and LeicaX software. Data were submitted to the Shapiro-Wilk test followed by the Student T Test. **Results:** 927.8 (SD 12.9) neurons in CG were positive for PNN and occupied 94.5% (SD 1.0) of the analysed area, while in the UC group the number of PNN+ neurons was 997.2 (SD 2.8) which occupied 99.78% (SD 0.2). Regarding the PNN+ prolongments in the splanic nerves, it was found 942.0 (SD 23.8) in the UC group vs. 831.5 (SD 41.4) in the CG. In all comparisons cited we found P<0.05. By using a graphic reconstruction from Z-stack section images, a denser PNN was observed in all extrinsic innervation of the inflamed distal colon in relation to the controls. **Conclusion:** The DSS-induced UC increases the production of PNN elements in the extrinsic innervation of the mice distal colon.

Key-words: Extracellular matrix; Innervation; Plasticity.

Acknowledgment: CNPq

Tematic area: Neuroscience

Parasitologia

PREVALENCE STUDY OF *Giardia duodenalis* IN DOMESTIC DOGS FROM A RECREATIONAL CENTER FOR ANIMALS, MARINGÁ-PR

Liana Izabela Lopes Romera¹; Renata Coltro Bezagio²; Lais de Fátima Contessotto³; Caroline Rodrigues de Almeida¹; Mônica Lúcia Gomes⁴

¹Graduate Student (Doctorate) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

²Doctor in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

³Pharmacist, State University of Maringá, Maringá/PR

⁴Professor – Department of Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

Introduction: Dogs are natural reservoirs for several zoonotic pathogens. As these animals increasingly share the same environment with humans, there is greater potential for these pathogens to spread. Among them, the protozoan *Giardia duodenalis* stands out, with a prevalence ranging from 10 to 20% in adult animals in Brazil. In dogs, the infection is commonly associated with diarrhea, but in children, that end up establishing a great bond with the animals, it can cause growth retardation and intellectual development. **Objective:** To detect *G. duodenalis*, by parasitological and molecular methods, in pet dogs attending a Recreation Center for animals in Maringá/PR. **Material and methods:** Forty samples of dog feces were collected individually, processed by Faust's methods to visualize the cysts through optical microscopy, and by Ritchie's for DNA extraction and subsequent molecular analysis by Polymerase Chain Reaction (PCR), with amplification of an approximately 432 base pair fragment of the glutamate dehydrogenase (gdh) gene and visualization on a polyacrylamide gel stained with silver salts. **Results:** Of the 40 (100%) samples, 5 (12.5%) were positive for some kind of enteroparasite. Of these, 4 (10%) were positive for *G. duodenalis*, 1 (2.5%) positive for *Ancylostoma* spp and 1 (2.5%) had polyparasitism: *Ancylostoma* spp. and *G. duodenalis*. The molecular method confirmed the results of the parasitological, obtaining agreement between the two methods used. **Conclusion:** It is concluded that the prevalence of *G. duodenalis* in dogs that attend this Recreation Center, when compared to the average prevalence in Brazil, is high. This is an indication of the need to implement hygienic and sanitary measures in order to avoid dissemination or reinfection, and socio-educational measures with tutors, highlighting the importance of diagnosis, immunization and treatment of dogs, since the transmission of the parasite occurs with ease, it is a zoonotic pathogen and there is extensive human-animal contact.

Palavras-chave: Giardiasis; PCR; Parasitological.

Financing: This work was carried out with the support of the Coordination for the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES) - Brazil - Financing Code 001.

Área temática: Parasitology.

ANÁLISE DO NÚMERO DE NEURÔNIOS nNOS IMUNORREATIVOS NO PLEXO MIEONTÉRICO DO DUODENO DE *Rattus norvegicus* SUBMETIDOS A INFECÇÃO CRÔNICA POR *Toxoplasma gondii* E TRATADOS COM *Echinacea purpúrea*

Bruna Micheli Amaral Oliveira¹; Mariana Buranelo²; Maria José Pastre³; Henrique Cazanti Sona⁴; Aline Rosa Trevizan⁵; Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁶.

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

³Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmico de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A infecção por *Toxoplasma gondii* ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contendo oocistos que transpõe a barreira intestinal e causam inflamação. O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor que atua na motilidade intestinal. A *Echinacea purpurea* apresenta ação anti-inflamatória. **Objetivo:** Analisar o número de neurônios nNOS imunorreativos (nNOS-IR) no plexo miontérico do duodeno de *Rattus norvegicus* submetidos a infecção crônica por *T. gondii* e tratados com *Echinacea purpurea*. **Material e métodos:** O experimento foi aprovado pelo CEUA-UEM (nº 7633021018). Utilizamos 24 *Rattus norvegicus* machos (n=6) distribuídos em GC (grupo controle), GI-NT (grupo infectado e não tratado), GC-EP (grupo não infectado e tratado) e GI-EP (grupo infectado e tratado). Cada rato dos grupos infectados recebeu por via oral 500 oocistos esporulados de *T. gondii* (cepa RH, genótipo I) ressuspensos em solução salina estéril. Os grupos GC-EP e GI-EP foram tratados por via oral com 100 mg/kg de *Echinacea purpurea* por 28 dias antes e 28 dias após a infecção por *T. gondii*. Os ratos foram submetidos a eutanásia e os duodenos coletados. Foi realizado o processamento histológico e obtidos cortes de 4 µm que foram submetidos a técnica imunohistoquímica de nNOS (Invitrogen®, REF: 372800) para marcação de neurônios imunorreativos a enzima óxido nítrico sintase neuronal, os quais foram quantificados em 35 gânglios miontéricos em microscópio óptico na objetiva de 40x. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 5.01. Nível de significância foi de 5%. **Resultados:** Houve aumento no número de neurônios no GI-NT (3,99±0,22 neurônios/gânglio), GC-EP (4,80±0,36 neurônios/gânglio) e GI-EP (5,19±0,49 neurônios/gânglio) em relação ao GC (3,09±0,36 neurônios/gânglio) e nos grupos GC-EP e GI-EP comparados ao GI-NT. **Conclusão:** A infecção crônica por *T. gondii* e o tratamento com a *Echinacea purpurea* aumenta o número de neurônios nNOS-IR no plexo miontérico do duodeno de *Rattus norvegicus*.

Palavras-chave: Óxido nítrico; Toxoplasmose; Sistema nervoso entérico.

Financiador (es): Capes e Cnpq

Área temática: Parasitologia

ROSUVASTATINA REVERTE O DÉFICIT DE MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA ME-49 CRÔNICA DE *TOXOPLASMA GONDII*

Fernanda Ferreira Evangelista¹, Willian Costa-Ferreira², Francini Martini Mantelo³, Lucimara Fátima Beletini⁴, Amanda Hinobu de Souza⁵, Priscilla de Laet Sant'Ana⁵, Keller Karla de Lima⁶, Carlos Cesar Crestani⁸, Ana Lúcia Falavigna-Guilherme⁹

¹ Doutoranda no Programa Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

² Doutorando na Escola de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

³ Mestranda no Programa Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

⁴ Farmacêutica, mestre pelo Programa Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

⁵ Mestranda no Programa de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

⁶ Residente de Enfermagem Obstétrica da Autoridade de Saúde Municipal de Apucarana, Apucarana, PR, Brasil

⁷ Professor Colaborador no Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

⁸ Professor na Escola de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

⁹ Professor no Programa Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

Introdução: Em humanos e roedores, o principal órgão de acometimento pelo protozoário *Toxoplasma gondii* é o sistema nervoso central (SNC), o que tem levado muitos a investigar como essa infecção persistente no SNC pode influenciar o comportamento e doenças neurodegenerativas. **Objetivo:** Investigar o efeito do tratamento com rosuvastatina no comprometimento cerebral e na memória de camundongos infectados com a cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*. **Métodos:** Camundongos Balb/C foram infectados via oral, com a cepa ME-49 crônica de *Toxoplasma gondii* e separados em quatro grupos: G1 (Infectado e não tratado), G2 (Infectado e tratado), G3 (Não infectado e tratado), G4 (Controle negativo). O tratamento com rosuvastatina (40 mg/kg/dia) começou no 51^o dia pós-infecção e durou 21 dias. Após o tratamento, foi usado o teste de reconhecimento de objeto novo (NOR) para avaliação da memória de curto e longo prazo e analisado pelo software X-PIoRat. Após, os animais foram eutanasiados e coletou-se os cérebros para quantificação de DNA do parasito e análise histopatológica. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism, utilizando ANOVA com $P < 0,05$ considerado significativo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (n.5654290317). **Resultados:** A infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos prejudicou a memória de curto e longo prazo ($P < 0,0001$) e o tratamento com rosuvastatina reverteu este efeito ($P < 0,0001$). Além disso, a rosuvastatina reduziu a carga parasitária no cérebro destes animais ($P < 0,0001$) e atenuou os sinais de inflamação. **Conclusão:** Nesse sentido, nossos achados fornecem evidências da capacidade do tratamento com rosuvastatina em reverter o comprometimento da memória e a importância da pesquisa de fármacos que possam atuar na fase crônica da toxoplasmose. Assim, a rosuvastatina pode ser uma opção de droga anti- *Toxoplasma*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Rosuvastatina; Memória.

Financiador (es): Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na forma de bolsa concedida ao WCF e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) na forma de bolsas concedidas à FFE, FMM, LFB e AHdS.

Área temática: Parasitology.

INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* ALTERA QUANTITATIVAMENTE AS CÉLULAS PRODUTORAS DE SULFOMUCINAS DO DUODENO DE HAMSTERS

Maria Gabriela Lima da Silva¹; Amanda Gubert Alves dos Santos²; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes³; Thaís Gomes Verzignassi Silveira³; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁴; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo³

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

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

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

⁴Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

Introdução: A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é apontada como agente de alterações no intestino. No epitélio intestinal as células caliciformes são responsáveis por produzir diferentes tipos de mucinas. Estas formam o muco que lubrifica e protege o epitélio contra agentes químicos e microbianos. **Objetivo:** Avaliar a infecção por cepa de *L. (V.) braziliensis* pode ocasionar alterações quantitativas nas células produtoras de mucinas no duodeno de hamsters. **Material e métodos:** O Comitê de Ética para Experimentação da UEM aprovou este trabalho (7587260416). Utilizamos 16 hamsters dourados que foram distribuídos em quatro diferentes grupos (n = 4): dois grupos controles não infectados e dois grupos infectados com a cepa MHOM/BR/2000/1655 da espécie *L. (V.) braziliensis*. A eutanásia foi realizada após 90 dias ou 120 dias de infecção e foi coletado 1 cm do duodeno para histologia. Obtivemos cortes transversais semi-seriados de 5µm que foram corados pela técnica de Alcian Blue pH 1,0, Alcian Blue pH 2,5 e ácido periódico-Schiff (PAS) para contagem de células produtoras de sulfomucinas, sialomucinas e mucinas neutras, respectivamente. Foram contadas 2560 células do epitélio intestinal e as células caliciformes presentes entre elas e, posteriormente foi calculada a proporção de células caliciformes/100 células epiteliais. Os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. ANOVA (two way) foi usado para a análise de variância seguido de teste de Tukey. O intervalo de confiança foi de 95% ($p < 0,05$). **Resultados:** Aos 90 dias de infecção, houve diminuição nas células marcadas por Alcian Blue pH 1,0 no duodeno no grupo infectado ($1655: 5,078 \pm 0,773/100$ células epiteliais) quando comparado ao controle ($8,467 \pm 2,07/100$ células epiteliais) e não tiveram alterações significativas no número de células caliciformes nas outras colorações. **Conclusão:** A diminuição na proporção de células caliciformes produtoras de sulfomucinas pode estar relacionado a uma adaptação da mucosa ao desequilíbrio causado pela infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose; Duodeno; Células caliciformes.

Financiador (es): CNPq e CAPES.

Área temática: Parasitologia.

ELIMINATION OF *Giardia muris* IN NATURALLY INFECTED MURINE EXPERIMENTAL MODEL: COMPLEMENTARY TREATMENT

Caroline Rodrigues de Almeida¹; Renata Coltro Bezagio²; Liara Izabela Lopes Romera¹; Mônica Lúcia Gomes³

¹Graduate Student (Doctorate) in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

²Doctor in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

³Professor – Department of Health Sciences, State University of Maringá, Maringá/PR

Introduction: *Giardia muris* is a flagellated protozoan that frequently affects the gastrointestinal tract of rodents from experimental bioterries. This parasite can cause severe inflammatory response in the intestinal mucosa, weight loss, abdominal distension and other clinical signs. **Objective:** This study proposed alternative and complementary treatment for murine giardiasis by comparing Black tea (CPR) (*Camellia sinensis*) with Metronidazole (MT), Fembendazole (FB) and Metronidazole in association with Sulfadimetoxin (Mts) **Material and methods:** Swiss male mice (30) were divided into six groups (RCP, MT, FB/MT, Mts, RCP/Mts and Untreated Control - C+) with five animals each. The treatment was intragastric, for 7 days 1x/day and group C+ received only water. The experiments were performed blindly, controlled, randomized and repeated once with the same number of animals. Clinical parameters (weight, water consumption, feed and excreta elimination) were also evaluated and analyzed statistically by the Statistica Single User Software version 13.2. According to the approval of CEU/EMU No 9375170816. **Results:** The animals of the CPR/Mts and Mts groups and of the CPR group presented negative parasitological and molecular results for *G. muris* on the 5th and 7th day after starting treatment, respectively. The animals of the FB/MT, MT and C+ groups continued to eliminate cysts after the end of treatment. The animals of group C+ presented significant weight loss in relation to the animals of the other groups and consumed less amount of feed ($p=0.0001$) in relation to the animals of groups CPR/Mts, FB/MT and MT. **Conclusion:** The complementary treatment with black tea alone or associated with Mts was effective in eliminating *G. muris*, being a promising strategy for murine experimental model. The untreated animals that maintained high parasitic load presented significant changes in the clinical parameters, showing the importance of eliminating pre-existing infection and increasing the reliability of the results of the experiments that use these animals.

Keywords: Giardiasis; *Camellia sinensis*; Mice.

Financing: This work was carried out with the support of the Coordination for the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES) - Brazil - Financing Code 001.

Thematic area: Parasitology.

CONTAGEM DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NO DUODENO DE HAMSTERS INFECTADOS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Larissa Leiko Yamada¹; Isabela Alessandra Mariano²; Maria Gabriela Lima da Silva³; Amanda Gubert Alves dos Santos⁴; Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes⁵; Thaís Gomes Verzignassi Silveira⁵; Debora de Mello Gonçalves Sant'Ana⁶; Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo⁵

¹Acadêmica de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

²Acadêmica de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

³Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

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

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

⁶Docente – Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá

Introdução: A infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* pode afetar órgãos além da pele e mucosas, como fígado, baço e intestino. No intestino, os linfócitos intraepiteliais (LIEs) têm importante função protetora em processos inflamatórios. **Objetivo:** Analisar quantitativamente os LIEs do duodeno de hamsters infectados por *L. (V.) braziliensis*. **Material e métodos:** O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (7587260416). Foram utilizadas 8 hamsters fêmeas distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Controle, que recebeu um inóculo de 100 µl de tampão fosfato salino estéril no dorso da pata esquerda posterior e o grupo infectado, que recebeu uma suspensão de 100 µl contendo 2×10^7 formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2000/1655). Após 90 e 120 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e tiveram aproximadamente 1 cm do duodeno coletado para processamento histológico. Foram realizados cortes semi-seriados de 5 µm que, após serem corados pela técnica de hematoxilina e eosina foram analisados. Realizou-se a contagem dos LIEs presentes entre 2560 células epiteliais de cada animal e calculou-se a proporção de LIEs/100 células epiteliais. Os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste de Tukey considerando $p < 0,05$ para significância estatística. **Resultados:** Os resultados demonstraram uma diminuição de 38% aos 90 e de 41% aos 120 dias de infecção nos LIE do GI quando comparados aos controles, o pós-teste não mostrou significância estatística entre os grupos. Por outro lado, o teste de ANOVA de duas vias demonstrou que há um efeito da infecção [$F(1,12) = 6,70$; $p = 0,0237$] sobre os LIEs no duodeno dos hamsters. **Conclusão:** A infecção por *L. (V.) braziliensis* resultou em uma redução de LIEs, sugerindo ser uma resposta à infecção sistêmica do parasito.

Palavras-chave: Leishmaniose; Duodeno; Linfócitos intraepiteliais.

Área temática: Parasitologia

Patologia

TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS BUCAIS: OTIMIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA A EXECUÇÃO DA TÉCNICA

Renata Sano Lini¹; Camila da Silva Freires²; Eduardo Calixto²; Gabriela Ferreira Siqueira²; Carlos Roberto Bueno Junior³; Débora Hayane Vidal Pereira⁴; Larissa Tiemi Akamine Motomura⁵; Lucas Eduardo Massucato⁵; Alice Maria de Souza-Kaneshima⁶; Simone Aparecida Galerani Mossini⁶.

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

²Acadêmicos de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmico de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Acadêmica de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵Acadêmicos de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁶Docentes – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: Aplicação do teste do micronúcleo em células bucais de produtores rurais é utilizado em estudos de biomonitoramento laboral, sendo útil na avaliação da genotoxicidade dos agrotóxicos.

Objetivo: Otimizar o protocolo do teste do micronúcleo para aplicar em análises futuras no laboratório de Patologia da Universidade Estadual de Maringá. **Material e métodos:** Para otimizar o protocolo deste teste, diferentes roteiros foram elaborados de acordo com a metodologia descrita em artigos científicos. Dentre os sete integrantes da equipe, cada um testou um roteiro, visando identificar variações metodológicas mais adequadas, levando em consideração a ausência de detritos e a quantidade de células no esfregaço. As variações apresentadas nos roteiros foram enxágue da boca (2 a 7 enxagues), raspagem do epitélio jugal (20, 25, 30 vezes), utilização de agitador tipo vortex (velocidade 3 e 4) e agitação vigorosa versus agitação cuidadosa. A centrifugação com a escova de coleta também foi incluída como variação da metodologia, visando aumentar a quantidade de células no esfregaço. Também foi testada a variação no tempo de coloração do método de Feulgen e da contra-coloração com Fast Green para melhor definir o contorno celular e a identificação de estruturas compatíveis com micronúcleo. **Resultados:** Dentre as variações testadas, percebeu-se que a agitação vigorosa apresentou 8 vezes mais células em relação à agitação cuidadosa. Com 6 enxagues, as lâminas apresentaram menos detritos, e o epitélio jugal raspado 25 vezes apresentou maior número de células no esfregaço. Não houve diferença entre os roteiros para a velocidade do agitador, nem para a etapa de centrifugação com a escova de coleta. Quanto à coloração, constatou-se que o tempo citado na literatura para a contra-coloração com Fast Green não foi suficiente para coloração adequada da lâmina. **Conclusão:** Um protocolo inicial foi estabelecido, porém algumas variações ainda podem ser executadas, visando a otimização deste teste.

Palavras-chave: Protocolo; Teste do micronúcleo; Células bucais.

Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para fomento à pesquisa - Código de Financiamento 001.

Área temática: Patologia.

AVALIAÇÃO DO CÓLON DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INDUÇÃO DO CÂNCER COLORRETAL COM 1,2-DIMETILHIDRAZINA, TRATADOS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA E ARTEPILLIN C

Brenda Barroso Pelegrini¹; Amanda Alexandrino Becker²; César Agostinho Ferreira³, Gregório Rossetto Machado³, Sabrina Roledo Mazarin³, Paulo Hernandes Nabarro³, Tânia Cristina Alexandrino Becker⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmica de Graduação em Medicina, Unicesumar

³Acadêmicos de Graduação em Medicina, Universidade Estadual de Maringá

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS), Universidade Estadual de Maringá

Introdução: Dietas ricas em antioxidantes reduzem 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. A Própolis Marrom Brasileira (PMB) e seu principal constituinte, a Artepillin C (ART C), possuem ação antioxidante. **Objetivo:** induzir a formação de lesões de caráter pré-neoplásico na região colorretal para avaliar a possível atividade quimiopreventiva da PMB, ART C e PMBE (Própolis enriquecida com ART C). **Material e Métodos:** Dez grupos de ratos Wistar foram tratados por gavagem, com extrato alcoólico de PMB, PMBE e ART C por 15 semanas, conforme segue: GI: controle do veículo de diluição do DMH (n=06); GII: controle do veículo da gavagem (n=06); GIII: controle da indução com DMH (n=06); GIV: DMH + PMB (n=06); GV: DMH + PMBE (n=06); VI: grupo profilaxia - tratamento prévio com PMB e indução com DMH apenas na 6^a semana, (n=06); GVII: DMH + ART C (n=02); GVIII, GIX e GX: grupos controles do tratamento com PMB (n=06), PMBE (n=03) e ART C (n=02), respectivamente. Os intestinos foram corados com Azul de Metileno e analisados sob objetiva de 40x do microscópio de luz. CEUA nº 3301180520. **Resultados:** Grupos controles, sem indução com DMH, não apresentaram Criptas Aberrantes (CA) nem Focos de Criptas Aberrantes (FCA). No GIV os resultados foram semelhantes ao grupo controle (GIII) na região proximal do cólon, mas na distal, houve redução na quantidade de FCA. No grupo V tratados com PMBE e grupo VII, com ART C, o número de FCA diminuiu em ambas as regiões do cólon, sendo que no GV observamos a maior redução de FCA de todos os grupos experimentais. **Conclusão:** PMB e ART C apresentaram ação quimiopreventiva em relação a multiplicidade de CA e FCA, provavelmente por sua ação antioxidante.

Palavras-chave: Lesões pré-neoplásicas; Própolis Marrom Brasileira (PMB); Artepillin C.

Financiador: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Área temática: Patologia.

A IMPORTÂNCIA DA ULTRASSONAGRAFIA PARA O DIAGNÓSTICO E O ACOMPANHAMENTO DA COVID-19: REVISÃO INTEGRATIVA

Vinícius Augusto da Cunha Rodrigues¹, Giovana Naomi Wolff Ito¹, Juliana Hümmelgen¹, Gustavo Soares Paes Giugliano Meschino¹, Gustavo Melhim Abou-Rejaile¹, Isadora Drews Brenny¹, Carlos Rogélio de Castro Júnior¹, Rafaela da Cunha Artigas¹, João Pedro da Silva Munhoz¹, Gabriela Cardoso², Guilherme Fadel Picheth^{2,3}

¹Acadêmico(a) graduação em Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba/PR

²Pesquisador(a) departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR

³Docente – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba/PR

Introdução: O SARS-CoV-2 tem mecanismos e efeitos ainda pouco conhecidos. Portanto, profissionais da saúde passaram a utilizar diversas técnicas de imagem para acompanhar os acometimentos em múltiplos órgãos no COVID-19. Dentre elas, a ultrassonografia se mostrou efetiva na avaliação e monitoramento dos pacientes, principalmente os entubados, em quadros leves ou graves, até mesmo em avaliações *post-mortem*. **Objetivo:** Esta revisão destaca a fisiopatologia e a importância da ultrassonografia aplicada também ao coração e ao fígado dos pacientes COVID-19.

Material e métodos: Revisão não-sistemática integrativa nas bases de dados PUBMED, Cochrane, CAPES, e LILACS, entre 2019-2021, sendo lidos 299 artigos, refinando 176 trabalhos correspondentes.

Resultados: Ao contrário da tomografia computadorizada, a ultrassonografia apresenta baixo risco de contaminação cruzada. Em contraste com a ressonância magnética e ao PET-Scan, o ultrassom é portátil, usado beira leito e sem uso de radiação. A ultrassonografia pulmonar pode diagnosticar achados patológicos como efusão, espessamento e fragmentação da linha pleural e subpleural, desaparecimento das linhas A, aparecimento de linhas B e sinal de feixe de luz, possuindo 94–93% de sensibilidade para o diagnóstico de pneumonia por COVID-19. A ecocardiografia auxilia no diagnóstico e acompanhamento de complicações cardíacas provocadas pelo SARS-CoV-2 devido à degeneração e necrose de células do parênquima e formação de trombos hialinos. Os principais achados da ultrassonografia hepática em pacientes COVID-19 incluem aumento da espessura da vesícula biliar, hepatomegalia, alterações da ecogenicidade do fígado, heterogeneidade do parênquima hepático, sinais de necrose e drástica redução do sinal de Doppler nas artérias hepáticas e veia porta.

Conclusão: A ultrassonografia possui vantagens como: portabilidade, avaliações à beira do leito, biossegurança, possibilidade de repetir o exame sem exposição à radiação. Ademais, é possível implementar intervenções terapêuticas individualizadas a fim de favorecer a recuperação e tratamento singular, contribuindo para redução de lesões cardíacas, hepáticas e pulmonares de pacientes portadores de COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19; Ultrassonografia; Fisiopatologia.

Área temática: Pathology

Pesquisa clínica

REVISÃO NÃO-SISTEMÁTICA SOBRE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O TRATAMENTO DE HIPÓXIA

Luis Felipe Tostes Pereira¹; Camila Alves Dallagnol¹; Pedro Miguel Kutsmi Vilar Moreira¹; Clara Yumi Hlrota¹; Tassiana Hreczka Moulepes¹; Guilherme Fadel Picheth^{1, 3}; Cleverton Luiz Pirich²

¹ Acadêmico(a) - Escola de medicina da PUCPR, 80215-901, Curitiba - Paraná, Brasil.

² Docente - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná 80060-100, Curitiba - Paraná, Brasil.

³ Docente - Departamento de Patologia, Universidade Federal do Paraná 80060-100, Curitiba - Paraná, Brasil.

Introdução: A ventilação mecânica (VM) é vital para o tratamento de hipóxia, designada como $PaO_2 \leq 60$ mmHg - hipóxia hipoxêmica. Entre 10 e 15% dos pacientes acometidos por SARS-CoV-2 requerem VM devido à baixa SpO_2 apresentada ao longo e após o processo patológico. Contudo, as VM atuais apresentam diversas limitações, incluindo lesão pulmonar; disfagia e hemorragia. Outrossim, as técnicas oferecidas requerem profissionais capacitados e cilindros de oxigênio, que carecem devido à alta demanda e mau uso. Assim, tornou-se relevante a pesquisa de novas alternativas. **Objetivos:** Realizar pesquisa bibliográfica sobre recentes estudos acerca de sistemas alternativos aos métodos de suporte ventilatório usuais. **Métodos:** Revisão não-sistemática, com pesquisas em base de dados científicos - Web of Science, Google Scholar, PUBMED, Scielo, MEDLINE, Cochrane, CAPES, entre outros, com critérios de inclusão para artigos em inglês e português, bem como, que contivesse as seguintes palavras chaves – hipóxia; VM; e alternativas, no período de 2000-2021. **Resultados:** Sistemas capazes de entregar oxigênio através de vias alternativas às atuais apresentam potencial e podem ser utilizados futuramente com ótimas perspectivas. Dentre elas destacam-se carreadores de oxigênio como a hemoglobina advinda do *Arenicola marina*, que já é utilizada em tratamento de transplantes renais e para tratamento, já em fase clínica, de COVID-19 na França, por ser capaz de carrear 40 vezes mais oxigênio que a hemoglobina humana e apresentar comportamento antioxidante; ventilação enteral com auxílio de perfluorcarbonetos elevaram a $SpO_2 \leq 7\%$ quando testada em animais *in vivo*; microcápsulas de oxigênio estabilizadas com polidopamina, capazes de manter animais vivos por mais de uma hora, mesmo com processos obstrutivos pulmonares. **Conclusão:** Logo, todos estes sistemas apresentam a grande capacidade e grande potencial de atuar de maneira paralela ou em substituição à intubação por incrementarem a SpO_2 de maneira menos agressiva e mais acessível. Muitos já se encontram, inclusive, em fase clínica 2.

Palavras-chave: Hipóxia; VM; Alternativas.

Área temática: Pesquisa Clínica.

EVENTOS ADVERSOS A MEDICAMENTOS EM PACIENTE COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Estela Louro¹, Simone Tomás Gonçalves¹, Ricardo Alexandre Spironello², Paulo Roberto Donadio³, Roberto Kenji Nakamura Cuman⁴

¹Acadêmica de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

²Enfermeiro do Pronto Atendimento Municipal de Mandaguari, Mandaguari-PR

³Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

⁴Docente – Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR

Introdução: Pacientes com doenças autoimunes como a espondilite anquilosante (EA), devido ao caráter crônico e inflamatório, apresentam maior risco de desenvolver comorbidades, sendo necessária terapêutica medicamentosa ampla e variada (polifarmácia), propiciando eventos adversos, interações medicamentosas (IM) e reações adversas a medicamentos (RAM). **Objetivo:** Pesquisar a ocorrência de RAM e potenciais IM pela associação ou não de fármacos utilizados no tratamento de paciente portador de EA. **Material e métodos:** Foi realizado estudo retrospectivo observacional e de braço único dos dados de prontuário médico, no período de 2015 a 2020. As variáveis pesquisadas foram: aspectos sócio demográficos; diagnósticos; e farmacoterapia instituída. As RAM foram classificadas segundo a gravidade e causalidade pelo Algoritmo de Naranjo. Utilizamos a ferramenta Drug Interaction Checker–Medscape para identificar IM. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi oferecido ao paciente e o estudo aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos-UEM sob o nº4.634.092. **Resultados:** Paciente do sexo feminino, 54 anos, vegetariana, não tabagista e sedentária, diagnosticada com espondilite anquilosante e fibromialgia. Foram prescritos 47 medicamentos, totalizando 147prescrições que continham de 2 a 8 fármacos/prescrição. Das 30 potenciais IM encontradas, 5(16,7%) apresentavam risco grave. Quanto as RAM, foi observada pneumonia relacionada ao uso de Adalimumabe, reação grave com risco à saúde e necessária hospitalização. Dor epigástrica intensa e náusea devido ao uso da Sulfassalazina; e, náusea e vertigem relacionadas ao Tramadol, consideradas reações moderadas, exigindo suspensão do fármaco e tratamento dos sintomas. Segundo a causalidade, todas as reações foram classificadas como prováveis. **Conclusão:** RAM e IM podem agravar o quadro do paciente, exigir troca ou suspensão do fármaco, necessitando de tratamento adequado, hospitalização, podendo causar danos permanentes e até óbito. A equipe de saúde deve estar atenta e informada sobre os possíveis eventos adversos relacionados ao uso de medicamentos para prevenir agravos à saúde do paciente.

Palavras-chave: Medicamento; reação adversa a medicamento; interação medicamentosa.

Área temática: Pesquisa clínica

Saúde pública

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA SOBRE CIÊNCIAS DA SAÚDE EM MÍDIA SOCIAL

Carolina Trevisolli Palomo¹; Letícia Sayuri Murase¹; João Vitor de Oliveira Silva¹; Brenda Barroso Pelegrini²; Marina Cristina Gadêlha³; Raissa Bocchi Pedroso⁴; Luciano de Andrade⁵; Melyssa Negri⁶; Rosilene Fressatti Cardoso⁶

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

³Mestre em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁴Acadêmico de Pós-Graduação (Pós-doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁵Docente – Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

⁶Docente – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: O Instagram é uma das redes sociais mais acessadas no Brasil, e com a pandemia da COVID-19 aumentou-se o interesse do público por informações científicas sobre saúde nesse tipo de canal, desta forma, é fundamental propagar informações confiáveis e de qualidade. **Objetivo:** Promover a divulgação científica sobre saúde no Instagram, através de material e linguagem didática, além de conhecer as preferências e características do público que acompanha o perfil. **Material e métodos:** A partir de junho de 2020, foi iniciado um perfil no Instagram do Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde (@uempcs), realizando produção de conteúdos sobre divulgação científica, por meio de materiais audiovisuais, com periodicidade semanal e abordando temas como, atualizações em saúde humana, doenças infecciosas, linhas de pesquisa e produções do programa, além de docência e educação. **Resultados:** De junho de 2020 até julho de 2021 houveram cerca de 1,2 mil seguidores, sendo em outubro o maior acúmulo deles. O perfil possui um público mais ativo entre 18 e 34 anos, sendo a maioria (76%) do gênero feminino, porém também possui seguidores menos ativos de outras faixas etárias. Além disso, foi capaz de alcançar 2066 contas e possui em média 108 curtidas por postagens. As publicações do tipo carrossel, que utilizam infográficos e esquemas visuais, sobre dicas de ferramentas para graduação e/ou pós-graduação, parcerias com pesquisadores e divulgadores científicos, e conscientizações em saúde foram as de preferência dos usuários. **Conclusão:** Divulgar informações científicas de qualidade para a população em geral, de forma clara, é essencial para reduzir a propagação de desinformações. Além disso, como perspectivas, visamos alcançar os públicos de faixas etárias menos ativas no perfil, a fim de abordar temas de seus interesses.

Palavras-chave: Divulgação científica; Ciências da saúde; Mídia social.

Área temática: Saúde Pública.

FATORES ASSOCIADOS À FALHA TERAPÊUTICA EM CRIANÇAS INTERNADAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL NO BRASIL

Miyoko Massago¹, Shirlei Conegero², Celso Ivam Conegero³

¹ Mestre - Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

² Enfermeira - Hospital Guilherme Álvaro, Santos/PR

³ Docente - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

Introdução: Os neonatos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão propensos à alta quantidade de fármacos administrados e fracionamento de medicamentos de uso adulto, e consequentemente, a maior probabilidade de apresentarem reações adversas e morte prematura, quando comparados às crianças da mesma faixa etária. **Objetivo:** Fazer uma revisão sistemática dos fatores associados à falha terapêutica em crianças internadas em UTI Neonatal no Brasil. **Material e métodos:** Foi realizada a busca dos artigos científicos publicados nos idiomas inglês e/ou português, entre os anos de 2014 e 2020, nos seguintes bancos de dados: ScieLO, PUBMED e LILACS, utilizando os Descritores em Ciências da Saúde descritos à seguir: “erros de medicação”, “neonatos” e “UTI neonatal”, empregando a logística borealiana “E” e “OU”. Em seguida, foram selecionados apenas aqueles que descreviam os tipos, causas e métodos de prevenção dos erros de medicação. **Resultados:** Dos 111 artigos encontrados inicialmente, apenas seis atendiam os critérios pré-estabelecidos, nestes, as principais falhas terapêuticas relatadas foram: seis erros de administração, cinco de dispensação, dois de prescrição e um de armazenamento. Todos os trabalhos descreviam que estas falhas ocorreram em virtude de erros humanos, técnicos e/ou organizacionais. Estes estudos mencionaram como possíveis medidas de prevenção: a utilização de prontuários eletrônicos e protocolos padronizados, educação continuada, cultura de notificação de erros, participação do farmacêutico clínico, dupla checagem, dentre outros. **Conclusão:** Deve se formar uma rede de segurança envolvendo toda a equipe de atendimento aos neonatos, além de se fazer a dupla-checagem nas etapas críticas do processo, pois estes problemas podem ocorrer a qualquer momento e as medidas de prevenção já estão bem estabelecidas na literatura.

Palavras-chave: Neonatos; Erros de medicação; Prevenção.

Área temática: Saúde Pública.

AVALIAÇÃO DA ANTIBIOTICOPROFILAXIA CIRÚRGICA EM UM HOSPITAL DO PARANÁ NO ANO DE 2018

ThaysRosadaSilva¹; Bruna Gabriele Dias Thomaz²; Hélen Cássia Rosseto³

¹Residente em Farmácia com Ênfase em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

²Graduada em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá

³Docente no Departamento de Farmácia (DFA), Universidade Estadual de Maringá

Introdução: O sucesso das diversas cirurgias realizadas no mundo envolve tanto fatores relacionados à execução do procedimento, quanto fatores pré e pós-operatórios. Nesse contexto, destaca-se o desenvolvimento de infecções no sítio cirúrgico por variados micro-organismos. Assim, faz-se necessário a utilização da antibioticoprofilaxia de forma correta nas etapas do pré-operatório.

Objetivo: Avaliar a antibioticoprofilaxia das cirurgias eletivas realizadas em um hospital de pequeno porte no Paraná no ano de 2018. **Material e métodos:** A pesquisa foi aprovada pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá, sob número de protocolo 3.617.698. O estudo descritivo foi realizado a partir da análise da profilaxia antimicrobiana descrita nos prontuários eletrônicos dos pacientes que realizaram cirurgias eletivas no hospital, entre janeiro e dezembro de 2018. **Resultados:** Analisou-se dados sobre 4425 procedimentos cirúrgicos, contudo apenas 2962 continham dados satisfatórios para a realização da pesquisa. A partir da coleta de dados, observou-se que os principais erros cometidos em relação à antibioticoprofilaxia referem-se ao horário de administração do antibiótico, a dose aplicada e a escolha do antibiótico utilizado. **Conclusão:** De acordo com os resultados encontrados, nota-se que os protocolos de escolha do antibiótico para cada cirurgia apresentam equívocos, além de ser necessário a fidelização ao que é recomendado quanto à dose e os horários já padronizados.

Palavras-chave: Antibioticoprofilaxia; Cirurgia; Infecção.

Área temática: Public Health/Saúde Pública.

ANSIEDADE COMO CONSEQUÊNCIA DA VIOLÊNCIA SOFRIDA PELOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19

Mariá Romano Bitencourt^{1*}; Lincoln Luís Silva²; Ana Carolina Jacinto Alarcão³; Amanda de Carvalho Dutra⁴; Marcos Rogério Bitencourt⁵; Giovana Jorge Garcia⁶; Luciano de Andrade⁷; João Ricardo Nickenig Vissoci⁸; Sandra Marisa Peloso⁹; Maria Dalva de Barros Carvalho¹⁰

¹Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

³ Docente – Faculdade Adventista Paranaense, Ivatuba/PR

⁴ Docente – Departamento de Medicina, UNICESUMAR, Maringá/PR

⁵ Docente – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

Introdução: A pandemia da COVID-19 aumentou o reconhecimento dos profissionais de saúde, porém, há evidências de aumento da violência contra estes trabalhadores trazendo consequências como a ansiedade.

Objetivo: Analisar os níveis de ansiedade nos profissionais de saúde que sofreram ou não violência durante a pandemia da COVID-19 e verificar as variáveis associadas ao risco de iniciar o medicamento para ansiedade. **Material e métodos:** Avaliou-se o perfil de ansiedade de profissionais da saúde no Brasil, via questionário on-line, utilizando o Transtorno de Ansiedade Generalizada (GAD-7), em relação aos grupos de participantes que sofreram violência ou não durante a pandemia da COVID-19 (Parecer COPEP/UEM 37712820.4.0000.0104). Aplicou-se o coeficiente de confiabilidade alfa de Cronbach para verificar a consistência das respostas, a estatística descritiva com frequência absoluta e relativa, média, mediana e desvios-padrão, e o teste de Mann-Whitney para verificar se existia diferença na mediana do escore de GAD-7 entre os grupos que sofreram ou não violência, e considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no software R Studio. **Resultados:** Ao todo, 1.166 profissionais da saúde responderam ao questionário constituindo o alfa de Cronbach de 0,91. Além disso, cerca de 34,14% dos participantes tiveram o perfil de ansiedade normal, 40,14% leve, 15,78% moderada, e 9,95% grave. A pontuação média do somatório do GAD-7 foi de 7,03 ($\pm 5,20$). Do total de participantes, 592 (50,77%) não sofreram violência e a média do GAD-7 foi de 5,70 ($\pm 4,60$), ao passo que 574 (49,23%) participantes sofreram violência apresentando a média de 8,40 ($\pm 5,42$). O teste de Mann-Whitney revelou que houve uma diferença significativa do somatório da mediana do GAD-7 entre o grupo que sofreu violência em relação ao que não sofreu (7,0 vs 5,0; $W = 118187$, $p < 0,01$). **Conclusão:** Profissionais de saúde que sofreram violência durante a pandemia apresentam maiores escores de ansiedade.

Palavras-chave: COVID-19; Violência; Pessoal de saúde.

Financiador (es): CAPES

Área temática: Epidemiologia.

Toxicologia

DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONADO PARA OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA DE COCAÍNA EM FLUÍDO ORAL

Deborah Thais Palma Scanferla¹, Rafaela Yasmin Melo Nascimento², Nicole Santos Baccule², Ingrid Beatriz Campanha², Maria Angelica Polonio³, Fernando de Carvalho Figueiredo³, Miguel Machinski Junior⁴, Camila Marchionis⁵, Simone Aparecida Galerani Mossini⁴.

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

²Acadêmico de Graduação em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

³Acadêmico de Graduação em Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁴Docente – Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR.

⁵Docente – Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC.

Introdução: A microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês Dispersive Liquid - Liquid Microextraction, DLLME) destaca-se pela facilidade e rapidez. A fim de melhorar a eficiência na extração de um analito específico, como cocaína (COC) em fluido oral (FO), é necessário otimizar as variáveis influentes na técnica. As metodologias multivariadas são uma excelente escolha para avaliação simultânea dos fatores, em que se reduz o número de experimentos, tempo de execução e custos, além de maximizar a resposta analítica. **Objetivo:** Aplicar o delineamento fatorial fracionado (2_{k-1}) de cinco variáveis que podem influenciar na DLLME de COC em FO. **Material e métodos:** A DLLME foi otimizada por planejamento 2_{5-1} , avaliando 5 variáveis em 3 níveis. Foram realizados 16 experimentos em triplicata e 3 pontos centrais. Para as extrações: amostras de fluido oral foram enriquecidas com COC (200ngmL^{-1}), e ajustou-se o pH. Em seguida, foi adicionado solução tampão e força iônica (0, 1 e 2% de NaCl). Logo após, acrescentou-se mistura de solvente extrator e dispersor (diclorometano e acetonitrila). Os tubos foram centrifugados e a fase extratora transferida para um *vial*, para evaporação. Por fim, foi adicionado $50\mu\text{L}$ de BSTFA com 1% TCMS e injetado ($1\mu\text{L}$) em GC-MS. **Resultados:** O tratamento estatístico envolvendo as áreas médias de COC gerou o gráfico de Pareto (95% nível de confiança). As variáveis que influenciaram na resposta foram: volumes (solvente extrator e da amostra) e a força iônica. O Diagrama de Pareto direcionou as futuras análises. Assim, não será realizado ajuste de pH da amostra e o volume de solvente dispersor será fixado no ponto central. Os volumes de solvente extrator e amostra deverão ser maiores, e a força iônica, menor. **Conclusão:** O planejamento fatorial foi importante para definir as variáveis significativas da DLLME e guiar o Planejamento Central Composto, a partir de novos valores para as variáveis significativas.

Palavras-chave: Otimização; cocaína; fluido oral.

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

Área temática: Toxicologia.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus limonia*, *Citrus sinensis* E *Citrus limon* CONTRA *Aspergillus flavus*

Daniele de Freitas Garcia¹; Denise Tiemi Uchida²; Simone Aparecida Galerani Mossini³; Miguel Machinski Junior³; Juliana Cristina Castro³

¹Acadêmica de Graduação em Bioquímica, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá/PR

²Acadêmico de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR

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

Introdução: O fungo *Aspergillus flavus* é um fungo filamentosos, produtor de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, sendo as aflatoxinas consideradas tóxicas aos seres humanos por apresentarem caráter carcinogênico. Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs) com atividade antifúngica entram como uma alternativa para o controle dessa contaminação em alimentos. **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Citrus limonia* (Limão Rosa), *Citrus sinensis* (Laranja Sanguínea) e *Citrus limon* (Limão Siciliano) contra cepas aflatoxigenicas de *A. flavus*. **Material e métodos:** Os OEs foram adquiridos no comércio local, Maringá-Paraná. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada com o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), com o inóculo de 10⁵ conídios/mL de *A. flavus* (padronizado com salina 0,9% em câmara de Neubauer). O meio de cultura utilizado foi o RPMI, 1640 com L-glutamina sem bicarbonato, tamponado com 0,165 M MOPS. Os OEs foram diluídos em solução de Tween 80 a 1% e testados numa faixa de concentração de 3,91 µg/mL até 2000 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio RPMI e como controle positivo foi utilizado RPMI + solução fúngica padronizada. A placa foi incubada em câmara BOD por 72 horas à 25 °C. Após a incubação, a leitura foi realizada visualmente. **Resultados:** Os OEs de *C. limonia* e *C. sinensis* apresentaram CIM de 2000 µg/mL e o OE de *C. limon* apresentou CIM maior que 2000 µg/mL. O CIM representa a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem que os OEs de *C. limonia*, *C. sinensis* e *C. limon* possuem uma inibição fraca frente ao fungo *A. flavus*. Por essa razão, novos estudos com outros OEs deverão ser realizados a fim de obter uma inibição moderada ou alta diante do fungo deteriorante e micotoxigênico, *A. flavus*.

Palavras-chave: Bioatividade; Compostos naturais; Inibição fúngica.

Financiador (es): O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo nº 303785/2019-5).

Área temática: Toxicologia

Atenciosamente,

Simone Aparecida Galerani Mossini

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Fisiopatologia**

Comissão organizadora do evento

**Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Fisiopatologia**

(44) 3011-4805

simposiodopbf@uem.br

www.pbf.uem.br

**Anais
2021**