

Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes  
Tiago Sousa Melo  
(Organizadores)

# Biomedicina e Farmácia: Aproximações 3



**Atena**  
Editora

Ano 2019

Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes  
Tiago Sousa Melo  
(Organizadores)

# Biomedicina e Farmácia: Aproximações 3

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Natália Sandrini e Lorena Prestes

Revisão: Os autores

### Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

B615 Biomedicina e farmácia [recurso eletrônico] : aproximações 3 /  
Organizadores Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes, Tiago  
Sousa Melo. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. –  
(Biomedicina e Farmácia; v. 3)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-322-4

DOI 10.22533/at.ed.224191404

1. Biomedicina. 2. Ciências médicas. 3. Farmácia. I. Lopes,  
Letícia Bandeira Mascarenhas. II. Melo, Tiago Sousa. III. Série.  
CDD 610

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de  
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos  
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

Farmácia e Biomedicina integram o time das ciências da saúde que constituem nas áreas que estudam sobre a vida, a saúde e a doença. No qual focam na manutenção e na melhoria da saúde para o indivíduo, grupos específicos e comunidades.

A obra “Biomedicina e Farmácia: Aproximações” consiste de uma série de livro (E-book) de publicação da Atena Editora, em seus 28 capítulos de artigos científicos do volume I, a qual abordam temáticas atualizadas de diferentes âmbitos que vão desde relatos de casos até a análise de medicamentos, plantas e microbiologia, entre outros.

Sendo assim, almejamos que este livro possa contribuir com informações pertinentes e atualizadas para os estudantes e profissionais da área de farmácia e biomedicina, oportunizando a ampliação dos conhecimentos sobre o tema.

Desejamos a todos uma boa leitura!

Letícia Bandeira Mascarenhas Lopes

Tiago Sousa Melo

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
ETIOPATOGENESE DA ERITROBLASTOSE FETAL RELACIONADO AO FATOR RH	
José Virgulino de Oliveira Lima	
Gisele Lopes Cavalcante	
Maria Camila Leal de Moura	
Rayssa Hellen Ferreira Costa	
Maria Clara Nolasco Alves Barbosa	
Jéssica Maria Coelho de Sousa	
Ilana Dennyse Amorim Rêgo	
Dayana Cristina dos Santos Lima	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2241914041</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>9</b>
EVENTOS ADVERSOS NOTIFICADOS APÓS IMUNIZAÇÃO CONTRA FEBRE AMARELA E O CONHECIMENTO POPULACIONAL	
Letícia de Souza Silva	
Márcia Cristina Pena Figueiredo	
Márcio Fernando Madureira Alves	
Sandra Heloisa Nunes Messias	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2241914042</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>23</b>
FATORES ASSOCIADOS AO ABANDONO DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE ILHÉUS-BA NOS ANOS DE 2014 A 2016	
Victor Laranjeira Martins	
Laís Guedes Rodrigues	
Flamélia Carla Silva Oliveira	
Jane Francisca Benjamim Moraes	
Eliana Neres Mello	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2241914043</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>34</b>
FREQUÊNCIA DOS CRISTAIS DE CHARCOT-LEYDEN NO EXAME PARASITOLÓGICO REALIZADO NO LABORATÓRIO CENTRAL DE BIOMEDICINA NO ANO DE 2017	
Jéssica Araújo Menezes	
Flávia Karen Carvalho Garcia	
Larissa Lisboa Rêgo Brito	
Marcos Emmanuel Vilanova da Costa	
Leonan Oliveira de Souza	
Vanessa Christine Gusmão Santos	
José Hugo Romão Barbosa	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2241914044</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>37</b>
FUNGOS MACROSCÓPICOS DO SUDOESTE DO PARANÁ: PRIMEIROS REGISTROS	
Ligia Thix de Oliveira	
Fernanda Ferrari	
Daniela Aparecida Estevan	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2241914045</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 48**

IMPACTOS DA HISTOPLASMOSE EM PORTADORES DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

Cicero Pinheiro Inácio  
Rejane Pereira Neves  
Maria Daniela Silva Buonafina  
Melyna Chaves Leite de Andrade  
Madi Veiga Diniz  
Armando Marsden Lacerda Filho  
Marcos Andre Cavalcanti Bezerra  
Igor de Farias Domingos  
Oliane Maria Correia Magalhães

**DOI 10.22533/at.ed.2241914046**

**CAPÍTULO 7 ..... 62**

INCIDÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS E HELMINTOS NO EXAME PARASITOLÓGICO REALIZADO NO LABORATÓRIO CENTRAL DE BIOMEDICINA NO PRIMEIRO SEMESTRE DE 2018

Luana Tenorio Olímpio  
Flávia Karen Carvalho Garcia  
Janaína Fontes Ribeiro  
Larissa Lisboa Rêgo Brito  
Marcos Emanuel Vilanova da Costa  
Leonan Oliveira de Souza  
José Hugo Romão Barbosa

**DOI 10.22533/at.ed.2241914047**

**CAPÍTULO 8 ..... 67**

INCIDÊNCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE EM UM LABORATÓRIO PARTICULAR DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM-PA

Raimundo Gladson Corrêa Carvalho  
Elianne da Silva Vieira  
Carolina Beatriz Freitas Nunes  
Larissa de Souza Mendes

**DOI 10.22533/at.ed.2241914049**

**CAPÍTULO 9 ..... 81**

ISOPULEGOL APRESENTA ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS PROMISSORAS: REVISÃO DE LITERATURA

Deyna Francélia Andrade Próspero  
Manoel Pinheiro Lúcio Neto  
Kidner Angelino Próspero  
Emanuel Osvaldo de Sousa  
Aline Raquel de Sousa Ibiapina  
Antonio Alberto Ibiapina Costa Filho  
Daniele Martins de Sousa Oliveira  
Girzia Sammya Tajra Rocha  
Janainna Maria Maia  
Larissa Vanessa Ferreira Memória  
Nayana Santos Arêa Soares  
Camila Leyelle Sousa Neves Rocha  
Matheus Evelyn Martins

Litamara dos Santos Miranda  
Emília do Rosário Vale de Carvalho Silva  
Emones Santos Souza Rodrigues  
Juliana Nádia Figueiredo Piauiense

**DOI 10.22533/at.ed.22419140410**

**CAPÍTULO 10 ..... 90**

**LEUCEMIA ASSOCIADA A CANDIDEMIA**

Cicero Pinheiro Inácio  
Rejane Pereira Neves  
Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo  
Carolina Maria da Silva  
Franz de Assis Graciano dos Santos  
Maria Eduarda Ferro de Mello  
Maria da Conceição Alexandre Castro  
Madi Veiga Diniz  
Oliane Maria Correia Magalhães  
Luiz Nascimento Araújo Neto  
Melyna Chaves Leite de Andrade

**DOI 10.22533/at.ed.22419140411**

**CAPÍTULO 11 ..... 99**

**LEVEDUROSOS: FRONTEIRAS ENTRE A COLONIZAÇÃO E A DOENÇA PARA O DESAFIO DIAGNÓSTICO**

Rejane Pereira Neves  
Melyna Chaves Leite de Andrade  
Oliane Maria Correia Magalhães  
Armando Marsden Lacerda Filho  
Reginaldo Gonçalves de Lima Neto  
Franz de Assis Graciano dos Santos  
Carolina Maria da Silva  
Cícero Pinheiro Inácio

**DOI 10.22533/at.ed.22419140412**

**CAPÍTULO 12 ..... 111**

**MEDICAMENTOS INALATÓRIOS ORAIS: REVISÃO SOBRE ASPECTOS DA FORMULAÇÃO E DOS DISPOSITIVOS PARA LIBERAÇÃO DE DOSE**

Ana Carolina Guimarães Ribeiro  
Taízia Dutra Silva  
Edilene Rodrigues  
Márcio de Matos Coelho  
Cristina Duarte Vianna-Soares

**DOI 10.22533/at.ed.22419140413**

**CAPÍTULO 13 ..... 123**

**MORTALIDADE INFANTIL NAS POPULAÇÕES INDÍGENAS DE RORAIMA**

Bianca Jorge Sequeira  
Ana Iara Costa Ferreira  
Fabiana Nakashima  
Leila Braga Ribeiro  
José Geraldo Ticianeli  
Fernanda Zambonin  
Wagner do Carmo Costa

**DOI 10.22533/at.ed.22419140414**

<b>CAPÍTULO 14</b> .....	<b>138</b>
O ÁLCOOL E SEUS EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO	
Aline Reis Silva	
Amanda Augusto De Arruda	
<b>DOI 10.22533/at.ed.22419140415</b>	
<b>CAPÍTULO 15</b> .....	<b>150</b>
O PERFIL CLÍNICO - EPIDEMIOLÓGICO DA MALÁRIA EM UM MUNICÍPIO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA	
Raquel Alves Fernandes	
Joyce dos Santos Brasil	
Daniela Soares Leite	
<b>DOI 10.22533/at.ed.22419140416</b>	
<b>CAPÍTULO 16</b> .....	<b>162</b>
OCORRÊNCIA DE PARASIToses INTESTINAIS EM UM LABORATÓRIO PRIVADO DO MUNICÍPIO DE ATALAIA, ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL	
Mayara de Melo Bezerra	
Polyanne de Melo Ferreira	
Alecio Marcelo Lima Dos Santos	
Evilma Nunes de Araújo	
Paulyanne Karlla Araújo Magalhães	
Thiago José Matos Rocha	
<b>DOI 10.22533/at.ed.22419140417</b>	
<b>CAPÍTULO 17</b> .....	<b>170</b>
PERCEPÇÃO DA DOR NO PACIENTE DE PAQUIONÍQUIA CONGÊNITA (PC)	
Dhara Leite Lopes	
Luanna Waléria Oliveira Santos	
Vinicius Mendes Souza Carneiro	
Marcus Vinicius Cardoso Matos Silva	
Carlos Danilo Cardoso Matos Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.22419140418</b>	
<b>CAPÍTULO 18</b> .....	<b>182</b>
PREDIÇÃO DA ABSORÇÃO PASSIVA DE FÁRMACOS POR MEIO DA PERMEABILIDADE DETERMINADA IN VITRO UTILIZANDO O ENSAIO EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA)	
Iara Dévula Tiso Tana	
Tamires Guedes Caldeira	
Renata Rodrigues Lima	
Dênia Antunes Saúde Guimarães	
Jacqueline de Souza	
<b>DOI 10.22533/at.ed.22419140419</b>	
<b>CAPÍTULO 19</b> .....	<b>193</b>
PRINCIPAIS MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS EM CRIANÇAS DO ESTADO DE RORAIMA	
Ana Iara Costa Ferreira	
Victor Hugo Araújo Moraes	
Geovanna Ferreira Silva	
Yasmin de Freitas Santos	
Larissa Soares Cardoso	
Leila Braga Ribeiro	
Fabiana Nakashima	
Cynthia Dantas de Macedo Lins	



Antonio Carlos Sansevero Martins  
Bianca Jorge Sequeira  
Wagner do Carmo Costa

**DOI 10.22533/at.ed.22419140420**

**CAPÍTULO 20 ..... 201**

PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS EFETORAS, CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57Bl/6 E Balb-c INFECTADOS *in vitro* COM *Leishmania infantum*

Rafaela Miranda Barbosa  
Marcela Rezende Lemes  
Lara Beatriz Ferreira  
Laura Caroline de Faria  
Paula Tatiana Mutão Ferreira  
Jonatas da Silva Catarino  
Rafael Obata Trevisan  
Amanda Freire De Assis Riccardi  
Helioswilton Sales de Campos  
Juliana Reis Machado e Silva  
Carlo José Freire de Oliveira  
Virmondés Rodrigues Junior  
Camila Belfort Piantino Faria  
Marcos Vinícius Da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.22419140421**

**CAPÍTULO 21 ..... 216**

QUANTIFICAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO EM DENTIFRÍCIOS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Déborah Fernandes Rodrigues  
Brenda Caroline Andrade Santana  
Whocely Victor de Castro  
Ruben Dario Sinisterra Millán  
Carlos Eduardo de Matos Jensen

**DOI 10.22533/at.ed.22419140422**

**CAPÍTULO 22 ..... 221**

REDE DE AJUDA ENTRE AMIGOS

Débora Rezeck Totti  
Isabela Vieira Santana  
Maria Paula Riolino  
Karina Perez Mokarzel Carneiro

**DOI 10.22533/at.ed.22419140423**

**CAPÍTULO 23 ..... 226**

TRANSFORMAÇÃO DE E. COLI DH5 $\alpha$  PELO MÉTODO DE ELETROPORAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS POR MINIPREP CASEIRA

Artur Fontenelle Lima Montenegro  
Antônio Bruno Alves da Silva  
Martha Jéssika Oliveira Santos  
Walisson Leonidas de Albuquerque  
Carlos Roberto Koscky Paier  
Márcia Valéria Brandão dos Santos Martins

**DOI 10.22533/at.ed.22419140424**

**CAPÍTULO 24 ..... 238**

USO DA ESPINHEIRA SANTA (*Maytenus ilicifolia*) NO TRATAMENTO COADJUVANTE EM PACIENTES COM PROBLEMAS GASTROINTESTINAIS

Francisco Ítalo de Sousa Brito  
Carolina Francisca Alves de Jesus Sousa  
Mateus Marques Rodrigues de Jesus  
Lília Rafaela Barbosa de Sousa  
Carlos Átila Pereira de Araújo

**DOI 10.22533/at.ed.22419140425**

**CAPÍTULO 25 ..... 243**

UTILIZAÇÃO DE NEUROPROTETORES FAVORECE A SOBREVIVÊNCIA DOS MOTONEURÔNIOS DA MEDULA ESPINAL NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

Thaís Costa Porto Marinho  
Angélica Dutra de Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.22419140426**

**SOBRE OS ORGANIZADORES..... 255**

## PREDIÇÃO DA ABSORÇÃO PASSIVA DE FÁRMACOS POR MEIO DA PERMEABILIDADE DETERMINADA IN VITRO UTILIZANDO O ENSAIO EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA)

### Iara Dévula Tiso Tana

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia

Ouro Preto – Minas Gerais

### Tamires Guedes Caldeira

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia

Ouro Preto – Minas Gerais

### Renata Rodrigues Lima

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia

Ouro Preto – Minas Gerais

### Dênia Antunes Saúde Guimarães

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia

Ouro Preto – Minas Gerais

### Jacqueline de Souza

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia

Ouro Preto – Minas Gerais

**RESUMO:** A biodisponibilidade de fármacos veiculados em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata está relacionada com as propriedades de solubilidade e permeabilidade do fármaco ao longo do trato gastrointestinal (TGI). Diversos modelos *in vitro* têm sido empregados na determinação e caracterização da permeabilidade, como o ensaio de Permeabilidade em Membrana

Artificial Paralela (PAMPA) que estima a absorção passiva transcelular de moléculas a partir de suas características físico-químicas. O presente capítulo tem o objetivo de descrever a determinação da permeabilidade de fármacos pelo modelo *in vitro* PAMPA, bem como expor as variações da técnica, suas características e dificuldades, apresentando também exemplos de experimentos realizados com fármacos. Para isso, foi realizada busca bibliográfica em banco de dados como Science Direct e PeriódicosCapes, selecionando artigos entre 1998 a 2018. Vinte e sete artigos que descreveram a técnica foram encontrados. Estes mostraram as variações de diversos parâmetros durante o ensaio de predição da permeabilidade no TGI, na pele e na barreira hematoencefálica e apresentaram os cuidados e as limitações do ensaio. O PAMPA é uma técnica rápida, simples, considerada capaz de prever a absorção de fármacos em várias regiões do organismo por meio do ajuste de variáveis inerentes ao estudo e, principalmente, de proporcionar resultados correlacionáveis aos demais modelos. O PAMPA também possui cuidados que devem ser levados em consideração como forma de evitar fontes de erro.

**PALAVRAS-CHAVE:** ensaio PAMPA, permeabilidade, PAMPA permeabilidade.

**ABSTRACT:** The bioavailability of drugs conveyed in solid oral forms of immediate release is defined as the fraction of the administered dose which is absorbed intact in the systemic circulation and is related to the solubility and permeability properties of the drug along the gastrointestinal tract (GIT). Several *in vitro* models have been employed in the determination and characterization of permeability, such as the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA), which estimates the transcellular passive absorption of molecules from their physicochemical characteristics. The aim of this chapter is to describe the determination of the permeability of drugs by the *in vitro* model PAMPA, as well as to expose the variations of the technique, its characteristics and difficulties, also presenting experiments with drugs as examples. For this, a bibliographic search was carried out in a database such as Science Direct and PeriodicosCapes, selecting articles between 1998 and 2018. Twenty seven papers describing the technique were found, showing variations of several parameters during the GIT permeability prediction test, skin and the blood-brain barrier and presented the care and limitations of the trial. PAMPA is a fast, simple technique considered to be able to predict the absorption of drugs in various regions of the body by adjusting variables inherent to the study and mainly to have results obtained correlated to the other models. PAMPA also has care that should be taken into account as a way to avoid sources of error.

**KEYWORDS:** PAMPA assay, permeability, PAMPA permeability.

## 1 | INTRODUÇÃO

A absorção de um fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral ocorre quando há sua dissolução nos líquidos do trato gastrointestinal (TGI) e a sua permeação através das membranas intestinais até a chegada à corrente sistêmica.

Vários são os fatores que alteram a absorção, tais como: fatores fisiológicos, fatores inerentes ao próprio fármaco como suas características físico-químicas e fatores relacionados a forma farmacêutica. A velocidade e a extensão da absorção de um fármaco, administrado por via oral, leva em consideração três pilares essenciais: a solubilidade do próprio fármaco, a permeabilidade através das membranas e a velocidade de dissolução a partir da forma farmacêutica. Logo, quando existe uma alta solubilidade e permeabilidade do fármaco, somado a uma dissolução rápida a partir da forma farmacêutica, quantidade adequada a dose do fármaco atinge a circulação sistêmica em velocidade apropriada e, conseqüentemente, pode ser distribuída e chegar ao local de ação para cumprir seu efeito terapêutico (AMIDON et al., 1995).

Devido a estes fatores, a determinação da permeabilidade se faz necessária, uma vez que o fármaco solubilizado nos líquidos biológicos deve atravessar as células das membranas intestinais para ser absorvido.

A classificação da permeabilidade do fármaco está indiretamente ligada à extensão da sua absorção (da fração absorvida da dose) ou à velocidade de transferência de

massa através da membrana intestinal e está diretamente relacionada com a sua estrutura molecular e com as características físicas e bioquímicas das membranas (FDA, 2017).

As barreiras fisiológicas do corpo humano, seus transportadores, bem como as características físico-químicas do fármaco são parâmetros que influenciam a permeabilidade (GONÇALVES et al., 2009).

Existem vários métodos para a determinação da permeabilidade de fármacos a fim de prever a absorção *in vivo*. Dentre eles, os métodos mais difundidos são: métodos *in vivo* em seres humanos que são estudos de biodisponibilidade absoluta, estudos de balanço de massa e estudos de perfusão intestinal; métodos de perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em um modelo animal adequado; métodos *in vitro* utilizando seções de tecidos intestinais de origem humana ou animal e cultura de células. Normalmente são empregadas células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), células *Madin-Darby* de rim canino (MDCK) e células TC-7, que são subclones isolados das células Caco-2. Para a avaliação preliminar da permeabilidade podem ser utilizados também sistemas artificiais, como o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) e métodos *in silico*, que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade de acordo com a estrutura química da substância (BUENO e RECH, 2009; SOUZA et al., 2007; BALIMANE et al., 2000).

Dentre os métodos citados para a determinação da permeabilidade, o ensaio PAMPA se destaca por ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, que pode gerar informações sobre o caráter lipofílico, o estado de carga em diferentes valores de pH e a solubilidade do fármaco (KANSY et al., 1998).

Proposto por Kansy e colaboradores em 1998, o ensaio PAMPA baseia-se em sistemas artificiais compostos por lipídeos, utilizados nos estudos de previsão da absorção passiva de fármacos. A avaliação da permeabilidade de fármacos é realizada de modo transcelular, dado que não há expressão de transportadores.

Diante disto, este trabalho visa reunir informações sobre o que é e como realizar a determinação da permeabilidade de fármacos pelo modelo *in vitro* PAMPA, discutindo as características e as dificuldades do emprego da técnica, apresentando exemplos de experimentos realizados com fármacos.

## 2 | MÉTODO

Foi realizada busca bibliográfica em bancos de dados, como Science Direct e Periódicos Capes, utilizando as palavras-chaves “PAMPA permeability”, “PAMPA assay” e “permeability”. Artigos científicos contendo informações sobre a técnica, publicados entre 1998 a 2018, foram coletados.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Constituição do sistema para a realização do ensaio PAMPA

Na técnica, duas placas de 96 poços acopladas assemelham-se a um “sanduíche”. Uma placa é chamada de compartimento doador, na qual a substância a ser avaliada está solubilizada em tampão, com pH variando de 3,0 a 10,0 mimetizando o lúmen intestinal, e a outra placa é denominada compartimento receptor, a qual recebe apenas solução tampão, usualmente com pH 7,4 mimetizando a corrente sanguínea. Na base do compartimento receptor existe um filtro, geralmente composto de polivinildifluorideno (PVDF), impregnado por lipídeo dissolvido em solvente orgânico, o qual gera uma membrana que mimetiza a mucosa intestinal. Durante a realização do ensaio, o fármaco em solução migra do compartimento doador para o compartimento receptor por difusão passiva (KANSY et al., 1998; REIS, 2013; AVDEEF, 2005).

Durante a busca bibliográfica, vinte e sete artigos que descreveram o ensaio PAMPA, bem como aqueles que avaliaram a permeabilidade no TGI, na pele e barreira hematoencefálica e que mostraram variações de diversos parâmetros durante o ensaio, foram selecionados.

Para a realização do ensaio PAMPA diversas variações dos parâmetros da técnica são permitidas, conforme o que se deseja estudar. Os solventes n-dodecano, n-hexadecano e 1,7-octadieno podem ser usados para a avaliação da permeabilidade no TGI. Na barreira hematoencefálica, podem ser usados os solventes n-dodecano e n-hexadecano. Os análogos sintéticos da ceramida, colesterol, ácido esteárico e uma mistura de 70% de óleo de silicone com 30% de miristato de isopropila (IPM) são usados para a determinação da permeabilidade na pele. A composição lipídica apresentou alta variabilidade, podendo conter lecitina de ovo ou soja, dioleifosfatidilcolina (DOPC), solução lipídica extraída a partir de cérebro suíno (*Porcine Polar Brain Lipid* - PBL), óleo de silicone e IPM, e mistura de fosfolipídeos, na proporção de 2 a 20%. O pH usado nos compartimentos variou de 4 a 8. O tempo de incubação das placas variou de 2 a 18 horas com ou sem agitação. A temperatura variou de 21°C a 37°C. Os volumes utilizados nos compartimentos doador e receptor variaram de 150 µL a 300 µL (KANSY et al., 1998; ZHU et al., 2002; WOHNSLAND e FALLER, 2001; OTTAVIANI et al., 2006; AVDEEF et al., 2001; BERMEJO et al., 2004; DI et al., 2003; SUGANO et al., 2001; SINKÓ et al., 2012; SCHNEIDER, 2013).

### 3.2 Cálculos de permeabilidade e correlação com absorção

Para a análise dos resultados é realizado o cálculo de permeabilidade efetiva (Equação 1), que leva em consideração os seguintes parâmetros:  $V_D$  = volume do compartimento doador;  $A$  = área da membrana;  $t$  = tempo de incubação da placa em segundos;  $T_{ss}$  = tempo necessário para saturar a membrana;  $\epsilon_a$  = porosidade aparente do filtro de PVDF (NIELSEN e AVDEEF, 2004);  $r_v$  = razão do volume dos compartimentos

doador e receptor;  $C_A(t)$  e  $C_D(0)$  = concentrações em mol/mL das amostras presentes no compartimento receptor ao final do ensaio e no compartimento doador no tempo zero, respectivamente (AVDEEF, 2003; REIS, 2013).

$$P_{\text{eff}} = -\frac{2,303 V_D}{A (t - \tau_{ss}) \varepsilon_a} \cdot \left( \frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \log_{10} \left[ 1 - \frac{1 + r_v^{-1}}{1 - R_M} \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right]$$

Equação 1 – Fórmula para o cálculo da Permeabilidade efetiva ( $P_{\text{eff}}$ )

A equação 2 permite a avaliação da possível retenção do fármaco nas membranas e se esta retenção irá acometer no resultado do cálculo de permeabilidade (AVDEEF, 2003).

$$R_M = 1 - \left( \frac{m_D(t)}{m_D(0)} \right) - \left( \frac{m_A(t)}{m_D(0)} \right)$$

Equação 2 – Fórmula para o cálculo da quantidade de fármaco retido na membrana

Os valores calculados de permeabilidade efetiva são então comparados a valores obtidos de fármacos previamente estabelecidos como padrões de alta e baixa permeabilidade e, assim, pode-se concluir acerca da permeabilidade e processo de absorção da substância estudada. Um fármaco é considerado de alta permeabilidade quando a extensão da sua absorção em humanos for igual ou superior a 85%, de acordo com FDA, EMA, OMS e ANVISA (FDA, 2017; WHO, 2006; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

### 3.3 Cuidados e limitações do ensaio PAMPA

Certos cuidados durante a realização do ensaio PAMPA são fundamentais, uma vez que alguns parâmetros podem alterar os resultados de permeabilidade obtidos.

#### 3.3.1 Composição das membranas artificiais

A membrana artificial usada nos ensaios PAMPA por Kansy, Senner e Gubernator (1998) é composta por um filtro de PVDF hidrofóbico impregnado por componentes lipídicos dissolvidos em solventes orgânicos. A composição da membrana é amplamente utilizada da mesma maneira, porém pode ser alterada. Com isso, a escolha da composição das membranas selecionadas para a realização do ensaio possui influência no resultado final, uma vez que a regulação da fluidez da membrana afeta as características de transporte transcelular (MEDDINGS e THEISEN, 1989).

### *3.3.2 Integridade das membranas artificiais*

É necessário certificar que a membrana não será rompida durante a realização do ensaio. A integridade da membrana é fundamental para garantir robustez do método, provando que as frações permeadas na técnica não sejam provenientes de danos a membrana (SCHNEIDER, 2013). A integridade da membrana é avaliada antes e após o experimento contribuindo para a eliminação de uma fonte de erro durante a execução do ensaio.

### *3.3.3 Composição e tipos de filtros*

Kansy e colaboradores (1998) idealizaram o ensaio PAMPA utilizando um filtro hidrofóbico (PVDF) impregnado por lipídeo dissolvido em solvente orgânico. Esse tipo de filtro forma membranas estáveis e resistentes a excipientes e agitação. Porém, a geometria dos poros desse filtro facilita a retenção dos fármacos na membrana.

Com isso, pesquisas já foram realizadas utilizando o PVDF hidrofílico, aumentando a permeação das substâncias e reduzindo o tempo de incubação das placas (ZHU et al., 2002).

### *3.3.4 pH e composição dos meios dos compartimentos doador e receptor*

Os meios dos compartimentos doador e receptor geralmente são soluções tamponadas que mimetizam os fluidos sanguíneo e intestinal. O pH do compartimento doador é fundamental no coeficiente de correlação (AVDEEF et al., 2007).

Não há muitos estudos que certificam a condição de pH ideal e de acordo com Avdeef e colaboradores (2007), a correlação pode diminuir com o acréscimo de novas moléculas, principalmente se os fármacos incluídos não possuírem transporte passivo.

Comumente, o uso de um gradiente de pH é usado na técnica. Para o compartimento doador o pH pode variar de 3,0 a 10,0 e no receptor o pH mantém-se, frequentemente em 7,4 (AVDEEF et al., 2005).

O uso de co-solventes nos compartimentos doador e receptor tem sido empregado para aumentar a solubilidade de compostos altamente lipofílicos, como o co-solvente DMSO. Porém, a afinidade do composto lipofílico pelo tampão aumenta na presença de co-solventes, gerando valores de permeabilidade menores do que àqueles onde o co-solvente não é utilizado (SUGANO et al., 2001; DREASSI et al., 2009).

### *3.3.5 Camada de água estacionária*

A camada de água estacionária, corresponde a uma camada de água, muco e glicocálix e tem a característica de ser rígida, adjacente à parede intestinal, podendo ser uma barreira para a permeação por difusão passiva (THOMSON et al., 1984).



A fim de reduzir a espessura da camada de água estacionária no ensaio PAMPA, Wohnsland e Faller (2001) e Avdeef, Nielsen e Tsinman (2004) propuseram o uso de agitadores magnéticos que realizavam rotação individual nos poços das placas e conseguiram diminuir significativamente a camada de água estacionária.

No entanto, empregando consideração feita em 1995 por Adson e colaboradores, a agitação durante o ensaio PAMPA pode ser ineficaz devido ao fato do agitador magnético individual agitar somente um dos lados dos compartimentos.

### 3.4 Aplicações do ensaio PAMPA

O ensaio PAMPA é um modelo *in vitro* que pode prever a absorção *in vivo* de fármacos já existentes, de novas moléculas candidatas a fármaco e de substâncias bioativas. É normalmente empregado para a determinação da permeabilidade no TGI, na pele e barreira hematoencefálica e também na comparação de resultados obtidos com aqueles decorrentes de outros modelos.

O ensaio PAMPA e as células Caco-2 têm sido comumente utilizados para a avaliação da permeabilidade *in vitro* de novas moléculas. Li e colaboradores (2008) realizaram ensaios comparativos entre atividade e permeabilidade. A atividade foi expressa pela razão do coeficiente de inibição ( $K_i$ ) pela concentração inibitória a 90% (IC90),  $K_i/IC90$ , e a permeabilidade foi relacionada à taxa de permeação usando os modelos de permeabilidade em células Caco-2 e PAMPA. Os resultados mostraram uma correlação entre  $K_i/IC90$  e PAMPA de  $r^2=0,76$ , enquanto que a correlação observada entre  $K_i/IC90$  e permeabilidade em células Caco-2 foi de 0,29 (Li et al., 2008). Estes dados sugerem que, para alguns fármacos que possuem a via passiva como modo de permeação, o ensaio PAMPA pode ser mais preditivo do que a técnica de permeabilidade em células Caco-2.

Bermejo e colaboradores (2004) realizaram ensaios de permeabilidade intrínseca utilizando dezessete fluoroquinolonas. Nesta pesquisa, os filtros de PVDF foram impregnados com 20% de lecitina em n-dodecano e foi avaliada a existência de correlação entre os resultados obtidos a partir dos ensaios PAMPA e aqueles obtidos a partir de modelos de perfusão em intestino de ratos e a partir de cultura de células Caco-2 (BERMEJO et al., 2004). Os resultados mostraram que o PAMPA e a cultura de células Caco-2 foram igualmente capazes de mimetizar os resultados obtidos *in vivo* em ratos, demonstrando assim que os resultados obtidos com o ensaio PAMPA são plenamente equiparáveis a outros modelos.

Caldeira e colaboradores (2017) avaliaram a solubilidade em equilíbrio e a permeabilidade da substância bioativa eremantolida C. A permeabilidade foi analisada por método *in silico* e também *in vitro* pelo ensaio PAMPA. As condições do ensaio PAMPA foram: temperatura a 37°C, agitação a 50 rpm por 5 h. O compartimento doador foi composto por uma solução de eremantolida C em tampão pH 6,8 e o compartimento receptor consistiu em tampão fosfato pH 7,4. Eremantolida C teve seus resultados

de permeabilidade efetiva comparados aos fármacos furosemida e cloridrato de propranolol, fármacos geralmente usados como padrão de baixa e alta permeabilidade, respectivamente. A permeabilidade efetiva da eremantolida C foi de  $30,40 \times 10^{-6}$  cm/s, cerca de três vezes maior do que o cloridrato de propranolol ( $9,23 \times 10^{-6}$  cm/s). Os resultados mostraram que eremantolida C é uma substância de alta permeabilidade, o que foi corroborado com resultados obtidos *in silico* (CALDEIRA et al., 2017). O ensaio PAMPA prevê a absorção de substâncias *in vivo* com base nas suas características físico-químicas e possui resultados correlacionáveis com modelos computacionais que fazem o uso do mesmo método.

A combinação entre ensaio *in vitro* (PAMPA), *in situ* (perfusão de cérebro de rato) e o uso de descritores moleculares *in silico*, resultou em um estudo realizado por Dagenais e colaboradores, 2009, que originou o chamado *in combo*-PAMPA. Este modelo foi capaz de prever a permeabilidade passiva de dezenove fármacos através da barreira hematoencefálica, na ausência de efluxo mediado pela glicoproteína P-gp (DAGENAIS et al., 2009). A permeabilidade pela barreira hematoencefálica pode ser prevista pelo ensaio PAMPA de maneira satisfatória.

Sinkó e colaboradores (2012) propuseram o ensaio PAMPA utilizando membranas impregnadas com diferentes proporções de análogos sintéticos da ceramida, colesterol e ácido esteárico (análogas a cetramidas presentes no estrato córneo) em uma pesquisa com sete fármacos. Essa pesquisa teve como objetivo encontrar um modelo de fácil padronização, alta reprodutibilidade e custo benefício superior a metodologias *ex vivo* para estimar a penetração de um fármaco através das barreiras da pele (SINKÓ et al., 2012). O método PAMPA apresentou boa correlação para estudo de permeabilidade de fármacos e cosméticos. Além disso, o ensaio demonstrou ter correlação satisfatória com dados *in vivo*.

#### 4 | CONCLUSÃO

Estudos prévios mostraram que o ensaio PAMPA, assim como qualquer técnica, possui cuidados e limitações que devem ser avaliadas previamente a um experimento a fim de evitar fontes de erros indesejáveis. Este ensaio permite de forma rápida o cálculo da permeabilidade efetiva de fármacos e substâncias biologicamente ativas, que ocorre pela via passiva de absorção transcelular. Isto o torna um modelo muito pertinente para avaliação ou triagem prévia de um grande número de substâncias (KANSY et al., 1998). Com as variações das características do lipídeo, o PAMPA pode prever a absorção de fármacos em várias regiões do organismo mediante o ajuste de variáveis referentes ao objetivo pretendido.

O ensaio PAMPA, assim como qualquer técnica, possui cuidados e limitações que devem ser avaliadas previamente a um experimento a fim de evitar fontes de erros.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), ao Laboratório de Pesquisa e Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQ) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

ADSON, A.; BURTON, P. S.; RAUB, T. J.; BARSUHN, C. L.; AUDUS, K. L.; HO, N. F. H. **Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.84, p.1197–1204, 1995.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. **A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.** *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

AVDEEF, A. **Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state.** Wiley-Interscience, 2003. 287p.

AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; TAVELIN, S. **Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA  $pK_a^{flux}$  method.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 24 (2005) 333-349.

AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; FALLER, B.; KANSY, M.; SUGANO, K.; YAMAUCHIPAMPA, Y. **Critical factors for better predictions of absorption.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.96, p.2893-2909, 2007.

AVDEEF, A.; NIELSEN, P. E.; TSINMAN, O. **PAMPA – a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 22, p. 365-374, 2004.

AVDEEF, A.; STRAFFORD, M.; BLOCK, E.; BALOGH, M. P.; CHAMBLISS, W.; KHAN, I. **Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.14, p. 271-280, 2001.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. **Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. v. 44, p. 301-312, 2000.

BERMEJO, M.; AVDEEF, A.; RUIZ, A.; NALDA, R.; RUELL, J.A.; TSINMAN, O.; GONZÁLEZ, I.; FERNÁNDEZ, C.; SÁNCHEZ, G.; GARRIGUES, T.M.; MERINO, **PAMPA—a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.21, p.429-441, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011. **“Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências”.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 3 de agosto de 2011.

BUENO, M. M.; RECH, N. **Biofarmacotécnica: Princípios de Biodisponibilidade, Bioequivalência**

**Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos.** In: STORPIRTIS, S. et al. *Biofarmacotécnica*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap.2, p. 12-20.

CALDEIRA, T. G.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.; DEZANI, A. B.; SERRA, C. H. R.; SOUZA, J. **In silico and in vitro prediction of gastrointestinal absorption from potential drug eremantholide C.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 69 (2017), pp. 1468–1476.

DAGENAIS, C.; AVDEEF, A.; TSINMAN, O.; DUDLEY, A.; BELIVEAU, R. **P-glycoprotein deficient mouse in situ blood–brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38 (2009) 121–137.

DI, L.; KERNS, E. H.; FAN, K.; MCCONNELL, O. J.; CARTER, G. T. **High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, p.223–232, 2003.

DREASSI, E.; ZIZZARI, A. T.; FALCHI, F.; SCHENONE, S.; SANTUCCI, A.; MAGA, G.; BOTTA, M. **Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2009) 3712–3717.

EMA-EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on the investigation of bioequivalence.** London, 2010. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf)> Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

FDA. **Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System.** U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drugs Administration, Center for Drug Evaluation Research (CDER), 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf>> Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: Avaliação da Permeabilidade de Fármacos Empregando Culturas Celulares.** In: STORPIRTIS, S. et al. *Biofarmacotécnica*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 19, p. 204 – 211.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. **Physicochemical high throughput screening parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998.

LI, C.; NAIR, L.; LIU, T.; LI, F.; PICHARDO, J.; AGRAWAL, S.; CHASE, R.; TONG, X.; USS, A.S.; BOGEN, S.; NJOROGÉ, F. G.; MORRISON, R. A.; CHENG, K.C. **Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors.** *Biochemical Pharmacology*, v.75, p.1186–1197, 2008.

MEDDINGS, J.B.; THEISEN, S. **Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition.** *American Journal of Physiology*, v.256, p.G931–G940, 1989.

NIELSEN, P. E.; AVDEEF, A. **PAMPA – a drug absorption in vitro model 8. Apparent filter porosity and the unstirredwater layer.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 22, p. 33-41, 2004.

OTTAVIANI, G.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A. **Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability (2006) *J. Med. Chem.*, 49(13), 3948-3954.**

REIS, J. M. **Utilização de PAMPA como ferramenta para predizer a fração de absorção in vivo de fármacos e sua correlação com a taxa de metabolização in vitro.** São Paulo, 2013. 157p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SCHNEIDER, N. F. Z.; PADUA, R. ; KREIS, W. ; BRAGA, F. C. ; SIMÕES, C. M. O. **Standardization and application of PAMPA assay (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) to cardenolides permeability evaluation.** In: III International Symposium on Drug Discovery, 2013, Araraquara. III International Symposium on Drug Discovery, 2013.

SINKÓ, B.; GARRIGUES, T. M.; BALOGH, G. T.; NAGY, Z. K.; TSINMAN, O.; AVDEEF, A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. **Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration.** European Journal of Pharmaceutical Sciences 45 (2012) 698–707.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. **Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

SUGANO, K.; HAMADA, H.; MACHIDA, M.; USHIO, H.; SAITOH, K.; TERADA, K. **Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay.** International Journal of Pharmaceutics, v.228, p.181–188, 2001.

THOMSON, A. B. Mechanisms of intestinal adaptation: **unstirred layer resistance and membrane transport.** Can J Physiol Pharmacol. 1984; 62(6):678-82.

WHO -WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Technical Report Series, n° 937, 2006. Annex 8 –Proposal to waive invivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/ProposalWaiveVivoBioequivalenceRequirementsModelListEssentialMedicinesImmediateReleaseSolidOralDosageFormsTRS937Annex8.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/ProposalWaiveVivoBioequivalenceRequirementsModelListEssentialMedicinesImmediateReleaseSolidOralDosageFormsTRS937Annex8.pdf)> Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. **High-throughput permeability pH profile and high- throughput alkane/water log P with artificial membranes.** Journal of Medicinal Chemistry, v.44, p.923–993, 2001.

ZHU, C.; JIANG, L.; CHEN, T. M.; HWANG, K. K. **A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential.** European Journal of Medicinal Chemistry, v.37, n.5, p. 399-407, 2002.

## PRINCIPAIS MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS EM CRIANÇAS DO ESTADO DE RORAIMA

### **Ana Iara Costa Ferreira**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Victor Hugo Araújo Moraes**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Geovanna Ferreira Silva**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Yasmin de Freitas Santos**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Larissa Soares Cardoso**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Leila Braga Ribeiro**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Fabiana Nakashima**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Cynthia Dantas de Macedo Lins**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Antonio Carlos Sansevero Martins**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina, Boa Vista – Roraima

### **Bianca Jorge Sequeira**

Universidade Federal de Roraima, Curso de Medicina e Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Boa Vista – Roraima

### **Wagner do Carmo Costa**

Governo do Estado de Roraima, Vice-governadoria, Boa Vista – Roraima

**RESUMO:** As causas das malformações podem ser genéticas, ambientais ou multifatoriais. Os agentes teratogênicos são ambientais e podem ser físicos, químicos ou biológicos. Economicamente, o estado de Roraima se utiliza de atividades garimpeiras, agrícolas e pecuárias, sendo que os produtos poluentes dessas atividades como os metais pesados e agrotóxicos são lançados frequentemente nos solos e rios. Essa prática abusiva leva a contaminação de peixes, plantações, bem como pastagens destinadas aos rebanhos. Assim, rotineiramente a população de Roraima está sendo exposta aos teratógenos, incluindo as gestantes. O objetivo deste estudo foi conhecer as principais malformações congênitas em crianças do estado de Roraima. Trata-se de um estudo observacional descritivo, no qual foram consultados prontuários do Centro de Referência de Saúde da Mulher e do Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazaré dentre o período de três anos. Além disso, foram convidadas para participar da pesquisa gestantes de fetos com e sem malformações congênitas atendidas no Centro de Referência de Saúde da Mulher. Foram analisados 569 prontuários e aplicadas 50

fichas epidemiológicas, destes, 88 possuíam crianças com malformação congênita. Dentre as malformações, 72,7% foram malformações isoladas, 11,3% malformações associadas, 9,1% malformações múltiplas e 6,9% síndromes genéticas. As principais malformações congênitas observadas nessa população foram as anomalias do sistema nervoso (39,8%) e as cardiovasculares (25%). Acredita-se que os resultados obtidos a partir dessa pesquisa, oferecerão subsídios para propor medidas que visam aumentar o conhecimento da população sobre os defeitos congênitos no estado de Roraima.

**PALAVRAS-CHAVE:** Embriologia; Gravidez; Anormalidades congênitas.

**ABSTRACT:** The causes of the malformations can be genetic, environmental or multifactorial. Teratogenic agents are environmental and may be physical, chemical or biological. Economically the state of Roraima uses garimpeiras, agricultural and livestock activities, and the pollutants of these activities, such as heavy metals and agrochemicals, are frequently released in soils and rivers. This abusive practice leads to contamination of fish, plantations, and pastures for herds. Thus, the Roraima population is routinely being exposed to teratogens, including pregnant women. The objective of this study was to know the main congenital malformations in children of the state of Roraima. This is a descriptive observational study, in which the medical records of the Reference Center for Women's Health and the Maternal and Child Hospital Nossa Senhora de Nazaré were consulted within the three-year period. In addition, pregnant women from fetuses with and without congenital malformations attended at the Reference Center for Women's Health were invited to participate in the study. A total of 569 medical records and 50 epidemiological records were analyzed, of which 88 had children with congenital malformation. Among the malformations, 72.7% were isolated malformations, 11.3% were associated malformations, 9.1% were multiple malformations and 6.9% were genetic syndromes. The main congenital malformations observed in this population were abnormalities of the nervous system (39.8%) and cardiovascular abnormalities (25%). It is believed that the results obtained from this research, will offer subsidies to propose measures that aim to increase knowledge of the population about the congenital defects in the state of Roraima.

**KEYWORDS:** Embryology; Pregnancy; Congenital abnormalities.

## 1 | INTRODUÇÃO

Malformação congênita diz respeito a “um defeito morfológico de um órgão, parte dele ou de uma região maior do corpo resultante de um processo do desenvolvimento intrinsecamente anormal”. Esta, afeta negativamente o desenvolvimento normal da criança, e em muitos dos casos, traz graves prejuízos à sua saúde (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

As malformações podem ser resultantes de fatores genéticos, ambientais ou multifatoriais (HOROVITZ; LLERENA-JR; MATTOS, 2005). Os defeitos congênitos ocasionados por fatores genéticos podem ter origem a partir das anomalias

cromossômicas numéricas ou estruturais e através de genes mutantes (PATIL; RAO; MAJUMDAR, 2014). Os teratógenos estão inseridos dentro dos fatores ambientais, contudo, a maioria das malformações decorrentes dos agentes teratogênicos podem ser evitadas desde que não haja a exposição materna (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002; GILBERT-BARNESS, 2010; MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

Está determinado que o momento crítico para a gestante frente aos agentes teratogênicos ocorre durante o pico da diferenciação celular e da morfogênese do embrião (GILBERT-BARNESS, 2010). Porém, ainda que se saiba que o período crítico se refere a fase embrionária, é imprescindível lembrar que algumas substâncias podem desempenhar um papel teratogênico mesmo quando empregadas depois deste período (ZOMERDIJK, et al. 2014; BOLTMAN-BINKOWSK, 2016). Já a herança multifatorial é determinada por uma combinação dos fatores genéticos e ambientais (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002).

A investigação epidemiológica, contextualizada sobre as malformações, está relacionada com a determinação de como as anormalidades específicas podem associar-se com determinada circunstância, condição, tempo e lugar (KALTER, 2003). No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre o assunto são reduzidos e se baseiam principalmente em dados hospitalares (NUNES et al., 2010; LIMA et al., 2018).

No estado de Roraima ainda não existem estudos disponíveis sobre o tema, embora os indivíduos residentes nesta região estejam interagindo direta ou indiretamente com vários tipos de ambientes propícios ao desenvolvimento destas anormalidades. Nessa região do país, observa-se a presença de áreas de garimpo, onde existe elevada concentração de metais pesados (DINIZ; SANTOS, 2005), uma diversidade de plantas está inserida neste espaço da Amazônia setentrional, sendo frequentemente, algumas espécies, consumidas pela população local na forma de remédios caseiros (LUZ, 2001), e a própria flora da região de Roraima e o clima propiciam a proliferação de mosquitos que transmitem agentes infecciosos, tais como os vírus causadores da Dengue, Zika e Chikungunya (MANIERO et al., 2016). Diante da importância dos defeitos congênitos na população em geral e pela escassez de trabalhos no Estado, o presente estudo teve por objetivo conhecer as principais malformações congênitas em crianças do estado de Roraima.

## 2 | METODOLOGIA

Trata-se de um estudo observacional descritivo que foi aprovado pela Diretoria de Ensino e Pesquisa (DEP) do Hospital Materno Infantil Nossa Senhora de Nazaré (HMINSN), pela Diretoria do Centro de Referência de Saúde da Mulher (CRSM) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Federal de Roraima – CEP/UFRR (2.366.062).

Inicialmente, foi realizado um levantamento de dados de prontuários de um período de três anos (2015-2018), no HMINSN e no CRSM para averiguar os tipos



de malformações presentes no estado de Roraima. Além disso, foram convidadas para participar da pesquisa gestantes de fetos com e sem malformações congênicas atendidas no CRSM. As participantes selecionadas receberam explicação detalhada sobre o objetivo do estudo e a seguir, foram convidadas a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de assentimento, quando necessário. Após a assinatura, as gestantes foram submetidas a uma ficha de dados epidemiológicos.

Gestantes menores que 12 anos de idade e maiores do que 45, bem como o grupo de vulneráveis (pacientes indígenas, portadoras do vírus da imunodeficiência humana e imigrantes) foram excluídas desta pesquisa. Os dados dos prontuários do HMINSN e do CRSM, mais as informações coletadas das gestantes foram analisadas através do programa Microsoft Excel.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 569 prontuários do período de 2015 a 2018 no HMINSN e no CRSM de recém-nascidos com algum grau de comprometimento após o parto e foram aplicadas 50 fichas de dados epidemiológicos em gestantes atendidas no CRSM. Desses prontuários e fichas, 88 (14,2%) apresentavam crianças com malformação congênita.

Para facilitar a análise, as anomalias foram classificadas em quatro grupos: malformações isoladas, malformações associadas, malformações múltiplas e síndromes genéticas. As isoladas são as anomalias que afetam um único sistema, as associadas comprometem dois sistemas e as múltiplas afetam três ou mais sistemas do corpo humano (FONTURA; CARDOSO, 2014).

Sessenta e quatro (72,7%) dos indivíduos acometidos apresentaram malformações isoladas, 10 (11,3%) malformações associadas, 8 (9,1%) malformações múltiplas e 6 (6,9%) casos de síndromes genéticas (gráfico 1).

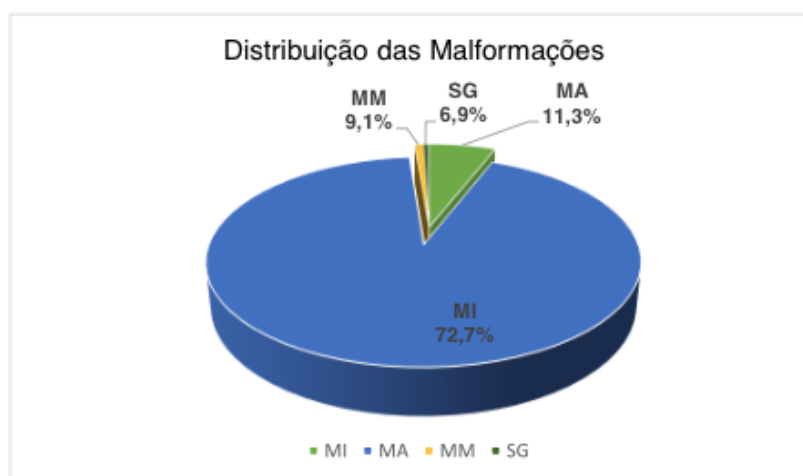


Gráfico 1: Distribuição das malformações congênicas de acordo com os grupos

\*MI= malformações isoladas, MA= malformações associadas, MM= malformações múltiplas e SG= síndromes genéticas.

A partir desses dados pode-se observar ainda que os casos de anomalias que afetam o sistema nervoso são prevalentes entre as crianças nascidas em Roraima, representando 39,8% (N=35) do total de malformações congênitas. Entre as malformações do sistema nervoso, 80% (N=28) se manifestaram de forma isolada, 17,1% (N=6) em associação e 2,9% (N=1) múltipla.

As malformações congênitas que afetam o sistema cardiovascular ganharam um segundo papel de destaque na pesquisa, atingindo 25% (N=22) da população estudada. Sendo que 63,7% (N=14) se apresentaram de forma isolada, 22,7% (N=5) em associação e 13,6% (N=3) múltipla. Todas as informações supracitadas estão inseridas na tabela 1, juntamente com os dados das demais malformações encontradas no estudo.

<b>Sistema/área comprometido com a malformação</b>	<b>N° MI</b>	<b>N° MA</b>	<b>N° MM</b>	<b>N° Total</b>	<b>% (n°88)</b>
Neurológico	28	6	1	35	39,8
Cardiovascular	14	5	3	22	25
Craniofacial	6	4	3	13	14,8
Parede abdominal anterior	9	1	1	11	12,5
Geniturinária	4	3	1	8	9,1
Gastrointestinal	3	1	2	6	6,8
Osteomuscular	-	-	5	5	5,7
Pulmonares	-	-	2	2	2,3
Cisto Abdominal	-	-	2	2	2,3

Tabela 1: Distribuição das malformações congênitas encontradas em Roraima, Brasil

\*Devido a presença de malformações associadas e múltiplas, a soma do n. total e do percentual final difere do número absoluto (n.88) de casos.

Com relação aos pacientes que apresentaram síndromes genéticas (tabela 2), não foi possível definir os tipos de alterações fisiológicas que eles apresentaram ao nascimento, devido a escassez de informações nos prontuários médicos.

<b>Síndromes genéticas</b>	<b>N°</b>	<b>(N°6) %</b>
Down	3	49,9
Noonan	1	16,7
Turner	1	16,7
Osteocondrodisplasia	1	16,7

Tabela 2: Distribuição das síndromes genéticas

Esses achados se assemelham aos encontrados no berçário anexo à Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde os pesquisadores também constataram que as malformações neurológicas foram prevalentes (PIMENTA; CALIL; KREBS, 2010). No entanto, Pimenta e colaboradores

determinaram que as anomalias do sistema urogenital foram a segunda causa de malformações entre a população estudada, porém, ambos os estudos trazem as anomalias craniofaciais como a terceira causa de malformações entre as crianças. Outro estudo que se aproxima do realizado em Roraima, demonstra que os defeitos do sistema cardiovascular, seguido das alterações do sistema nervoso central, são as principais causas de obtido de recém-nascidos e menores de um ano com malformações congênitas no estado de Pernambuco (ARRUDA; AMORIM; SOUZA, 2008).

Diferente dos resultados encontrados para o estado de Roraima, mas que se destaca por se repetir em outros Estados (São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Pernambuco, Maranhão e Ceará) brasileiros, é a categorização em primeiro lugar das malformações osteomusculares, seguidas das alterações neurológicas (NASCIMENTO et al., 2006; GUERRA et al., 2008; MELO et al., 2010; SILVA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014; FONTURA; CARDOSO, 2014). A partir desses dados, é possível inferir que a distribuição das malformações ocorre de forma variada, de acordo com a área de estudo. Além do mais, pode-se observar que essa variação ocorre até mesmo em localizações diferentes dentro de um mesmo Estado (MELO et al., 2010; POLITA et al., 2013). Isso se dá devido ao ambiente em que a gestante está inserida, bem como sua carga genética e hábitos de vida, visto que o risco para se gerar uma criança com malformação pode ser genético, ambiental ou multifatorial (HOROVITZ; LLERENA-JR; MATTOS, 2005).

Quando analisamos as principais malformações encontradas em Roraima, pode-se deduzir que o ambiente (fauna e flora), as práticas laborais (garimpo, agricultura e pecuária) e a cultura (uso de plantas medicinais) do Estado estão influenciando direta ou indiretamente no desenvolvimento dessas anomalias (LUZ, 2001; DINIZ; SANTOS, 2005; MANIERO et al., 2016). Afinal, o sistema nervoso e o cardiovascular se desenvolvem de forma complexa e prolongada, tornando-se suscetíveis a erros do desenvolvimento tanto no período embrionário como fetal (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

#### **4 | CONCLUSÃO**

Pode-se observar que as principais malformações encontradas em crianças do estado de Roraima acometem o sistema nervoso e cardiovascular. Acredita-se ainda que os resultados obtidos a partir dessa pesquisa, oferecerão subsídios para propor medidas que visam aumentar o conhecimento da população sobre os defeitos congênitos em Roraima.

#### **REFERÊNCIAS**

ARRUDA, T.A.M.; AMORIM, M.M.R.; SOUZA, A.S.R. Mortalidade determinada por anomalias

congênitas em Pernambuco, Brasil, de 1993 a 2003. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 2, p. 122-126, 2008.

BOLTMAN-BINKOWSK, H. A systematic review: are herbal and homeopathic remedies used during pregnancy safe? **Curationis**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2016.

DINIZ, A.M.A.; SANTOS, R.O. O vertiginoso crescimento populacional de Roraima e seus impactos socioambientais. **Cad de Geografia**, v. 15, n. 25, p. 23-44, 2005.

FONTOURA, F.C.; CARDOSO, M.V.L.M.L. Associação das malformações congênitas com variáveis neonatais e maternas em unidades neonatais numa cidade do nordeste brasileiro. **Texto Contexto Enferm**, v. 23, n. 4, p. 907-914, 2014.

GILBERT-BARNES, E. Review: teratogenic causes of malformations. **Ann Clin Lab Sci**, v. 40, n. 2, p. 99-114, 2010.

GUERRA, F.A.R.; LLERENA-JR., J.C.; GAMA, S.G.N.; CUNHA, C.B.; THEME-FILHA, M.M. Defeitos congênitos no Município do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação através do SINASC (2000-2004). **Cad Saúde Pública**, v. 24, n. 1, p. 140-149, 2008.

HOROVITZ, D.D.G.; LLERENA-JR, J.C.; MATTOS, R. A. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. **Cad de Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p. 1055-1064, 2005.

KALTER, H. Teratology in the 20th century: environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicol Teratol**, v. 25, p. 131-282, 2003.

LIMA, N.A.; SILVA, C.F.; SANTOS, M.M.; FERNANDES, T.A.A.M.; LUCENA, E.E.S. Perfil epidemiológico das malformações congênitas em recém-nascidos no estado do Rio Grande do Norte no período de 2004 a 2011. **R bras ci Saúde**, v. 22, n. 1, p. 45-50, 2018.

LUZ, F.J.F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Hortic bras**, v. 19, n. 1, p. 88-96, 2001.

MANIERO, V.C.; SANTOS, M.O.; RIBEIRO, R.L.; OLIVEIRA, P.A.C.; SILVA, T.B.; MOLERI, A.B.; MARTINS, I.R.; LAMAS, C.C.; CARDOZO, S.V. Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 118-145, 2016.

MELO, W.A.; ZURITA, R.C.M.; UCHIMURA, T.T.; MARCON, S.S. Anomalias congênitas: fatores associados à idade materna em município sul brasileiro, 2000 a 2007. **Rev Electr Enf**, v. 12, n. 1, p. 73-82, 2010.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N.; TORCHIA M.G. Embriologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 311 p.

NASCIMENTO, L.F.C.; PINTO, C.O.; PROENÇA, F.P.; GOTLIEB, S.L.D. Prevalência de anomalias congênitas em São José dos Campos, São Paulo, em 2001. **Rev Paul Pediatría**, v. 24, n. 1, p. 47-51, 2006.

NUNES, Maria Diniz. **Perfil epidemiológico das malformações congênitas em recém-nascidos no estado do Tocantins no período de 2004 a 2008**. Brasília, 2010. 109p. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2010.

PATIL, S.; RAO, R.S.; MAJUMDAR, B. Chromosomal and multifactorial genetic disorders with oral manifestations. **J Int Oral Health**, v. 6, n. 5, p. 118-125, 2014.

PIMENTA, M.S.; CALIL, V.M.L.T.; KREBS, V.L.J. Perfil das malformações congênitas no berçário anexo à maternidade do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 1, p. 50-56, 2010.

POLITA, N.B.;1, FERRARI, R.A.P.; MORAES, P.S.; SANT'ANNA, F.L.; TACLA, M.T.G.M. Anomalias congênitas: internações em unidade pediátrica. **Rev Paul Pediatr**, v. 31, n. 2, p. 205-210, 2013.

RODRIGUES, L.S.; LIMA, R.H.S.; COSTA, L.C.; BATISTA, R.F.L. Características das crianças nascidas com malformações congênitas no município de São Luís, Maranhão, 2002-2011. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 23, n. 2, p. 295-304, 2014.

SCHÜLER-FACCINI, L.; LEITE, J.C.L.; SANSEVERINO, M.T.V.; PERES, R.M. Avaliação de teratogênicos na população brasileira. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SILVA, S.R.G.; MARTINS, J.L.; SEIXAS, S.; SILVA, D.C.G.; LEMOS, S.P.P.; LEMOS, P.V.B. Defeitos congênitos e exposição a agrotóxicos no Vale do São Francisco. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 1, p. 20-26, 2011.

ZOMERDIJK, I.M.; RUITER, R.; HOUWELING, L.M.A.; HERINGS, R.M.C.; STRAUS, S.M.J.M.; STRICKER, B.H. Dispensing of potentially teratogenic drugs before conception and during pregnancy: a population-based study. **BJOG**, v. 122, p. 1119-1129, 2014.

## PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS EFETORAS, CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E BALB-C INFECTADOS *in vitro* COM *Leishmania infantum*

### **Rafaela Miranda Barbosa**

Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG),  
Passos, Minas Gerais, Brasil.

### **Marcela Rezende Lemes**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Lara Beatriz Ferreira**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Laura Caroline de Faria**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Paula Tatiana Mutão Ferreira**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Jonatas da Silva Catarino**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Rafael Obata Trevisan**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Amanda Freire De Assis Riccardi**

Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG),  
Passos, Minas Gerais, Brasil.

### **Helioswilton Sales de Campos**

Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia,  
Goiás, Brasil.

### **Juliana Reis Machado e Silva**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Carlo José Freire de Oliveira**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Virmondes Rodrigues Junior**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

### **Camila Belfort Piantino Faria**

Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG),  
Passos, Minas Gerais, Brasil.

### **Marcos Vinícius Da Silva**

Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
(UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

**RESUMO:** A leishmaniose visceral é uma patologia de interesse mundial, pois seus portadores apresentam elevadas taxas de morbimortalidade. Nas Américas e no Mediterrâneo, o principal agente etiológico causador dessa doença é a *Leishmania infantum*, parasita intracelular obrigatório transmitido através do repasto sanguíneo das fêmeas dos flebotomíneos, que tem a capacidade de disseminar nos órgãos internos do hospedeiro, gerando graves complicações. Dentre os modelos animais utilizados para estudo desse parasita, destaca-se o murino. Estudos mostram que, nessa infecção, linhagens distintas de uma mesma espécie podem apresentar diferentes respostas imunológicas. Apesar dos recentes avanços, ainda há necessidade de novas estratégias de controle e tratamento dessa doença.

Sendo assim, o presente trabalho avaliou diferentes respostas imunológicas em macrófagos intraperitoneais obtidos de camundongos Balb-c e C57Bl/6 infectados *in vitro* com *Leishmania infantum*, a fim de observar quais respostas se associam mais àquelas observadas no organismo humano. As metodologias empregadas foram as específicas para cada variável analisada. A produção de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  e ROS foram significativamente maiores nos macrófagos provenientes da linhagem C57Bl/6 quando comparado à linhagem Balb-c. Assim, pressupõe-se que os camundongos da linhagem C57Bl/6, apresentam capacidade de controlar de forma eficaz a leishmaniose visceral causada pela *L. infantum* em virtude da produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias e intermediários reativos do nitrogênio. Por outro lado, evidenciou-se que a linhagem Balb-c foi mais susceptível ao desenvolvimento da doença, se mostrando melhor opção para estudos em que a replicação e desenvolvimento do parasita se fazem necessário.

**PALAVRAS CHAVES:** *Leishmania infantum*, Macrófagos, Balb-c, C57Bl/6.

**ABSTRACT:** Visceral leishmaniasis is a worldwide interest pathology because of its high morbidity and mortality rates. *Leishmania infantum* is the most common etiological agent in the Americas and Mediterranean. It is an obligate intracellular parasite transmitted by the female sandfly and has the ability to disseminate to internal organs. One of the best models to study this disease is the murine model. Studies show that different strains of the same leishmania may present different immune responses. Even with all the recent findings there is still a need for new strategies for control and treatment of this disease. Thus, the present study consists of the analysis of different immunological responses in phagocyte strains obtained in Balb-c and C57Bl/6 mice infected *in vitro* with *Leishmania infantum*, in order to observe which responses are associated more with those observed in the human organism. Our findings demonstrated that the production of IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  and ROS were significantly higher in macrophages from the C57Bl/6 lineage when compared to the Balb-c lineage. Regarding NO production, there was no significant difference between the two strains. Based on the findings in question it is assumed that mice of the C57Bl/6 lineage present the ability to effectively control visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* due to the fact that it produces more proinflammatory cytokines by controlling infection. However, the Balb-c strain is more susceptible to the development of the disease, showing a better option for studies in which the replication and development of the parasite is necessary.

**KEYWORDS:** *Leishmania infantum*, Macrophages, Balb-c, C57Bl/6.

## 1 | INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por cerca de 20 protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo no mamífero (DE FREITAS et al., 2016). Clinicamente as leishmanioses são divididas em quatro formas, sendo elas a

leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e a leishmaniose visceral (LV) (AKHOUNDI et al., 2016). Em 2016 foram registrados 220 mil novos casos dessas doenças no mundo, sendo 20 mil casos da LV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018)

A LV é a forma mais agressiva da doença e se não tratada tem chance de 95% de óbito (READY, 2014) a neglected tropical disease. These parasitic protozoans are usually transmitted between vertebrate hosts by the bite of blood sucking female phlebotomine sand flies. This review focuses on the two parasites causing most human visceral leishmaniasis (VL. Ela é causada pelos parasitos do complexo *L. donovani*, sendo a *L. donovani* o agente etiológico na Índia e África Central e a *L. infantum* nas Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e mediterrâneo (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011) surveillance and control of cross-species disease, education, and research into disease pathogenesis, diagnosis, therapy and vaccination. The concept encompasses the human population, domestic animals and wildlife, and the impact that environmental changes ('environmental health'. Durante muito tempo, acreditou-se que essa doença era causada por três espécies: *Leishmania donovani* (*L. donovani*), *L. infantum* e *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*). Entretanto, *L. infantum* e *L. chagasi* foram consideradas como sendo uma única espécie, por compartilharem do mesmo material genético (MOMEN; GRIMALDI JÚNIOR; DEANE, 1987).

Diferentemente das espécies que causam lesões cutâneas, em que a proliferação dos parasitos permanece contida no local da lesão, na leishmaniose visceral esses protozoários têm a capacidade de disseminar para outros órgãos como fígado, baço e medula óssea, gerando problemas graves como hepatoesplenomegalia, febre alta, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Essas alterações são consideradas os sintomas mais característicos da fisiopatologia da doença (FORESTIER, 2013).

A transmissão da *Leishmania* ocorre por meio do repasto sanguíneo da fêmea hematófaga do flebotomíneo (GOMES et al., 2018). Ao se alimentar de um hospedeiro, uma fêmea saudável pode ingerir fagócitos infectados, os quais se rompem no interior de seu intestino médio, liberando formas amastigotas que logo se dividem e transformam em formas promastigotas (NEVES, 2016). O sangue ingerido é envolto pela matriz peritrófica, a qual se rompe entre 48 e 72 horas após a alimentação e libera essas formas, que migram para o intestino anterior do inseto, tornando-se formas promastigotas metacíclicas, as quais são infectantes para o hospedeiro vertebrado. Ao realizar o repasto, as formas infectantes presentes no intestino anterior do inseto entram em contato com o sangue do hospedeiro definitivo e lá podem ser internalizadas por fagócitos e se diferenciarem em formas amastigotas (BATES, 2007; NEVES, 2016).

Os macrófagos são células do sistema imune inato, responsáveis por diversas funções do organismo como a fagocitose - processo essencial para a reciclagem de nutrientes, homeostase do organismo (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, 2012), defesa contra patógenos, produção de citocinas, apresentação de antígenos às células da imunidade adaptativa, entre outras (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H;



PILLAI, 2012). Esse tipo celular é encontrado em todos os tecidos, e se desenvolvem a partir de células mielóides na medula óssea (SIEWEKE et al., 2013).

A *L. infantum* encontra no interior dos macrófagos um lugar ideal para sobreviver, pois após escaparem do sistema fagocítico dessa célula, estas têm à sua disposição os nutrientes necessários à sobrevivência e proliferação dentro do organismo (FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

Ao observar esse processo mais detalhadamente, como já foi descrito por estudos anteriores, após a inoculação da *L. infantum* pelo flebotomíneo, o parasito é fagocitado pelos macrófagos do tecido. Embora muitos deles sejam destruídos pelos mecanismos de fagocitose, alguns escapam do poder microbicida do fagolisossomo, transformando-o em um vacúolo parasitóforo que abriga o parasito (LODGE; DESCOTEAUX, 2008). Depois de alojados nesse vacúolo, os parasitos se transformam em amastigotas, as quais são capazes de se multiplicar por fissão binária. A partir do momento em que a célula hospedeira fica sobrecarregada por parasitos, esta sofre apoptose e libera as formas amastigotas que contaminam outros macrófagos (REAL et al., 2014). O ciclo de vida é concluído quando um flebotomíneo ingere sangue contendo amastigotas ou fagócitos infectados (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

Sabe-se que, assim como em inúmeras outras infecções, as células do sistema imune inato são cruciais para uma resposta imunológica eficaz (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, 2012). Na resposta imunológica gerada pelos macrófagos durante as primeiras horas da infecção por *Leishmania spp.*, os principais mecanismos observados são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (FANG, 2004; ILES; FORMAN, 2002). Esse processo é rigorosamente regulado pelo organismo e tem como finalidade eliminar o patógeno sem danificar, ou danificando o mínimo, a célula hospedeira. Este sofre influência direta do processo de fagocitose, envolvendo várias enzimas. Dentro desse contexto, é observado que a enzima sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) é de suma importância, sendo responsável pela produção de NO nos fagolisossomas (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009; ROSSI; FASEL, 2018).

É sabido que os parasitos *Leishmania spp.* apresentam um escudo de lipofosfoglicano (LPG), o qual é capaz de gerar maior resistência frente aos mecanismos imunológicos, principalmente aqueles mediados pelos macrófagos no fagolisossoma (CARNEIRO et al., 2018). Ademais, estudos já mostraram que esse parasito apresenta a capacidade de secretar e induzir os macrófagos a produzirem arginase, que compete com iNOS, regressando a produção de NO. No final do processo, é observado que os macrófagos produzem os nutrientes essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento dos parasitos, além de deixarem de produzir intermédios para eliminá-los (GAUR et al., 2007).

A ativação adequada dos macrófagos elimina o parasito, enquanto o oposto leva à reação inflamatória crônica (BRANDONISIO et al., 1996). Há estudos que mostram que nessa fase da infecção, os parasitos modulam os macrófagos a ponto de impedir

que este seja ativado, criando um reservatório de infecção que é protegido do ataque imunológico (JANEWAY, CHAERLES A.; TRAVERS, PAUL; WALPORT, MARK; SHLOMCHIK, 2001).

Evidências demonstram que o parasito tem a capacidade de modular o metabolismo mitocondrial do macrófago infectado. Tal fato pode ser explicado pela *L. infantum* sequestrar o eixo SIRT1-AMPK (do inglês: *AMP-activated protein kinase - histone/protein deacetylase*), fazendo com que, durante a infecção, os macrófagos mudem de um metabolismo glicolítico inicial para uma fosforilação oxidativa (MOREIRA et al., 2015).

Estudos indicam que quando há presença concomitante de LPS com o parasito *Leishmania spp.*, as células de defesa são capazes de combatê-lo melhor, principalmente no âmbito da produção de NO, gerando melhores resultados na resposta imune, e conseqüentemente, na redução da carga parasitária (PANARO et al., 2001).

Apesar de serem observados estudos que visem cada vez mais a compreensão de como a *Leishmania spp.* é capaz de modular as respostas imunológicas dos macrófagos, é perceptível que o conhecimento das respostas das citocinas derivadas de macrófagos e os mecanismos moleculares envolvidos ainda são limitados e necessitam de mais estudos para serem melhor compreendidos (LAPARA; KELLY, 2010).

Sabe-se que para eliminação do parasito nos macrófagos, são indispensáveis a produção de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias como a IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1, as quais são capazes de gerar recursos imunológicos capazes de eliminar ou atenuar a infecção no interior dessas células. Porém, estudos já mostraram que os parasitos *L. infantum* apresentam a capacidade de impedir ou atenuar de forma significativa a produção desses mecanismos (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; LAPARA; KELLY, 2010; TEIXEIRA et al., 2006).

O extenso uso de camundongos em estudos *in vivo* e o uso de suas células em estudos *in vitro* se deve à popularidade e sucesso na pesquisa biomédica. Esse fato pode ser explicado pela existência de uma grande coleção de linhagens endogâmicas e pela facilidade de manipular a forma de acasalamento, gerando uma prole com um genótipo altamente parecido, facilitando o estudo de variáveis (SZATKIEWICZ et al., 2008). Também é importante destacar a simplicidade de mantê-los, outra vantagem desse modelo (GUÉNET, JEAN-LOUIS; BONHOMME, 2003).

Dentre os modelos mais utilizados na pesquisa *in vivo* de parâmetros imunológicos - ou não - da infecção por *Leishmania spp.*, destaca-se o murino. Sabe-se que os organismos reagem de forma distinta quando expostos a espécies diferentes de *Leishmania spp.*. Entretanto, diferentes espécies de camundongos produzem respostas distintas, frente a diferentes variáveis da infecção, mesmo quando acometidos pela mesma espécie do patógeno, como o aqui estudado. Com isso, acentua-se a importância de conhecer essas diferenças, a fim de que o pesquisador seja capaz de

determinar um modelo experimental adequado ao estudo que se pretende realizar (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Camundongos das linhagens Balb-c e C57Bl/6 são hospedeiros experimentais importantes para estudos frente o desenvolvimento da doença e testes vacinais (NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; DE ALMEIDA, 2016). Contudo, é essencial conhecer as limitações e benefícios que cada linhagem apresenta quanto a infecção do microrganismo estudado, para que as pesquisas que serão posteriormente realizadas sejam com os melhores modelos experimentais possíveis.

## **2 | METODOLOGIA**

### **2.1 Animais**

Trata-se de estudo do tipo experimental, no qual foram utilizados macrófagos provenientes de camundongos das linhagens Balb-c e C57Bl/6, com idade entre 6 e 8 semanas, sendo cinco animais de cada linhagem. Os camundongos foram obtidos no biotério central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e os experimentos realizados no laboratório de Imunoparasitologia da mesma Universidade, em Uberaba, Minas Gerais. O trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da UFTM, registrado sob o nº 23085.002402/2018-99.

### **2.2 Obtenção dos macrófagos e infecção**

Para obtenção dos macrófagos, inoculou-se pela via intraperitoneal de cada camundongo, 1 mL de Tioglicolato a 4%, aplicado no lado direito inferior do peritônio. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados e as células presentes no compartimento peritoneal, coletadas através de lavado intraperitoneal, utilizando-se 3 mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) estéril. O lavado coletado foi centrifugado a 400 G , durante 10 minutos, e ressuspenso em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (RPMI 5%) na concentração de  $2 \times 10^6$ /ml.

Após,  $2 \times 10^5$  macrófagos foram adicionados às placas de microtitulação e mantidos nas seguintes condições: sem estímulo (Meio), estimulados com 1ug/mL de LPS (LPS), na presença de *L. infantum* CEPA IOCL2906 MOI 3:1 (*L. infantum*), e na presença concomitante de *L. infantum* e LPS, nas condições descritas anteriormente (*L. infantum*+LPS). As culturas foram mantidas à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 4h, para quantificação de ROS e NO, e por 24h, para quantificação de NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 e CCL-2 (MCP-1). Após cada tempo, os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados à -20°C para posterior análise

### **2.3 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)**

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio foi avaliada pela marcação intracelular com a sonda DCFDA (10uM/poço) sensível especialmente aos radicais

hidroxilo e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foram adicionados aos poços de cada placa estímulos específicos, conforme descrito anteriormente. A produção de ROS foi avaliada após 4 horas, mediante fluorescência emitida em 517 nm, após excitação em 488 nm, em leitor de microplacas EnSpire multimode plate reader.

## 2.4 Quantificação de Óxido nítrico (NO)

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito, resultante da oxidação do NO nos sobrenadantes de cultura, previamente coletados nos tempos de 4 e 24h. Adicionou-se a uma placa de 96 poços 50 uL do sobrenadante de cultura, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Para a confecção de uma curva-padrão, procedeu-se com diluições seriadas de nitrito de sódio. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro (FACSCalibur) foi realizada a 450 nm.

## 2.5 Dosagem de citocinas e quimiocinas

O método utilizado para a quantificação destas foi o Cytometric Bead Array (CBA). Essa técnica permite a dosagem de um conjunto de citocinas e quimiocinas na mesma amostra. Neste trabalho foram quantificadas: IL-6, MCP-1 e TNF- $\alpha$ . O princípio da análise consiste na junção de diferentes beads com anticorpos de captura para cada analito que se deseja dosar. As beads que se ligam às citocinas/quimiocinas emitem fluorescências de intensidades diferentes para cada variável pesquisada. A quantificação das mesmas foi realizada através da citometria de fluxo, que captou as diferentes fluorescências de cada tipo de citocina/quimiocina, e reportou as concentrações em relação à curva padrão confeccionada paralelamente com citocinas e quimiocinas recombinantes.

## 2.6 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas considerando a produção das culturas na presença de *L. infantum*, subtraída da produção de seu respectivo controle basal: *L. infantum* - Meio e *L. infantum*+LPS – LPS. As análises estatísticas foram realizadas no ambiente de desenvolvimento integrado para cálculos estatísticos e gráficos “R” (<https://www.r-project.org/>) por meio dos algoritmos dedicados do pacote Stats versão 3.6.0 (R CORE TEAM, 2018).

As análises estatísticas foram realizadas no ambiente de desenvolvimento integrado para cálculos estatísticos e gráficos “R” (<https://www.r-project.org/>) por meio dos algoritmos dedicados do pacote Stats versão 3.6.0 (R CORE TEAM, 2018).

As dosagens de cada uma das variáveis quantitativas – NO, citocinas e quimiocinas – foram submetidas ao teste de Análise de Variância com dois fatores (ANOVA two-way) para indicar dependência das variáveis qualitativas Linhagem e/ou Estímulo. Prosseguiu-se, então com o teste a posteriori utilizando-se o teste de Tukey Honest Significant Differences (Tukey HSD) para localizar os padrões das diferenças

com intervalo de confiança  $\geq 95\%$  (p valor  $\leq 0,05$ ).

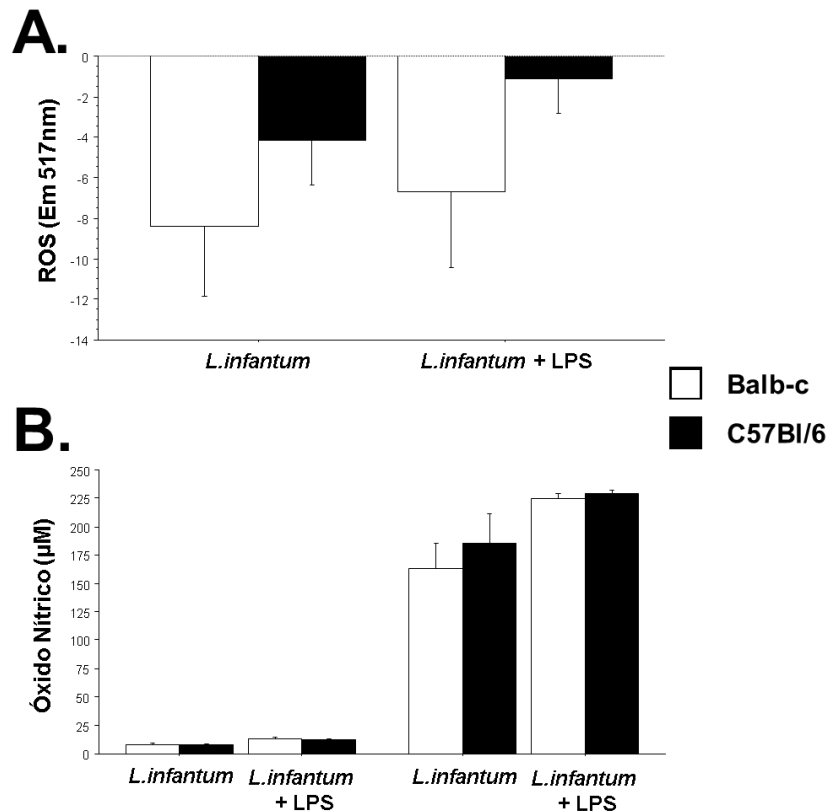
A média da resposta aos diferentes tratamentos em cada fator foi traçada em gráficos de interação bidirecional utilizando-se os algoritmos do pacote ggpubr versão 0.1.0 (KASSAMBARA, 2018).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que a resposta imunológica da leishmaniose *in vivo* e *in vitro* depende, dentre outros fatores, de um delicado equilíbrio de moléculas efetoras e várias citocinas e quimiocinas, pró e anti-inflamatórias (LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016). Neste sentido, a susceptibilidade aumentada ao parasito *L. infantum* dos camundongos da linhagem Balb-c já foi descrita em alguns estudos. Achados da literatura demonstraram que a capacidade de produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) por esses camundongos é significativamente maior (ROLÃO et al., 2007). Complementar a este estudo foi evidenciado que a linhagem dos camundongos C57Bl/6 é mais resistente à leishmaniose visceral quando comparado ao Balb-c, tanto os infectados por *L. donovani* quanto por *L. infantum* (BODHALE, N. P.; PAL, S.; KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, N.; BHATTACHARYYA, 2018). Contudo, o efeito desta infecção nas células onde esta infecção se desenvolve e a caracterização de pontos específicos que podem ser impactados diferencialmente entre estas linhagens ainda necessitam de estudos.

#### 3.1 A infecção por *L. infantum* modula diferencialmente a produção de ROS e Óxido nítrico em camundongos Balb-c e C57Bl/6

Após a infecção com *L. infantum* macrófagos derivados de camundongos Balb-c e C57Bl/6 tiveram sua capacidade de gerar ROS inibida, tanto na infecção isolada com *L. infantum* quanto na infecção concomitante com LPS (Figura 1A). Embora os animais Balb-c tenham demonstrado uma maior tendência de inibição desta produção, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. Por outro lado, ambas as linhagens foram capazes de produzir NO após a infecção com *L. infantum*, de forma crescente, com aumento de cerca de 10 vezes entre 4 horas e 24 horas pós infecção (Figura 1B). Cabe ressaltar que ambas as linhagens produziram quantidades basais equivalentes de ROS e NO, sem diferença estatisticamente significativa (Dados não mostrados).



**Figura 1 - Produção de ROS e Óxido nítrico após infecção com *L. infantum*.**

Produção de ROS (A) e Óxido nítrico (B) após infecção por 4 e/ou 24h de macrófagos peritoneais de camundongos Balb-c (n=5) e C57Bl/6 (n=5) com *L. infantum* (MOI 3:1) e *L. infantum* (MOI 3:1) + LPS (1ug/ml). Resultados expressos pela variação da produção entre macrófagos infectados e seus respectivos controles não infectados (*L. infantum* - Meio e *L. infantum*+LPS – LPS). Diferenças significativas se  $p < 0,05$ .

Já é sabido que células fagocíticas – incluindo macrófagos - infectadas com parasitos do gênero *Leishmania spp.* apresentam capacidade de produzir ROS durante a fagocitose, em busca de eliminá-los ou controlá-los, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (BRÜNE *et al.*, 2013). A deficiência na produção desse mecanismo de defesa pode ser induzida pelos próprios parasitos, incluindo *L. infantum*, transformando o ambiente celular e tornando-o mais propício a replicação e vivência destes dentro das células (MALLINSON, DAVID J; COOMBS, 1989; PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005).

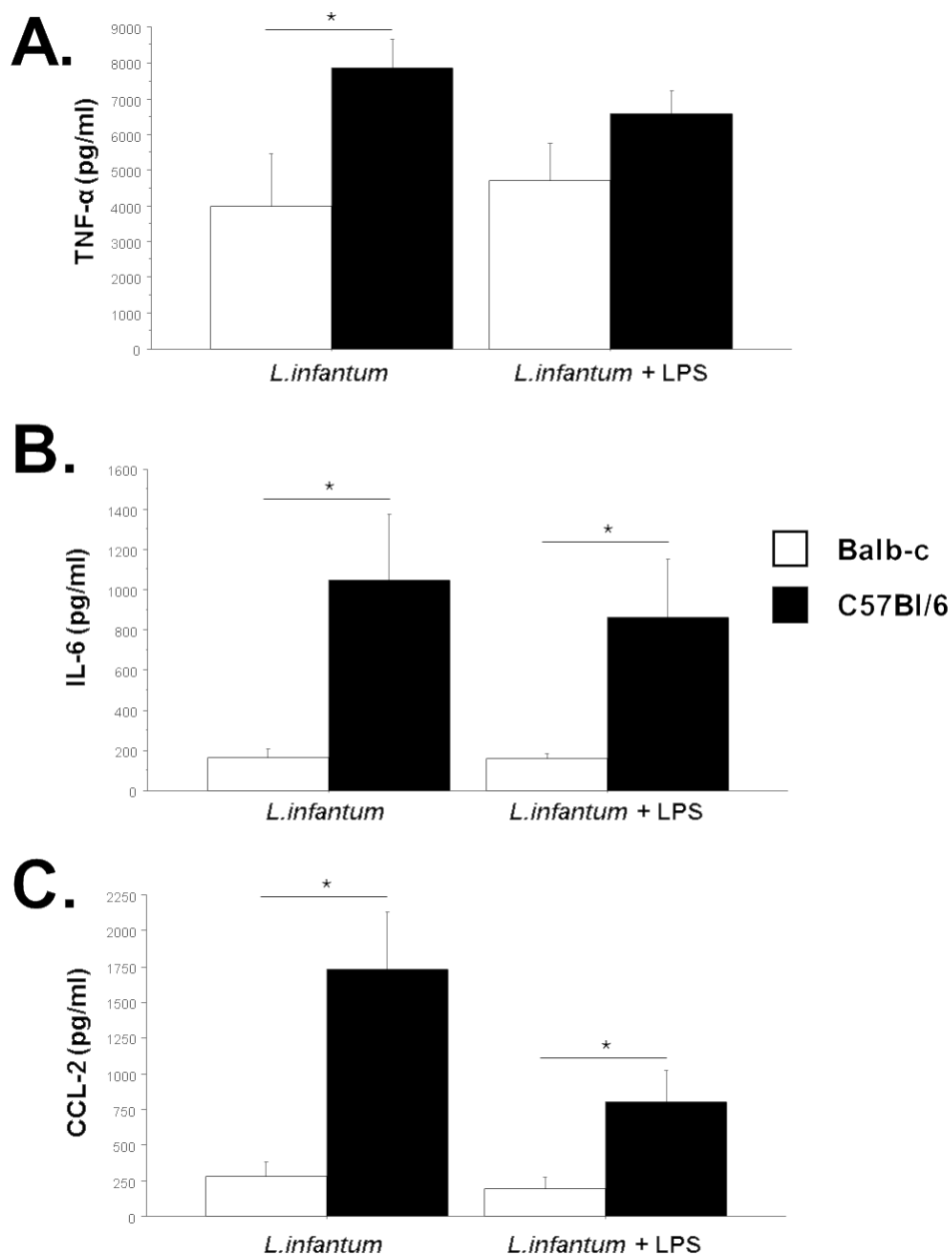
A produção de NO, é outra variável que está diretamente relacionada com a atividade anti-leishmanicida dos macrófagos, bem como está descrita em estudos anteriores, os quais mostraram que a morte de parasitos do gênero *Leishmania spp.* pode ser um evento associado a sua regulação positiva (MILLS *et al.*, 2000). Dentro desse contexto, há estudos como o realizado por Álvarez de Celis e colaboradores, em 2015, sugerindo que a diminuição da produção de efeitos imunológicos, capazes de combater a infecção por *Leishmania spp.*, pode estar associado a uma maior produção de proteínas capazes de modular essas respostas. Em nosso estudo foi demonstrado que a produção de NO não teve correlação com as linhagens, fato também evidenciado por Van Den Kerkhof e colaboradores em 2018 (VAN DEN KERKHOF *et al.*, 2018).

### 3.2 Macrófagos de camundongos C57Bl/6 são melhores produtores de citocinas e quimiocinas após infecção com *L. infantum*

Nossos dados apontam que embora macrófagos derivados de camundongos Balb-c e C57Bl/6 tenham produção similar de espécies reativas de oxigênio e Óxido nítrico, diferem substancialmente na produção de citocinas e quimiocinas chaves nos mecanismos microbicidas de macrófagos e no direcionamento de mecanismos posteriores de imunidade adaptativa.

Em relação ao TNF- $\alpha$ , observamos que camundongos C57Bl/6 produzem quantidades significativamente maiores desta citocina após a infecção com *L. infantum*,  $p=0,04$ , que animais Balb-c (Figura 2A). De forma surpreendente, macrófagos estimulados concomitantemente com LPS, um clássico indutor de TNF- $\alpha$ , não apresentaram diferenças estatisticamente significativas após a infecção com *L. infantum*, aparentemente devido à redução na produção por animais C57Bl/6 em relação à infecção sem adição de LPS.

A produção de IL-6 foi significativamente aumentada nos animais C57Bl/6 em relação aos Balb-c, tanto na infecção somente com *L. infantum*,  $p=0,02$ , quanto na infecção concomitante ao estímulo com LPS,  $p=0,04$  (Figura 2B). Não observamos diferenças significativas entre a infecção apenas com *L. infantum* e juntamente com o estímulo com LPS. Similarmente, a produção de CCL-2, quimiocina previamente denominada MCP-1 e relacionada com recrutamento de monócitos, células dendríticas e células T, foi significativamente aumentada nos macrófagos derivados de animais C57Bl/6 infectados com *L. infantum*,  $p=0,007$ , e infectados com *L. infantum* + LPS,  $p=0,03$  (Figura 2C). Cabe ressaltar que, da mesma forma que para TNF- $\alpha$  e IL-6, estas diferenças não foram devidas à produção basal, sem diferenças significativas entre as linhagens nas condições sem estímulo ou estimuladas com LPS (dados não mostrados).



**Figura 2 - Produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e CCL-2 após infecção com *L. infantum*.**

Produção de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e CCL-2 (C) após infecção por 24h de macrófagos peritoneais de camundongos Balb-c (n=5) e C57Bl/6 (n=5) com *L. infantum* (MOI 3:1) e *L. infantum* (MOI 3:1) + LPS (1 $\mu$ g/ml). Resultados expressos pela variação da produção entre macrófagos infectados e seus respectivos controles não infectados (*L.infantum* - Meio e *L. infantum*+LPS – LPS). Diferenças significativas se p<0,05.

O TNF- $\alpha$  pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos, sendo o LPS o principal estímulo para sua produção (BINGHAM, 2002). Ainda, o TNF- $\alpha$ , através de receptores específicos, pode gerar a apoptose da célula (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, 2012), fato que pode contribuir para a eliminação dos parasitas *L. infantum* e impedir a disseminação da infecção.

Estudos demonstram que níveis moderados de TNF- $\alpha$  contribuem para a proteção do hospedeiro de maneira sistêmica e que a produção de TNF- $\alpha$  é fundamental para a proteção na leishmaniose visceral, especialmente nas células do fígado de modelos animais murinos (KAYE et al., 2004). Ainda, o estudo de Arango Duque e Descoteaux (2015), demonstrou que algumas proteínas de membrana estão relacionadas com



a secreção dessas citocinas ou a inibição delas, apontando que o parasita tem a capacidade de inibir esses receptores, e conseqüentemente a produção dessas citocinas, fazendo com que a doença se desenvolva de forma sintomática (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

A IL-6 configura-se como uma citocina pró-inflamatória (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, 2012) de grande valia na resposta imunológica contra a *L. infantum*, e sua produção já foi descrita em diversos estudos. No estudo de Lapara e Kelly (2010), foi avaliada a produção de diversas citocinas nas culturas de macrófagos em infecções por *Leishmania spp.* durante a estimulação do receptor do tipo Toll-4 (TLR4) (LAPARA; KELLY, 2010). Entretanto, foi mostrado que pelo menos diante a estimulação, especificamente do TLR4, a IL-6 não foi suprimida nesses macrófagos.

Segundo a literatura, a quimiocina CCL-2 é responsável por atração dos monócitos da corrente sanguínea para os tecidos (macrófagos), promovendo aumento da inflamação no local desejado. Sua produção é induzida após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento (BEALL et al., 1996; COCHRAN; REFFEL; STILES, 1983; DESHMANE et al., 2009). Na resposta imunológica frente a *L. infantum*, como mostrado no estudo de (ROUSSEAU et al., 2001), uma maior produção de MCP-1 está diretamente correlacionada a uma melhor resposta imunológica protetora frente a este parasito. Outro estudo (TEIXEIRA et al., 2006) relata que a MCP-1 apresenta a capacidade de induzir mecanismos anti-leishmanicida *in vitro* em macrófagos humanos infectados por *L. Infantum*, através de mecanismo regulador mediado pelo óxido nítrico. Nossos dados apontam para a hipótese de que a capacidade da linhagem C57Bl/6 de controlar melhor a infecção está relacionada com esta quimiocina (BODHALE, N. P.; PAL, S.; KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, N.; BHATTACHARYYA, 2018).

#### 4 | CONCLUSÃO

O presente estudo aponta que as diferenças no desenvolvimento da infecção com *Leishmania infantum* entre camundongos C57Bl/6 e Balb-c são, pelo menos em parte, devidas à forma com que macrófagos derivados desta linhagem respondem após a infecção. De maneira geral, observamos que ambas as linhagens sofrem prejuízo na produção de ROS, embora mantenham a capacidade de produzir NO, moléculas essenciais para a ação dos mecanismos microbicidas. Contudo, há uma substancial diferença na capacidade destas células de produzir citocinas e quimiocinas relacionadas com os eventos iniciais da infecção - TNF- $\alpha$ , IL-6 e CCL2, sendo os animais C57Bl/6 os grandes produtores destas moléculas. Com base em nossos dados, é possível conjecturar que a já sabida susceptibilidade da linhagem Balb-c em desenvolver a forma sintomática e progressiva da leishmaniose visceral, quando comparada a linhagem C57Bl/6, pode estar relacionada com estas diferenças.

Obviamente, não podemos ignorar que a resposta imune durante a infecção por *L.infantum* é resultado de complexas interações entre parasito e sistema imune e compreende intrincadas relações entre células. Neste sentido, nosso estudo aponta mecanismos que podem estar relacionados com o estabelecimento dos parasitos nestas linhagens de camundongos e estudos das repercussões destas diferenças *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia básica e aplicada**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: Where the ends justify the means. **Current Opinion in Microbiology**, 2015.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BEALL, C. J. et al. Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. **Biochemical Journal**, v. 313, n. 2, p. 633 LP-640, 15 jan. 1996.
- BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **The Journal of Rheumatology**, v. 65, p. 3 LP-9, 1 set. 2002.
- BODHALE, N. P.; PAL, S.; KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, N.; BHATTACHARYYA, M. Inbred mouse strains differentially susceptible to Leishmania donovani infection differ in their immune cell metabolism. **Cytokine**, v. 112, n. March, p. 12–15, 2018.
- BRANDONISIO, O. et al. **Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in Leishmania infantum-infected dogs**. [s.l.: s.n.]. v. 53
- CARNEIRO, M. B. H. et al. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during Leishmania amazonensis Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 1, p. 196 LP-208, 1 jan. 2018.
- COCHRAN, B. H.; REFFEL, A. C.; STILES, C. D. Molecular Cloning of Gene Sequences by Platelet-derived Growth Factor. **Cell**, v. 33, n. July, p. 939–947, 1983.
- DE FREITAS, E. O. et al. **The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral Leishmaniasis** **Frontiers in Immunology**, 2016.
- DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, jun. 2009.
- FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 820, 1 out. 2004.
- FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and

bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 355, 1 maio 2009.

FORESTIER, C. L. Imaging host-leishmania interactions: Significance in visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 9–10, p. 256–266, 2013.

GAUR, U. et al. An Effect of Parasite-Encoded Arginase on the Outcome of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446 LP-8453, 15 dez. 2007.

GOMES, R. S. et al. Human IL-32 $\gamma$  plays a protective role in an experimental model of visceral leishmaniasis in mice. **Infection and Immunity**, n. February, p. IAI.00796-17, 2018.

GUÉNET, JEAN-LOUIS; BONHOMME, F. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 1, p. 24–31, 2003.

ILES, K. E.; FORMAN, H. J. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunologic Research**, v. 26, n. 1, p. 95–105, 2002.

JANEWAY, CHARLES A.; TRAVERS, PAUL; WALPORT, MARK; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: The Immune System in Health & Disease**. 5ª ed. New York, NY: Garland Science, 2001.

KASSAMBARA, A. **Package ‘ggpubr’**, 2018. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/ggpubr.pdf>>

KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–253, 2004.

LAPARA, N. J.; KELLY, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with Leishmania. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 8, 2 fev. 2010.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Leishmania Invasion and Phagosome Biogenesis BT - Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry. **Subcellular Biochemistry**, p. 174–181, 2008.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A. L.; HIDE, M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: Experimental considerations. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.

MALLINSON, DAVID J; COOMBS, G. H. Interaction of leishmania metacyclics with macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 19, n. 6, p. 647–656, 1989.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166 LP-6173, 15 jun. 2000.

MOMEN, H.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; DEANE, L. M. **Leishmania infantum, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)?** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1987.

MOREIRA, D. et al. Leishmania infantum Modulates Host Macrophage Mitochondrial Metabolism by Hijacking the SIRT1-AMPK Axis. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 3, 2015.

NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; DE ALMEIDA, D. M. A importância dos modelos murinos na caracterização das respostas imunológicas às leishmanioses: uma revisão. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 4, n. 3, p. 35–59, 2016.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**São PauloAtheneu, , 2016.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 197, 2011.

PANARO, M. A. et al. **Nitric oxide production by Leishmania -infected macrophages and modulation by prostaglandin E 2**. [s.l.: s.n.]. v. 1

PHAM, N.-K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. Leishmania pifanoi amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 8322–8333, dez. 2005.

R CORE TEAM. **The R stats package**, 2018. Disponível em: <<https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/00Index.html>>

READY, P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147, maio 2014.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of Leishmania amazonensis amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549–1564, out. 2014.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? **Trends in Parasitology**, 2009.

ROLÃO, N. et al. Leishmania infantum: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental parasitology**, v. 115, p. 270–276, 2007.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, 2018.

ROUSSEAU, D. et al. Sustained parasite burden in the spleen of Leishmania infantum-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **European cytokine network**, v. 12, n. 2, p. 340–347, 30 nov. 2001.

SIEWEKE, M. H. et al. Beyond Stem Cells : Self-Renewal of Differentiated Macrophages. v. 342, 2013.

SZATKIEWICZ, J. P. et al. An imputed genotype resource for the laboratory mouse. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 19, n. 3, p. 199–208, mar. 2008.

TEIXEIRA, M. J. et al. Chemokines in host – parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32–40, 2006.

VAN DEN KERKHOF, M. et al. Impact of primary mouse macrophage cell types on Leishmania infection and in vitro drug susceptibility. **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3601–3612, 23 ago. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis surveillance update, 1998-2016. **Weekly Epidemiology Record**, v. 40, n. 93, p. 521–540, 2018.

## QUANTIFICAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO EM DENTIFRÍCIOS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

### Déborah Fernandes Rodrigues

Universidade federal de São João del-Rei –  
Campus CCO  
Divinópolis – MG.

### Brenda Caroline Andrade Santana

Universidade federal de São João del-Rei –  
Campus CCO  
Divinópolis – MG.

### Whocely Victor de Castro

Universidade federal de São João del-Rei –  
Campus CCO  
Divinópolis – MG.

### Ruben Dario Sinisterra Millán

Universidade Federal de Minas Gerais –  
Departamento de Química  
Belo Horizonte – MG.

### Carlos Eduardo de Matos Jensen

Universidade Federal de São João del-Rei –  
Campus CCO  
Divinópolis – MG.

**RESUMO:** O carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) é utilizado em produtos cosméticos, principalmente em dentifrícios, com função abrasiva. Para verificar a qualidade físico-química destas pastas é necessária caracterização e quantificação de carbonato de cálcio. Este trabalho teve como objetivo desenvolver método analítico para quantificar o carbonato de cálcio em dentifrícios utilizando

a técnica de análise termogravimétrica (TGA). O  $\text{CaCO}_3$  foi inicialmente quantificado por titulação complexométrica com EDTA, conforme a Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> e, posteriormente, a TGA foi realizada. Os resultados das análises foram comparados estatisticamente por testes pareados. Os resultados das proporções de  $\text{CaCO}_3$  nos cremes dentais de diferentes marcas, determinada pelos dois métodos analíticos, demonstraram concentrações estatisticamente semelhantes. Portanto, a TGA mostrou-se um método alternativo simples, rápido e eficaz para quantificar o  $\text{CaCO}_3$  em dentifrícios e pode ser facilmente adotado pelas indústrias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dentifrícios, Carbonato de Cálcio, Termogravimetria.

**ABSTRACT:** Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) is used in cosmetic products, mostly dentifrices, with an abrasive function. In order to verify the physical-chemical quality of such pastes, calcium carbonate should be characterized and quantified. This paper aimed to develop an analytical method to quantify calcium carbonate in dentifrices using Thermogravimetric Analysis (TGA).  $\text{CaCO}_3$  was initially quantified by complexometric titration with EDTA according to the Brazilian Pharmacopoeia 5th Edition and subsequently TGA was performed. The results of the analyses were statistically compared by

paired tests. The results of the CaCO<sub>3</sub> proportions in toothpastes of different brands, determined by those two analytical methods, demonstrated concentrations that were statistically similar. Therefore, TGA proved to be a simple, rapid and effective alternative method to quantify CaCO<sub>3</sub> in dentifrices and can be easily adopted by industries.

**KEYWORDS:** Dentifrices, Calcium Carbonate, Thermogravimetry.

## 1 | INTRODUÇÃO

Crems dentais têm sido usados desde a antiguidade e são um dos elementos de higiene indispensáveis para prevenção de doenças encontradas na cavidade bucal (ERSOY *et al.*, 2008; DAVIES *et al.*, 2010), como a cárie e a periodontite, que têm como fator etiológico principal o biofilme dentário (LINDHE, 2005), uma estrutura firmemente aderida às superfícies dentárias, que contém quantidades significativas de microrganismos (VIEIRA *et al.*, 2010).

Componentes abrasivos são essenciais para garantir a remoção de biofilme dentário e manchas das superfícies dos dentes (MARTINS *et al.*, 2012). O carbonato de cálcio é o abrasivo mais comumente utilizado em pastas de dente. Algumas propriedades deste componente são o aumento induzido do pH da placa dentária, dos níveis de cálcio da placa e a participação no processo de remineralização (DAVIES *et al.*, 2010). Nos últimos anos, a demanda por produtos que promovem o clareamento dos dentes aumentou significativamente. Dentifícios contendo carbonato de cálcio como sistema abrasivo são cada vez mais incorporados a novas formulações a fim de atender às demandas, gerando assim, um mercado bastante competitivo. (COSTA, 2011).

Contudo, é fundamental verificar a qualidade dessas pastas empregando métodos analíticos capazes de, especificamente e seletivamente, indicar a concentração de carbonato de cálcio presente no produto acabado. Para essa quantificação, as indústrias cosméticas podem empregar métodos de ensaios químicos farmacopéicos e/ou de publicações que possuem credibilidade científica, desde que demonstrem, através de validação, que os métodos de análise executados conduzam a resultados confiáveis (INMETRO, 2003).

A análise termogravimétrica (TGA) tem sido utilizada em estudos de matérias-primas de uso cosmético e no desenvolvimento, produção e controle de qualidade de produtos cosméticos acabados (SILVA *et al.*, 2007). A TGA fornece informações com relação às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura sob determinadas condições atmosféricas. Os experimentos são executados por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa (WENDLANDT, 1974; MATOS E MACHADO, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para quantificar o carbonato de cálcio em dentifícios, utilizando a técnica de análise termogravimétrica.

## 2 | METODOLOGIA

Inicialmente, realizou-se a validação, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução RE nº 899/2003, do método de titulação complexométrica com EDTA, conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Em seguida, o carbonato de cálcio contido em 9 dentifrícios de diferentes marcas foi quantificado por intermédio deste método validado.

Os mesmos 9 dentifrícios foram analisados por termogravimetria. A TGA foi realizada sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup>), taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, até temperatura de 900 °C. Este método (PILLOT® *et al.*, 2014) consiste em medir o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) emitido por uma amostra quando ela é termicamente decomposta (600 a 800 °C) durante um aquecimento monitorado. A desestabilização térmica do carbonato de cálcio produz a seguinte reação:



Como os carbonatos emitem CO<sub>2</sub> durante sua desestabilização, é possível quantificar a quantidade de carbonato inicialmente presente na amostra após uma completa decomposição térmica. Também é possível distinguir carbonatos e matéria orgânica, porque quando os carbonatos são termicamente decompostos com um fluxo de ar (entrada de oxigênio), eles não produzem monóxido de carbono (CO), enquanto a oxidação da matéria orgânica produz CO e CO<sub>2</sub> por combustão na presença de oxigênio. Portanto, conhecendo a massa de CO<sub>2</sub> liberada durante a desestabilização, é possível deduzir a massa do mineral.

Os resultados das análises foram comparados estatisticamente por testes pareados.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Método	Teor de Carbonato de Cálcio (%)									t [cal]	t[0,05;8]
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9		
TG	29,7±2,6	32,6±1,9	29,4±1,1	31,7±2,2	29,4±1,9	34,9±1,2	0	0	0	0,0077	1,8600
TiC	26,9±1,2	29,5±0,9	26,9±0,8	28,4±1,1	27,2±1,3	29,6±0,9	0	0	0		

Tabela 1 - Resultado das análises de diferentes cremes dentais através de dois métodos para dosar carbonato de cálcio e valores de *t* calculado e *t* tabelado:

TG: Análise Termogravimétrica; TiC: Titulometria de complexação; P: Pasta dental

Os resultados das proporções de CaCO<sub>3</sub> nos cremes dentais de diferentes marcas, determinada pelos dois métodos analíticos, demonstraram concentrações estatisticamente semelhantes. O produto 3, por exemplo, teve o teor de CaCO<sub>3</sub> determinado por titulometria de complexação de 26,90% ± 0,8; já por TGA o teor foi de 29,36% ± 1,3. Os dentifrícios 7, 8 e 9 não apresentaram nenhuma quantidade de carbonato de cálcio na sua composição, resultado este que já era esperado por estes

dentifrícios serem destinados ao uso infantil e não conter  $\text{CaCO}_3$  conforme descrição qualitativa de componentes. Além disso, quando se compara uma metodologia com a outra através do tratamento estatístico de *t*-Student, é possível afirmar que não há diferença significativa entre os valores encontrados ( $t$  calculado: 0,0077 <  $t$  tabulado: 1,860) com intervalo de confiança de 95%. Ou seja, os teores de  $\text{CaCO}_3$  determinados por TGA não se diferem daqueles encontrados quando se utilizada a metodologia farmacopeica.

## 4 | CONCLUSÃO

A metodologia proposta para quantificação de carbonato de cálcio em cremes dentais demonstrou ser específica, linear, precisa, exata e robusta na faixa de trabalho. Portanto, o método de doseamento desse composto através da termogravimetria é adequado, seguro e confiável além de possuir baixo custo e ser rápido, podendo então ser uma alternativa para as indústrias e laboratórios no controle da qualidade.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003a.

COSTA, E. B. M. **Role and influence of the toothpaste components in the oral biochemistry**. Integrated master dentistry. Porto University, 2011.

DAVIES, R.; SCULLY, C.; PRESTON, A. J. **Dentifrices--an update**. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, v. 15, n. 6, p. e976-82, Nov 1 2010. ISSN 1698-4447.

ERSOY, M. et al. **The allergy of toothpaste: a case report**. In: (Ed.). Allergol Immunopathol (Madr). Spain, v.36, 2008. p.368-70. ISBN 0301-0546 (Print) 0301-0546 (Linking).

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos** DOQ-CGCRE-008. Março, 2003

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica. e Implantodontia Oral. 4º edição**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogarn, 2005.

MARTINS, R. S. et al. **Composição, princípios ativos e indicações clínicas dos dentifrícios: uma revisão da literatura entre 1989 e 2011**. J Health Sci Inst, v. 30, n. 3, p. 287-91, 2012.

MATOS, J. D. R.; MACHADO, L. **Análise térmica–termogravimetria. Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, p. 209-228, 2004.

PILLOT, D.; DEVILLE, E.; PRINZHOFER, A. **Identification and quantification of carbonate species using Rock-Eval pyrolysis**. Oil & Gas Science and Technology–Revue d'IFP Energies nouvelles, v. 69, n. 2, p. 341-349, 2014. ISSN 1294-4475.

SILVA, E. C. D.; PAOLA, M. V. R. V. D.; MATOS, J. D. R. **Análise térmica aplicada à cosmetologia**.



2007.

VIEIRA, T. R.; PÉRET, A. D. C. A.; PÉRET FILHO, L. A. **Alterações periodontais associadas às doenças sistêmicas em crianças e adolescentes.** Revista Paulista de Pediatria, v. 28, p. 237-243, 2010. ISSN 0103-0582.

WENDLANDT, W. W. **Thermal methods of analysis.** 1974. ISBN 047193366X.

## REDE DE AJUDA ENTRE AMIGOS

### Débora Rezeck Totti

Instituto Nacional de Telecomunicações – Inatel  
deboratotti@geb.inatel.br

### Isabela Vieira Santana

Instituto Nacional de Telecomunicações – Inatel  
isabelavieira@geb.inatel.br

### Maria Paula Riolino

Instituto Nacional de Telecomunicações – Inatel  
mariapaula@geb.inatel.br

### Karina Perez Mokarzel Carneiro

Instituto Nacional de Telecomunicações – Inatel  
karina@inatel.br

**RESUMO:** Este trabalho apresenta a um software voltado para área de saúde. Tem por finalidade facilitar o acesso ao banco de dados, assim como o cadastro de novos candidatos a doação de sangue. O objetivo é tornar mais dinâmico e rápido o processo de recrutamento dos doadores.

**PALAVRAS-CHAVE:** software, doação de sangue, hemocentro.

**ABSTRACT:** This article presents the creation of a software intended for health care. The purpose is to facilitate access to the database, as well as the registration of new candidates for blood donation. The goal is also make more dynamic and fast donor recruitment process.

**KEYWORDS:** Software, Blood donation

## 1 | INTRODUÇÃO

Hemocentro são instituições sem fins lucrativos responsáveis pela arrecadação e distribuição de sangue, seus componentes e hemoderivados para hospitais públicos e privados.

De acordo com a repórter da Agência Brasil, Paula Lamboisierre, a demanda por sangue e derivados esta cada vez maior, porém poucos brasileiros doam devido a falta de informação e a falta de uma boa comunicação entre o hemocentro e o doador[1]. O *software* Rede de ajuda entre amigos foi desenvolvido para melhorar a eficiência e aumentar o numero de doações.

O *software* em questão tem o objetivo de fazer a checagem e a análise dos doadores de sangue. Com a criação de um banco de dados, o hemocentro pode selecionar e entrar em contato com os doadores de uma forma mais eficiente, visto que de acordo com o Luís Guilherme Barrucho da BBC Brasil ( British Broadcasting Corporation, em português Corporação Britânica de Radiodifusão), apenas 1,8% [2] da população brasileira doa sangue e esse numero se deve principalmente pela falta de comunicação entre o doador e o hemocentro.

## 2 | VISITA AO HEMOCENTRO

Foi realizada, no dia 18 de agosto de 2015, uma visita ao Hemocentro de Pouso Alegre – MG. A responsável pelo hemocentro, Solange Forcione Assis, apresentou as salas de preparação e armazenamento do sangue, os equipamentos utilizados, assim como o processo de doação e o pessoal envolvido nesse mecanismo. Foi relatada a importância deste hemocentro, que atende 9 (nove) Assistências Hemoterápicas, 13 (treze) Agências Transfuncionais, atendendo 52 (cinquenta e dois) municípios do Sul de Minas Gerais, com uma população estimada de um milhão de habitantes. Em média consegue atender 1.200 (mil e duzentos) candidatos a doação por mês.

Posteriormente foi apresentado o processo realizado para a doação de sangue. O tipo sanguíneo dos doadores é armazenado em um arquivo e as informações pessoais em outro. Isso dificulta a seleção e o contato com os possíveis doadores, principalmente em caso de emergência. Foi constatado também que o sistema atual não contém nenhum recurso que avise se a pessoa está impedida temporária ou permanentemente de doar. Por exemplo, no caso de gravidez, doenças, ou viagens prolongadas.

Foi fornecido o material de apoio utilizado para a conscientização da população. Este material serviu de apoio para o desenvolvimento do software. As figuras 1 mostra a versão 01 da cartilha explicativa que é distribuída pelo hemocentro, publicada em outubro de 2014. A figura 2 apresenta a cartilha com os requisitos necessários para a realização da doação de sangue.



Figura 1: Cartilha explicativa do hemocentro, versão 01.

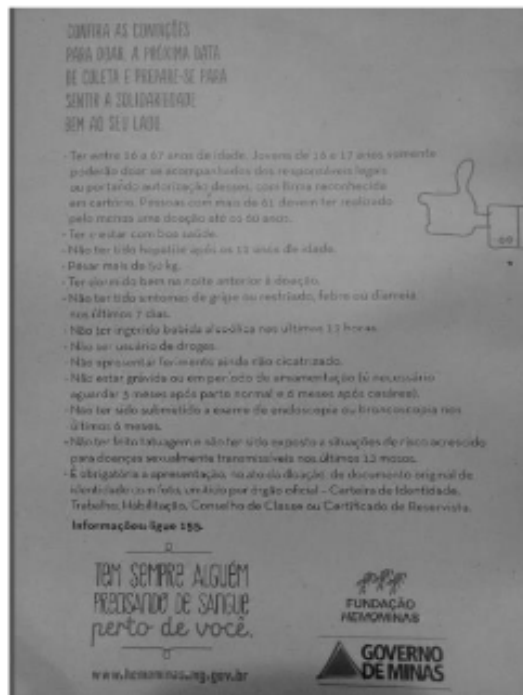


Figura 2: Cartilha de requisitos para a realização da doação de sangue.

### 3 | O SOFTWARE

O software foi desenvolvido no banco de dados MySQL e possui uma interface Java.

O MySQL foi escolhido pelos seguintes motivos:

- Tem código aberto e funcionar em um grande número de sistemas operacionais: Windows, Linux, FreeBSD, BSDI, Solaris, Mac OS X, SunOS, SGI, etc.;
- É reconhecido pelo seu desempenho e robustez e também por ser multi-tarefa e multi-usuário;
- Portabilidade (suporta praticamente qualquer plataforma atual);
- Compatibilidade (existem drivers ODBC, JDBC e .NET e módulos de interface para diversas linguagens de programação, como Delphi, Java, C/C++, Python, Perl, PHP e Ruby);
- Excelente desempenho e estabilidade;
- Pouco exigente quanto a recursos de hardware;
- Facilidade de uso;
- Ser um Software Livre;

A ficha de preenchimento é a mesma já utilizada no hemocentro, porém o programa contará com alguns filtros, como por exemplo: cidade, faixa etária, sexo, tipo sanguíneo entre outros. Isso contribui para a eficiência da localização do doador. Os dados serão cadastrados no mesmo banco de dados e contará com a permissão do candidato. A ficha também contém um espaço destinado para aqueles doadores que estão temporariamente impossibilitados de doar sangue.

O programa tem interface de fácil entendimento, tornando o processo ágil para o operador.

A figura 3 mostra a imagem da primeira etapa do cadastro, contendo as informações pessoais como: nome, endereço e telefone, dentre outras. A figura 4 apresenta a interface dos filtros: Tipo sanguíneo, Cidade e Idade.

**CADASTRO**  
1ª parte

Nome:

Data de Nascimento:

CPF:

RG:

Telefone:

Celular:

Endereço:

Cidade:

UF:

Email:

Sexo:  Masculino  Feminino

**SALVAR**

Figura 3: Imagem da 1ª etapa do cadastro.

**PROCURAR**

Tipo Sanguíneo

Cidade

Idade

**BUSCAR**

Figura 4: Imagem da interface dos filtros.

## 4 | FUNCIONAMENTO DO SOFTWARE

O software terá uma interface simples e auto-explicativa, não sendo necessário um alto conhecimento em informática para manuseá-lo.

O cadastro será dividido em etapas. A primeira etapa é composta por informações básicas, para a identificação do paciente (Figura 3). A segunda etapa é composta por informações sobre a saúde do doador, contendo as seguintes informações: data da última doação, peso, se contraiu alguma DST, se contraiu doença de Chagas, se já contraiu Hepatite após os 11 anos, se possui alguma doença cardiovascular, se faz uso de medicamentos diariamente e o motivo.

Após a realização do exame teste, o paciente será classificado com apto ou não para a doação de sangue, se houver alterações no exame, a segunda etapa será atualizada com as informações do exame.

Para a seleção de pacientes serão utilizados filtros que tornam a procura mais eficiente (Figura 4). Após a localização dos possíveis doadores, irá aparecer na tela as informações para contato, sendo preservada a segunda etapa do cadastro. Caso o doador localizado não possa doar sangue, o operador terá como classifica-lo como não apto para a realização da doação, escrevendo o motivo e por quanto tempo (caso o doador esteja doente, amamentando ou grávida). Assim em uma próxima seleção este paciente não ficará visível ao operador.

Os filtros foram escolhidos de acordo com a necessidade do hemocentro pesquisado, podendo ser alterados de acordo com a necessidade.

## 5 | APLICAÇÕES

O software tem como principal aplicação o uso no hemocentro de Pouso Alegre, porém já foi verificada a possível implementação em outros hemocentros. Como exemplo, o hemocentro de Poços de Caldas que foi visitado em novembro de 2015 e foram verificados os mesmos problemas.

Também pode ser possível, com algumas modificações no *software*, o uso em outras áreas do hospital. Por exemplo para o banco de dados de medula óssea.

## 6 | CONCLUSÃO

O trabalho ressalta os aspectos do *software* Rede de ajuda entre Amigos, programa aplicado na área de doação de sangue. Também foi abordado seu desenvolvimento e funcionamento. O *software* contribui na eficiência do hemocentro e na qualidade de atendimento ao doador.

Após o término do *software*, foram feitos testes com doadores fictícios e simulações nos filtros de busca, o que comprovou a eficiência do programa.

## REFERÊNCIAS

[1] Laboissière, Paula. Demanda por sangue e derivados é cada vez maior, alerta OMS. EBC (on-line). Disponível na Internet. URL: <http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2012-06-14/demanda-por-sangue-e-derivados-e-cada-vez-maior-alerta-oms> (Acesso em 14/11/2015).

[2] Barrucho, Luis. O que falta para o Brasil doar mais sangue? (on-line). Disponível na Internet URL: [http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/08/150812\\_sangue\\_doacoes\\_brasil\\_lgb](http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/08/150812_sangue_doacoes_brasil_lgb) (Acesso em 14/11/2015).

## TRANSFORMAÇÃO DE *E. COLI* DH5 $\alpha$ PELO MÉTODO DE ELETROPORAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS POR MINIPREP CASEIRA

### **Artur Fontenelle Lima Montenegro**

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS  
Fortaleza - CE

### **Antônio Bruno Alves da Silva**

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS  
Fortaleza - CE

### **Martha Jéssika Oliveira Santos**

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS  
Fortaleza - CE

### **Walisson Leonidas de Albuquerque**

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS  
Fortaleza - CE

### **Carlos Roberto Koscky Paier**

Universidade Federal do Ceará (UFC)  
Departamento: Laboratório de Oncologia  
Experimental (LOE) – Núcleo de Pesquisa e  
Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)  
Fortaleza - CE

### **Márcia Valéria Brandão dos Santos Martins**

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS  
Fortaleza – CE

**RESUMO:** Através da tecnologia do DNA recombinante, várias opções terapêuticas foram introduzidas na medicina, possibilitando tratamento para doenças que não podem ser tratadas por drogas convencionais. Essa tecnologia envolve a clonagem de DNA exógeno em *Escherichia coli*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é apresentar a eletroporação,

uma técnica de transformação genética em *E. coli* com um conjunto de plasmídeos de diferentes aplicações. Essa técnica foi realizada com a cepa TOP10 previamente submetida a um processo de eletrocompetência. A bactéria foi submetida a campo elétrico de alta voltagem em eletroporador, na presença do plasmídeo, que foi incorporado ao citoplasma das células transformantes. Uma incubação em meio LB líquido a 37°C por 1h foi realizada, seguido de centrifugação e uma nova incubação a 37°C por 16 h. O antibiótico do meio seletivo foi escolhido de acordo com a marca de resistência do plasmídeo transformado. Após o crescimento em meio sólido, uma colônia transformante foi inoculada em meio LB líquido seletivo a 37°C por 16 h. A cultura líquida foi centrifugada e o precipitado foi empregado na purificação dos plasmídeos clonados, processo denominado “miniprep”. A partir da execução da técnica foi possível a obtenção de plasmídeos puros, sem contaminação no processo de extração, e em maior número. Portanto, foi possível concluir que a técnica é de fácil execução e apresenta alta eficácia para a clonagem de plasmídeos em *E. coli*.

**PALAVRAS-CHAVE:** DNA recombinante. Eletroporação. *E. coli*. Cepa TOP10. Miniprep.

**ABSTRACT:** Through the recombinant DNA technology many therapeutic options have been

introduced into medicine, making it possible to treat diseases that can not be treated by conventional drugs. This technology involves the exogenous DNA cloning into *Escherichia coli*. The objective of this study is to introduce the electroporation which is a technique of genetic transformation on *E. coli* with a set of different application plasmids. This technique was performed on a TOP10 strain previously submitted to an electrocompetence process. The bacterium was submitted to a high voltage electric field in electroporator, in the presence of the plasmid, which was incorporated into the cytoplasm of the transforming cells. An incubation in liquid LB medium at 37°C for 1h was performed. After that a centrifugation and another incubation at 37°C for 16h was performed. The antibiotic from the selective medium was chosen according to the resistance tag of the transformed plasmid. After the growth on solid medium, a transformed colony was inoculated in liquid selective LB medium at 37°C for 16h. The liquid culture was centrifuged and the precipitate was used on the cloned plasmid purification, a process known as “miniprep”. Through the execution of the technique it was possible to obtain pure plasmids with a higher number and without contamination of the extraction process. Therefore we conclude that the technique is easily executed and presents high efficacy to clone plasmids on *E. coli*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Recombinant DNA. Electroporation. TOP10 *E. coli* strain. Miniprep.

## 1 | INTRODUÇÃO

Um gene pode ser caracterizado como uma sequência de DNA que contém toda a cadeia de nucleotídeos necessários e suficientes para a produção de um produto correspondente. Qualquer fragmento de DNA pode ser clonado, a mais simples destas maneiras envolve a inserção de um fragmento de DNA particular no DNA genômico purificado de um elemento genético que se autorreplica – plasmídeo (ALBERTS et al., 2010).

Podemos considerar que, com o início do século XXI, devido à grande evolução na tecnologia do sequenciamento genético, foi possível identificar uma parte considerável de determinadas sequências constituídas por segmentos de DNA com capacidade de movimentar-se dentro de genomas ou mesmo entre diferentes genomas e células. Esses segmentos são chamados de elementos genéticos móveis (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014). Entre esses elementos genéticos móveis podemos citar os plasmídeos, sendo estes extracromossômicos e capazes de se replicar autonomamente. Contudo, apesar de obter a capacidade de se replicar de forma independente, por estarem fisicamente dissociados dos cromossomos, esses elementos ainda precisam se utilizar das mesmas enzimas que replicam o genoma da célula hospedeira (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Os plasmídeos tornaram-se ferramentas de uso essencial nas técnicas de biologia molecular devido a suas características, tais como: são autorreplicáveis; são



maleáveis; possuem estabilidade; são multifuncionais (WATSON, 2015). É importante mencionar que a base de conhecimento para utilização dos plasmídeos vem da observação de um processo de recombinação genética natural, como o que ocorre em bactérias. Os plasmídeos mais usados na tecnologia do DNA recombinante são aqueles que replicam em *E. coli* a informação genética responsável pela codificação de antígenos com aplicação vacinal, como será discutido mais a frente, é realizada a clonagem e propagação em linhagens de *E. coli*, um habitante inofensivo de nossa microbiota intestinal. Utilizados como vetores de clonagem, estes plasmídeos foram otimizados com a remoção de partes desnecessárias de plasmídeos naturais de *E. coli*, contendo agora somente as regiões essenciais para a clonagem do DNA: uma origem de replicação - estrutura que possibilita a replicação do DNA plasmidial dentro da célula inserida; um marcador que permite a seleção – geralmente é um gene de resistência a fármaco; uma região a qual fragmentos de DNA exógenos podem ser inseridos; Região Promotora - projetado para recrutar maquinaria transcricional de um determinado organismo ou grupo de organismos (LODISH, 2014; ADDGENE, 2017).

Além de obter uma classificação funcional, por serem ferramentas utilizadas na recombinação de DNA, os plasmídeos também apresentam uma classificação de acordo com sua aplicação em laboratório. Os mais conhecidos dentre esses tipos são: os vetores de clonagem, responsáveis pelo aumento da quantidade de plasmídeos; e os vetores de expressão, os quais são responsáveis, além da clonagem, pela expressão da proteína sintetizada a partir do gene alvo, ou pelo próprio estudo das utilidades do gene em si. A diferença estrutural entre esses dois tipos de vetores consiste na presença de uma região promotora, nos vetores de expressão, permitindo a transcrição e tradução do gene nele inserido (ADDGENE, 2017).

Pela sua maneabilidade, os plasmídeos são os vetores de excelência para a clonagem de genes ou fragmentos de DNA específicos, apesar de também serem usados na construção de bibliotecas de genes, hoje em dia a clonagem tem interesses múltiplos no âmbito da engenharia genética, tais como isolamento de um gene particular, parte de um gene, ou região de um genoma e produção de um RNA particular e proteínas moleculares em grandes quantidades (WATSON, 2015).

A tecnologia do DNA recombinante engloba a alteração genética de um material, externo ao organismo, e a inserção deste material alterado no organismo para que características sejam obtidas em organismos vivos ou em seus produtos. Sendo assim, essa tecnologia envolve a inserção de um fragmento de DNA a partir de uma sequência genética desejada, através de um vetor apropriado (KHAN et al., 2016).

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS / METODOLOGIA

### 2.1 Material necessário

Água ultra pura; Glicerol; DNA para transformação (vetor com ou sem inserto); *E. coli* DH5α eletrocompetente; Meio líquido LB (Cloreto de sódio, extrato de levedura, triptona ou peptona); Cubas de eletroporação; Eletroporador (Gene Pulser Xcell); Placas com meio LB e o antibiótico apropriado para seleção dos transformantes, de acordo com o vetor utilizado (Ampicilina, Canamicina e Clorofenicol) e outro qualquer agente de seleção, por exemplo: X-Gal, para os vetores que o possuem; Demais instrumentos para pipetagem/banho de gelo; GET (25mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA; 50mM Glicose); Acetato de amônia; Isopropanol; Etanol; TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA); Solução de lise (100μL de SDS 10%, 200μL de NaOH 1M, 700μL de H<sub>2</sub>O ultra pura autoclavada).

### 2.2 Método de preparo de células de *E. coli* eletrocompetentes.

O processo de indução de competência ao processo de eletroporação para *Escherichia coli* se inicia através da inoculação de uma colônia dessas bactérias em 50mL de meio LB (Luria-Bertani) com 0,5% de NaCl, realizando o crescimento a 37°C e 200 rpm, *overnight*, em uma incubadora. No dia seguinte, é necessário separar 1mL de meio LB, antes de inocular, para ser utilizado como branco nas medidas de densidade óptica a 600nm em espectrofotômetro. Logo após, ocorre a transferência de 2,5% da cultura crescida para 1L de meio LB (dividido em volumes de 500mL em dois erlens de 2L), realizando a incubação a 37°C e 200rpm, até atingir DO 0,6 a 600nm. Após esse processo, deve-se esfriar os frascos em gelos de 15 a 30 minutos e centrifugar por 20 minutos a 4000 rpm em centrífuga refrigerada, removendo com cuidado os sobrenadantes após centrifugação e ressuspender as células em 1L e água ultra pura estéril e gelada, realizando uma nova centrifugação por 20 minutos a 4000rpm e 4°C. Novamente deve-se descartar o sobrenadante e ressuspender as células cuidadosamente em 10mL de glicerol 10% estéril e gelado, realizando uma nova centrifugação por 10 minutos a 4000rpm e 4°C. Por fim, deve-se descartar novamente o sobrenadante e ressuspender as células cuidadosamente em 2 a 3mL de glicerol 10% gelado e estéril, fazendo com que as células permaneçam bem concentradas, aliquotar 40μL de células em microtubos de 500μL estéreis e gelados, mantendo-os sempre em gelo, e estocar a -80°C.

#### 2.2.1 Método de execução de transformação de *E. coli* por eletroporação.

O procedimento deve se iniciar com a esterilização das cubetas com etanol e deixa-las secando no fluxo laminar. Enquanto ocorre a secagem das cubetas, deve-se manter microtubos contendo 40μL de *E. coli* DH5α eletrocompetente em banho de

gelo. Assim que as cubetas estiverem secas também devem ser mantidas em banho de gelo, sendo o restante do processo realizado dessa forma, em baixa temperatura. Terminando esses preparos iniciais, deve-se pipetar 1 ou 0,5µL do DNA para transformação no microtubo contendo a bactéria eletrocompetente e homogeneizar o material.

Após a homogeneização, o conteúdo presente no microtubo deve ser transferido para a cubeta (contendo aproximadamente 41µL) e deve ser levado ao eletroporador, em banho de gelo. Antes de colocar a cubeta no eletroporador é necessário verificar se existe a presença de bolhas na cultura líquida, realizar retirada das bolhas presentes através de movimentos bruscos, e retirar o excesso de umidade presente nas placas metálicas da cubeta. O pulso aplicado na cubeta deve ser ajustado entre 1800 e 2000V no eletroporador.

Após a eletroporação o material deve ser levado de volta ao fluxo laminar, em banho de gelo, onde será adicionado 1 mL de meio LB à cubeta e depois será transferido o meio líquido com as células eletroporadas para um novo microtubo, estéril. Dessa forma, as células eletroporadas são colocadas na incubadora a 200rpm e 37°C por uma hora, no mínimo, para que as células bacterianas possam produzir as proteínas contidas no plasmídeo e a sua seleção em meio sólido possa ocorrer.

Sendo assim, após o período de incubação, 100µL das células contidas no microtubo devem ser plaqueadas em meio LB sólido seletivo de acordo com a resistência conferida pelo plasmídeo, para crescimento apenas das bactérias transformadas. A incubação das placas deve ser mantida a 37°C por 16h em estufa.

É importante pontuar que a corrente elétrica gerada para ocorrer a abertura de poros dentro das células bacterianas foi utilizada segundo o protocolo pré-estabelecido do equipamento, Gene Pulser Xcell, o qual configurava os seguintes parâmetros: 1800V, 25µF, 200Ω, utilizando uma cubeta de 0.1cm, um volume de células de 20µL e um pulso de decadência exponencial. O meio LB utilizado foi feito a partir de cloreto de sódio, extrato de levedura, triptona (Kasvi) e ágar (apenas no meio sólido).

### *2.2.2 Inoculação das bactérias transformadas*

Após o crescimento das bactérias em placas de meio LB sólido, uma colônia foi retirada para que pudesse realizar seu crescimento em meio líquido. Para realizar a transferência de uma colônia isolada é necessário a utilização de um fluxo laminar, de tubos de ensaio de 10mL e palitos de dente autoclavados.

Sendo assim, foi executada a transferência de uma colônia isolada, a partir da utilização do palito de dente autoclavado para retirar a colônia do meio de cultura, para o tubo de ensaio contendo 10mL de meio LB líquido e 10µL do antibiótico específico, segundo o plasmídeo utilizado, deixando o palito em contato com o meio. O tubo de ensaio, então, é levado para a incubadora, onde deve ser mantido em uma rotação de 200rpm e 37°C, *overnight*.

### 2.2.3 Extração dos plasmídeos replicados

Após o crescimento das bactérias em meio líquido, o conteúdo presente no tubo de ensaio é transferido para microtubos de 2mL e centrifugado por 5 minutos a 13000rpm.

Ao fim da centrifugação, o sobrenadante presente no microtubo foi retirado e o conteúdo ainda restante no tubo de ensaio foi transferido para o microtubo para uma nova centrifugação, nos mesmos parâmetros. O processo é repetido até que todo o volume contido no tubo de ensaio tenha sido transferido e centrifugado no microtubo, realizando a retirada do sobrenadante.

Após todas as centrifugações é adicionado 100µL de GET ao microtubo, ressuspensando o *pellet* com uma pipeta. Adiciona-se 300µL de solução de lise, depois da ressuspensão, realizando a mistura do material por inversão, gentilmente, em temperatura ambiente e por no máximo 5 minutos. Em seguida é adicionado 300µL de acetato de amônia 7,5M, realizando uma mistura rápida e vigorosa por inversão. O material, então, é levado para centrifugação a 13000rpm por 10 minutos, transferindo-se o sobrenadante, após a centrifugação, para um novo microtubo de 1,5mL. Sendo assim, deve-se adicionar 700µL de isopropanol e deixar o material em repouso no freezer durante, no mínimo, 30 minutos.

Após o período de repouso, o material é novamente centrifugado a 13000rpm, a 4°C, por 10 minutos, ocorrendo a remoção do sobrenadante logo em seguida para a adição de 300µL de etanol 70% gelado, homogeneização gentil e nova centrifugação do material a 13000rpm, a 4°C, durante 3 a 4 minutos. Em seguida, retira-se o sobrenadante e o tubo é colocado, aberto e na posição horizontal, na estufa, a 37°C, durante 10 a 20 minutos para a secagem do pellet. Por fim, o material é ressuspensado em 50µL de TE e é acrescentado 1µL de RNase a 10mg/mL (DNase free) ao tubo contendo o material a 37°C por 30 minutos.

### 2.2.4 Eletroforese

Ao fim do processo de extração do DNA dos plasmídeos contidos nas células bacterianas, foi realizado uma eletroforese do DNA desses plasmídeos para verificar a pureza do conteúdo. Esse processo é importante pois caso haja alguma falha no processo de extração, pode haver apresentação de outros conteúdos além do DNA dos plasmídeos no produto final.

A eletroforese foi realizada a partir da preparação de um gel de agarose (0,8%) e de uma cuba para eletroforese, montada segundo o fabricante (Kasvi). O tampão tae, composto de 4,84g de Tris Base, 1,14mL de ácido acético glacial, 2mL de EDTA 0,5M pH 8,0 e ddH<sub>2</sub>O, foi utilizado na preparação do gel e na corrida. Os parâmetros utilizados na corrida foram: 80V, por aproximadamente 1h. Foi utilizado o gel red como corante no gel de agarose, em uma proporção de 1:100.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da execução do método de eletroporação nas bactérias eletrocompetentes produzidas no laboratório de Citotoxicidade do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC), seguindo o protocolo padrão já estabelecido dentro do laboratório, podemos afirmar que a transformação das bactérias pelos plasmídeos utilizados, os quais são considerados variações de pET e pGEM, foi bem sucedida, assim como o processo de extração pela miniprep, como podemos observar na eletroforese realizada (Figura 1), sinalizando um resultado positivo.

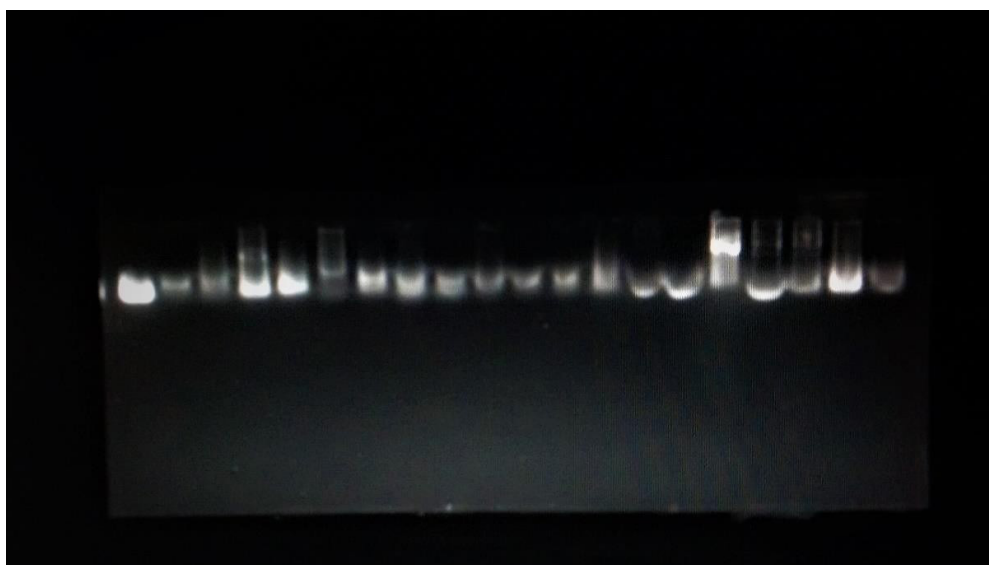


Figura 1: Da esquerda para a direita, considerando a primeira banda como o peso molecular: pET28aGST-tev; pETDuet-1; pET28aSUMO; pETTEVplus; pETTEV; pMAL-c4X; pGEX-4T1; pET7-GroES; pET-Blue2; pET3a; pET11d; pET29a; pcDNA3.1/Neo; pcDNA3.1/Hygro; pcDNA3.1/Hygro-myc; pcDNA3.1/Hygro-His6; pcDNA3-FLAG; pcDNA3-FLAG-GFP; pGEM-mKO2.

Na manutenção da saúde e tratamento de doenças, existem várias formas da tecnologia do DNA recombinante ser aplicada. A terapia gênica pode ser utilizada também em combinação com a terapia medicamentosa e, segundo testes, pode oferecer proteção às células tronco hematopoiéticas da quimioterapia por agentes alquilantes contra glioblastoma (KHAN et al., 2016).

Assim como descrito por Vilela (2007), o uso da tecnologia do DNA recombinante para a produção de anticorpos contra um antígeno específico é totalmente possível, através da técnica de clonagem gênica e manipulação da expressão proteica em *E. coli*. O procedimento de produção é relativamente simples e menos oneroso do que aquele envolvido na obtenção de proteínas recombinantes (DINIZ, 2010). A aplicação desta tecnologia consiste basicamente em escolher uma imunoglobulina e posteriormente empregar a metodologia para fundir o DNA codificante da região variável da cadeia pesada do anticorpo com o DNA codificante para a região constante

(SCALLON, 2006).

A tecnologia do DNA recombinante pode ser usada através de diferentes estratégias, a depender do objetivo que se pretende alcançar. Na produção de vacinas é possível realizar a produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos, com *E. coli*, manipulação genética para a inserção de genes que codifiquem antígenos e imunização com plasmídeos recombinantes (DINIZ, 2010).

A produção de anticorpos monoclonais através da técnica também pode ser realizada, em que serão produzidos anticorpos cujos alvos serão proteínas de membranas e receptores de membranas (FILPULA, 2007). O uso terapêutico de anticorpos monoclonais em pacientes com tumores sólidos tem demonstrado uma taxa maior de sucesso com os anticorpos específicos para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e para o Receptor do Fator de Crescimento Endotelial (EGFR) (SCOTT, 2012).

Outra aplicação desta tecnologia refere-se ao desenvolvimento de receptores antigênicos quiméricos (CARs) expressos em células T. Esses receptores, compostos por domínios anticorpo-ligante conectados com domínios que ativam as células T, podem superar a tolerância admitindo que células T respondam a antígenos de superfície celular. Sendo assim, estudos realizados por Tey (2007), foram capazes de verificar a reatividade de células apresentando esses tipos de receptores contra o tumor, utilizando um CAR de CD30 para Doença de Hodgkin refratária, assim como CAR direcionado a GD2, expresso no vírus Epstein-Barr. A partir desses estudos foi introduzida uma técnica de transplantação de células T reativas a tumores por meio da expressão de receptores antigênicos quiméricos contra o tumor, obtendo também um gene indutor de apoptose para uma função suicida caso essas células T venham a gerar reatividade contra o hospedeiro (doença do enxerto contra o hospedeiro) (TEY et al., 2007; LAM et al., 2013).

Citocinas são polipeptídeos que regulam a resposta inflamatória e a resposta imune de um indivíduo, provendo sinais importantes de patologias na fisiologia de um organismo. Elas fazem parte de um grupo de mediadores relevantes dentro de uma rede complexa e coordenada que rege as repostas inflamatórias, além de exercerem ações pleiotrópicas, são produzidas por uma grande quantidade de células e são capazes de realizar trabalhos terapêuticos no organismo (NAVARRO-GONZÁLEZ, 2008). Citocinas que estão relacionadas à ativação ou à proliferação das células do sistema imune podem ser usadas como estratégia para induzir o aumento da resposta desejada de uma vacina de DNA. Em estudos feitos por Diniz (2010), desenvolveram uma terceira versão das vacinas de DNA para tumores induzidos por HPV-16, coadministrada de plasmídeos que expressam as citocinas IL-12 ou GM-CSF em combinação com os plasmídeos que expressam a E7 ou E7E6E5 de HPV-16 fusionados à gD de HSV-1. Através desta abordagem, obteve-se resposta de imunização máxima, ou seja, foi obtido um efeito protetor terapêutico de 100% nos camundongos usados no experimento.

Em uma revisão feita por Baigent (2002), ele apresenta dados do uso de Interleucina-2 recombinante humana (Proleucina®) no tratamento de Carcinoma Metastático Renal (CMR) e de Melanoma Metastático (MM), em subgrupos de pacientes de CMR e MM obteve-se, respectivamente, respostas completas e duráveis de aproximadamente 7% e 6%, afirmando que estudos realizados dizem que pacientes tratados com a Proleucina® viveram por mais de 10 anos após o tratamento. A substância não possui efeito antitumoral, ao invés disso, acredita-se que ela estimula o sistema imune a reconhecer as células tumorais como células “estrangeiras”. As células tumorais frequentemente desenvolvem mecanismos para passarem despercebidas pelo sistema imune, o qual confunde células saudáveis com células mutadas.

A utilização de RNAs de pequena interferência (siRNA) também é capaz de gerar receptores de células T (TCRs) de atividade antitumoral aumentada, através da recombinação genética utilizando vetores genéticos. Essa maior atividade ocorre pela eliminação ou redução de expressão de componentes endógenos que ajudam a diminuir o desaparecimento desses receptores, sem mencionar que genes de TCR podem ser utilizados para redirecionar células T contra uma variedade de antígenos antitumorais (KERSHAW; WESTWOOD; DARCY, 2013).

A partir de estudos realizados pelo grupo de pesquisadores de Kim (2006), foi realizada a produção de um peptídeo rico em arginina que pode atuar como carreador de siRNA. Segundo esse grupo de pesquisadores, o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) pode ser inibido por esse siRNA desenvolvido. Para localizar tumores ativos também desenvolveram um carreador de gene bioreduzível conjugado com o peptídeo NGR, o qual pode ser revelado por imagem e poderia ser utilizado para direcionar plasmídeos para o local do tumor, mas ainda existem dúvidas se a expressão ocorreria (KIM et al., 2006; SON et al., 2012; LAM et al., 2013).

Inúmeros dados têm sido acumulados acerca de miRNAs, constantemente eles estão envolvidos em diferentes processos celulares de diferenciação, proliferação, sobrevivência e morte programada. Desse modo, não é novidade que alterações na expressão e na função de miRNA estejam relacionadas ao desenvolvimento de estados neoplásicos em um organismo. Genes clássicos podem ser superexpressos ou silenciados de acordo com seu papel no desenvolvimento do câncer e anormalidades em suas expressões e funções podem ser associadas como marcadores tumorais (PASCULLI, 2015).

Diferentes níveis de expressão de miRNA podem ser encontrados em diferentes tecidos saudáveis e em tecidos tumorais, como no caso de câncer de mama, colorretal, glioblastoma, adenocarcinomas, entre outros (BERINDAN-NEAGOE et al., 2015). Sobretudo, a literatura tem demonstrado que o fenótipo do câncer é caracterizado por uma redução geral de miRNA em relação a tecidos saudáveis, o que corrobora sobre o papel do miRNA na manutenção e diferenciação celular e homeostasia do organismo (PASCULLI, 2015).

O uso de injeções peri-tumorais de miRNA no tratamento de camundongos

com tumores de próstatas apresentou bons resultados na redução do crescimento tumoral em comparação ao grupo controle (ISCAIFE, 2016). Uma série de estudos sobre ganho e perda de função gênica em combinação com a predição de alvo demonstraram que alterações na expressão de miRNAs podem afetar não somente o processo tumorigênico, mas também a sensibilidade celular às drogas. Desse modo, o uso da tecnologia do DNA recombinante para produção de sequências gênicas que tenham como alvo miRNAs e os mecanismos que cercam os RNAs endógenos podem representar um vasto campo para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer, como por exemplo, o anticorpo monoclonal Herceptin® representa o primeiro medicamento alvo-específico para pacientes com câncer de mama que possuem mutação no gene HER-2 (BERINDAN-NEAGOE et al., 2015)

## 4 | CONCLUSÃO

O método de eletroporação é altamente eficaz, já que a maioria das bactérias foram capazes de ser transfectadas pelo processo, e de simples execução, dependendo somente de treinamento nas técnicas para a realização do método e um pouco de conhecimento teórico sobre o assunto para que seja executado de forma eficiente, segundo o protocolo.

A partir dos experimentos realizados, foi capaz de entender que existem alguns interferentes no processo de eletroporação, pois mesmo com o cuidado de realizar a tirada de bolhas presentes no meio e enxugar as placas metálicas ainda assim pode ocorrer uma falha no processo e a corrente ser conduzida pelo meio.

As regras de biossegurança também podem ser consideradas um importante parâmetro para a obtenção de resultados positivos, pois quando não são bem executadas podem acontecer acidentes ou ocorrência de resultados inesperados enquanto quando bem executadas geralmente o resultado esperado é alcançado.

## AGRADECIMENTOS

Os autores e profissionais envolvidos no desenvolvimento deste projeto gostariam de agradecer a todos que se disponibilizaram para que tudo fosse realizado dentro do possível e da melhor forma possível.

Ao professor Dr. José Lima, reitor do Centro Universitário Christus (Unichristus) e ao professor Dr. Manoel Odorico, diretor do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC) por se disponibilizarem e quebrarem barreiras ao promover o desenvolvimento científico entre instituições públicas e privadas.

À professora Dr<sup>a</sup> Cláudia Roberta, coordenadora geral do curso de Biomedicina da Unichristus, por ser facilitadora e ajudar com oportunidades de experiência como



essa no Laboratório de Oncologia Experimental do NPDM.

À professora Dr<sup>a</sup> Márcia Valéria, por ser nossa orientadora, se disponibilizar e nos motivar a prosseguir na carreira científica, sempre fazendo o que está a seu alcance para que tudo ocorra conforme esperado.

À professora Dr<sup>a</sup> Raquel Montenegro, por se dispor a coordenar as atividades que seriam realizadas, se disponibilizar e ser facilitadora na receptividade e engajamento dos alunos dentro do Núcleo.

Ao professor Dr. Carlos Paier, por se responsabilizar, acompanhar, disponibilizar e dedicar seu tempo ao ensino dos alunos que desenvolveriam as atividades nos laboratórios do Núcleo.

## REFERÊNCIAS

ADDGENE. **Addgene Protocols:** How to do a Bacterial Transformation. Disponível em: <https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>. Acesso em: 23 de agosto de 2017.

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5<sup>a</sup> edição, Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.

BAIGENT, G; BARNGROVER, D. **Recombinant Interleukin-2 (aldesleukin) for oncology and HIV disease and recombinant protein treatment (Fabrazyme) for Fabry's disease (No. 14 in a series of articles to promote a better understanding of the use of genetic engineering)**. Journal of Biotechnology Volume 95, Issue 3, 23 May 2002, Pages 277-283.

Berindan-Neagoe, I; Monroig, P. d. C; Pasculli, B; Calin, G. A. **MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy**. CA A Cancer Journal for Clinicians, 64: 311–336. 2014.

BROWN, T.A. **Clonagem genica e análise de DNA: uma introdução**. 4<sup>o</sup> edição. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376p.

DINIZ, M.O; FERREIRA, L.C.S. **Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas**. Estud. av., São Paulo, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010 .

FERENC, Matthew. **Plasmids 101:** Common Lab E. coli Strains. 2014. Addgene. Disponível em: <<http://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains>>. Acesso em: 23 de agosto de 2017.

FILPULA, D. **Antibody engineering and modification technologies**. Biomolecular Engineering, Amsterdam, v. 24, p. 201-215, 2007.

GOUVÊA, A; PEREIRA, I.; BOLITO, L. et al. **Controlo da Replicação de Plasmídeos**. Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Universidade de Coimbra, 2005. Acesso em 17 agosto de 2017. Disponível em <[http://www.fis.uc.pt/data/20042005/apontamentos/apnt\\_1354\\_35.pdf](http://www.fis.uc.pt/data/20042005/apontamentos/apnt_1354_35.pdf)>

ISCAIFE, Alexandre. **O uso de microRNA para o tratamento do câncer de próstata: estudos *in vitro* e *in vivo*** / Alexandre Iscaife – São Paulo, 2016. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

KERSHAW, Michael H.; WESTWOOD, Jennifer A.; DARCY, Phillip K.. Gene- engineered T cells for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.525-541, 24 jul. 2013. Springer Nature.

KHAN, Suliman et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International Journal Of**

**Genomics**, [s.l.], v. 2016, p.1-14, 2016. Hindawi Limited.

KIM, Won Jong et al. Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.343-350, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.022>.

LAM, P.; KHAN, G; STRIPECKE, R.; HUI, K.M.; KASAHARA, N.; PENG, K.W.GUINN, B.A. **The innovative evolution of cancer gene and cellular therapies**. Cancer Gene Therapy. [s.l.], v. 20, n. 3, p.141-149, 1 fev. 2013. Springer Nature.

LODISH, H. **Biologia Celular e Molecular**. 7º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1210p

Navarro-González JF<sup>1</sup>, Mora-Fernández C. **The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy**. J Am Soc Nephrol. **March 2008** vol. 19 no. 3433-442.

PASCULLI, B; CALIN, G.A. **RNA Interference in Cancer Therapy**. Rev. Cell Biol. Mol. Medicine Vol 1, n 3, 2015.

SCALLON, B.J; SNYDER, L.A; ANDERSON, M.G; CHEN, Q; YAN, L; WEINER, L.M; NAKADA, M.T. A. **Review of Antibody Therapeutics and Antibody- Related Technologies for Oncology**. J Immunother 2006; 29:351–364.

SCOTT, A.M; WOLCHOK, J.D; OLD, L.J. **Antibody therapy of câncer**. *Nature Reviews Cancer* 12, 278-287; April 2012.

SON, Sejin et al. Bioreducible Polymers for Gene Silencing and Delivery. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 45, n. 7, p.1100-1112, 17 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ar200248u>.

TEY, Siok-keen et al. Inducible Caspase 9 Suicide Gene to Improve the Safety of Allogeneic T Cells after Haploidentical Stem Cell Transplantation. **Biology Of Blood And Marrow Transplantation**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.913-924, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.04.005>.

VILELA, A.A; CALÁBRIA, L.K; COELHO, M.V; ESPINDOLA, F.S. **Uso de proteína recombinante e produção de anticorpo para miosina-v e dlc no estudo de cérebro da abelha Apis melífera**. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Bloco 2E, sala 39, Av.. Pará s/ número, CEP. 38400-920, Uberlândia-MG, foued@ufu.br.

WATSON, J.D; BAKER, T.A; BELL, S.P. **Biologia Molecular do Gene**. 7ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P. **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 403 p.

## USO DA ESPINHEIRA SANTA (*Maytenus ilicifolia*) NO TRATAMENTO COADJUVANTE EM PACIENTES COM PROBLEMAS GASTROINTESTINAIS

### Francisco Ítalo de Sousa Brito

Universidade Federal do Piauí, Departamento do  
Curso de Farmácia, Teresina-PI

### Carolina Francisca Alves de Jesus Sousa

Centro Universitário Santo Agostinho, Curso de  
Farmácia, Teresina-PI

### Mateus Marques Rodrigues de Jesus

Universidade Federal do Piauí, Departamento do  
Curso de Farmácia, Teresina-PI

### Lília Rafaela Barbosa de Sousa

Universidade Federal do Piauí, Departamento do  
Curso de Farmácia, Teresina-PI

### Carlos Átila Pereira de Araújo

Universidade Federal do Piauí, Departamento do  
Curso de Farmácia, Teresina-PI

**RESUMO:** A *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como espinheira-santa ou cancrossa, pertence à família Celastraceae possuindo 55 gêneros e 850 espécies espalhadas nas regiões trópicas e subtropicais do mundo. Diversas atividades farmacológicas são atribuídas à planta como antiácido, antiespasmódico, antiinflamatório e cicatrizante. Também é usada no tratamento de úlceras pépticas e gastrite crônica. O objetivo deste trabalho foi analisar o uso da Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) no tratamento de pacientes com problemas gastrointestinais. Este estudo constitui-se de uma revisão bibliográfica, fundamentada em

dados gerados pela literatura científica, no qual se realizou uma consulta nas bases de dados Lilacs, Scielo e PUBMED utilizando artigos originais e de revisão de 2003 até a data presente, nos idiomas português e inglês. Estudos iniciais revelaram que *Maytenus ilicifolia* contém compostos bioativos que mostraram potente ação antitumoral e antileucêmica em doses muito baixas. Entretanto, seu uso mais popular é no tratamento de úlceras, indigestão, gastrites crônicas e, dispepsia, pois observou-se que extratos hexano e etilacetato de *Maytenus ilicifolia* promovem um aumento do volume gástrico e do pH no estômago, além da ação anti-ulcerogênica e antiinflamatória. Foi observado que o extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* reduz a secreção ácida na mucosa gástrica de rãs, com efeito semelhante ao medicamento cimetidina. A partir da análise dos dados, pode-se observar que a *Maytenus ilicifolia* é capaz de ajudar no tratamento de pacientes com problemas gastrointestinais devido ao seu efeito gastroprotetor como forma de melhorar a terapêutica do paciente.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Maytenus ilicifolia*; problemas gastrointestinais; anti ulcerogênica.

**ABSTRACT:** The *Maytenus ilicifolia*, popularly known as espinheira-santa or cancrossa, it belongs to the family Celastraceae possessing

55 goods and 850 dispersed species in the tropical areas and subtrópicas of the world. Several pharmacological activities are attributed to the plant as antacid, antiespasmódico, anti-inflammatory and cicatrizant. It is also used in the treatment of ulcers pépticas and chronic gastritis. The objective of this work was to analyze Espinheira Santa use (*Maytenus ilicifolia*) in the patients' treatment with gastrointestinal problems. This study is constituted of a bibliographical revision, based in data generated by the scientific literature, in which took place a consultation in the bases of data Lilacs, Scielo and PUBMED, using original papers and bibliographical revisions of 2003 to the present date, in the Portuguese and English languages. Initial studies revealed that they contain composed bioativos that showed potent action antitumor and anti-leukemic in very low doses. However, its more popular use is in the treatment of ulcers, indigestion, chronic gastritis and, dyspepsia, because it was observed that extracts hexano and ethyl acetate of *Maytenus ilicifolia* promote an increase of the gastric volume and of the pH in the stomach, they presented action anti-ulcerogenic and anti-inflammatory. It was observed that the extract of leaves of *Maytenus ilicifolia* reduces the acid secretion in the gastric mucous membrane of frogs, with effect similar to the medicine cimetidina. Starting from the analysis of the data, it can be observed that the *Maytenus ilicifolia* is capable to help in the patients' treatment with gastrointestinal problems due to its gastroprotector effect as form of improving the patient's therapeutics.

**KEYWORDS:** *Maytenus ilicifolia*; gastrointestinal problems; anti-ulcerogenic.

## 1 | INTRODUÇÃO

A *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecidas como espinheira-santa ou cancosa, pertence à família Celastraceae possuindo 55 gêneros e 850 espécies espalhadas nas regiões trópicas e subtrópicas do mundo. No Brasil é encontrada no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Diversas atividades farmacológicas são atribuídas à planta como antiácido, antiespasmódico, antiinflamatório e cicatrizante. Também é usada no tratamento de úlceras pépticas e gastrite crônica. O seu valor terapêutico é atribuído principalmente aos polifenóis (flavonóides e taninos) e triterpenos (CALOU, *et al.*, 2014). A úlcera péptica é uma doença crônica, resultante de um desequilíbrio entre fatores protetores e agressores da mucosa gástrica. Pode ser causada por multifatores, como por exemplo, fatores genéticos e álcool, mas está associado ao uso indiscriminado de AINES e identificação da *Helicobacter pylori* (RUIZ-NARVAEZ, *et al.*, 2018). Estudos apontam que o uso de plantas podem ser utilizadas para prevenção e tratamento de doenças gástricas. Então, o objetivo deste trabalho foi analisar o uso da Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) no tratamento de pacientes com problemas gastrointestinais.

## 2 | METODOLOGIA

Este estudo constitui-se de uma revisão bibliográfica, fundamentada em dados gerados pela literatura científica, no qual realizou-se uma consulta nas bases de dados Lilacs, Scielo e PUBMED, utilizando artigos originais e de revisão de 2003 até a data presente, nos idiomas português e inglês. Os artigos foram selecionados para esta pesquisa de acordo com os critérios: abordagem sobre a atividade anti-ulcerogênica de *Maytenus ilicifolia*, publicação dos últimos 15 anos e disponibilidade do texto completo.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos iniciais revelaram que *Maytenus ilicifolia* contém compostos bioativos que mostraram potente ação antitumoral e antileucêmica em doses muito baixas. Entretanto, seu uso mais popular é no tratamento de úlceras, indigestão, gastrites crônicas e, dispepsia, pois observou-se que extratos hexano e etilacetato de *Maytenus ilicifolia*, promovem um aumento do volume gástrico e do pH no estômago, além de apresentar ação anti-ulcerogênica e antiinflamatória (TABACH & OLIVEIRA, 2003). Foi observado que o extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* reduz a secreção ácida na mucosa gástrica de rãs, com efeito semelhante ao medicamento cimetidina (FERREIRA, *et al.*, 2004). Outros estudos mostram que a planta atua na recomposição da flora intestinal e inibição de bactérias patogênicas, como laxante, para eliminar toxinas através dos rins e pele e para regular a produção do ácido clorídrico do estômago (JESUS & CUNHA, 2012).

Vários flavonóides foram identificados em extratos de *Maytenus ilicifolia* sendo a estes atribuídos atividade anti-ulcerogênica pela inibição da secreção ácida gástrica tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Baggio e colaboradores observaram em seu estudo com a fração rica em flavonóides extraída das folhas de *Maytenus ilicifolia* uma efetividade na proteção contra úlceras agudas e crônicas por inibição da secreção ácida gástrica. Nas lesões agudas induzidas por etanol foi observada uma redução significativa com o tratamento prévio dos animais com o extrato rico em flavonóides, no entanto não foi observada nenhuma alteração nos mecanismos citoprotetores. Já nos animais com lesões induzidas por indometacina, fármaco que inibe a produção de prostaglandinas - responsável pela integridade da mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida e estimulação da secreção de bicarbonato - houve uma proteção significativa da mucosa dos animais pré-tratados com a fração rica em flavonóides, indicando assim ação dos flavonóides da planta no sistema ciclooxigenase-prostaglandina (BAGGIO, *et al.*, 2007).

Alguns triterpenos relatados em literaturas foram identificados em extratos de *Maytenus ilicifolia*, onde são sugeridos como substâncias responsáveis pela terapia de enfermidades gastrintestinais, como é o caso do friedelan-3-ol e o friedelan-3-on, destacados no tratamento da úlcera gástrica. Eles foram caracterizados de

extratos obtidos com etilacetato através de cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massas (CALOU *et al.*, 2014).

Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos ajudam na recuperação, formando uma camada protetora sobre a mucosa ou a pele, protegendo e favorecendo a recuperação natural do organismo. No caso na *Maytenus ilicifolia*, junto dos óleos essenciais, os taninos, principalmente a epigalocatequina são responsáveis por parte dos efeitos gastroprotetores (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em seu estudo, Tabach e colaboradores observaram que o uso prolongado da planta não causou genotoxicidade e nem teratogenicidade, sendo essa planta uma importante alternativa para o tratamento de úlceras gástricas devido sua alta segurança e eficácia observadas em diversos estudos (TABACH *et al.*, 2017).

## 4 | CONCLUSÃO

Diante da análise dos conteúdos pesquisados nas bases de dados informadas, pode-se observar que a *Maytenus ilicifolia* é capaz de ajudar no tratamento de pacientes com problemas gastrointestinais devido às suas propriedades antiinflamatória e antiulcerogênica - efeito gastroprotetor - como forma de melhorar a terapêutica do paciente.

## REFERÊNCIAS

- BAGGIO, C. H. *et al.* Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 433-440, 2007.
- CALOU, I. B. F. *et al.* A atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 2, p. 33-42, 2014.
- FERREIRA, P. M. *et al.* A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v. 219, n. 2, p. 319-324, 2004.
- JESUS, W. M. M.; CUNHA, T. N. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 2, n. 1, p. 20-46, 2012.
- RUIZ-NARVAEZ, C. E. *et al.* *Helicobacter pylori*, úlcera péptica y cáncer gástrico. **rev.fac.med.**, Bogotá, v. 66, n. 1, p. 103-106, Mar. 2018.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 650-659, 2009.
- TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract. part I—preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 915-920, 2017.
- TABACH, R.; OLIVEIRA, W. P. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of a dry extract of *Maytenus*

ilicifolia Martius ex. Reiss produced by a jet spouted bed dryer. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 8, p. 573-576, 2003.

TORRES, O. J. M. *et al.* Atividade de *Orbignya phalerata* e *Euterpe edules* na prevenção e no tratamento da úlcera péptica em ratos. **ABCD, arq. bras. cir. escavação**. São Paulo, v. 31, n. 3, e1390, 2018.

## UTILIZAÇÃO DE NEUROPROTETORES FAVORECE A SOBREVIDA DOS MOTONEURÔNIOS DA MEDULA ESPINAL NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

**Thaís Costa Porto Marinho**

Centro Universitário IBMR, Rio de Janeiro, RJ

**Angélica Dutra de Oliveira**

Centro Universitário IBMR, Rio de Janeiro, RJ

**RESUMO:** A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pelo acometimento do neurônio motor superior e inferior, tronco encefálico e medula espinal, causando fraqueza muscular progressiva e atrofia. É uma doença multifatorial, caracterizada pela mutação na enzima Cu/Zn superóxido dismutase-1 (SOD1). As causas mais prováveis para surgimento e desenvolvimento da doença se implicam na excitotoxicidade do glutamato, no entanto, estratégias neuroprotetoras e neuroregenerativas, surgiram como uma forma de tratamento promissora na tentativa de redução da progressão da degeneração neural. O delineamento metodológico seguiu o modelo PRISMA. Foram utilizadas as bases de dados: PUBMED, Lilacs, Scielo, Science Direct e Bireme, sem filtro de data inicial até julho de 2018. Para quantificar os efeitos do tratamento foi utilizado o tamanho do efeito (g), corrigido pelo viés (g de Hedge) com IC de 95%. As metanálises foram aplicadas usando o modelo de efeito fixo a partir da heterogeneidade dos tamanhos de efeito. Os neuroprotetores

utilizados por Tollosa (2011), Crossio (2012) e Lee (2012) apresentaram redução na concentração do glutamato, diminuindo o processo inflamatório e reduzindo os níveis de agentes oxidantes. Nesse contexto, foi avaliado os níveis de THA, NF-KB e TNF para avaliar a possível neuroproteção. A mensuração do THA demonstrou efeito -5,67. Em relação ao % NF-KB, o mesmo mostrou um efeito 119,19 ( $p < 0,0001$ ). Por último, a avaliação dos níveis de TNF apresentou um efeito 176,78 ( $p < 0,0001$ ). A análise estatística dos dados demonstrou que houve redução nos níveis extracelulares de TNF e na ativação NF-KB, sugerindo que a utilização dos neuroprotetores minimizou a morte neuronal. Sendo assim, sugere-se que a utilização de neuroprotetores na ELA promove maior sobrevivência dos motoneurônios da medula espinal, possibilitando a redução do processo inflamatório e da neurodegeneração. No entanto, esses neuroprotetores agem em diferentes vias, assim a utilização de dois ou mais neuroprotetores em conjunto poderia repercutir em resultados diferentes.

**PALAVRAS-CHAVES:** Esclerose Lateral Amiotrófica, ELA, Doença do neurônio Motor, Neuroinflamação, Excitotoxicidade.

**ABSTRACT:** Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by the death of upper and lower



motor neurons, brainstem and spinal cord, causing a progressive muscle weakness and atrophy. Its cause is multifactorial characterized by to a mutation in the Cu/Zn-superoxide dismutase gene (SOD1). The most likely causes for the onset and development of the disease imply excitotoxicity in the presence of glutamate, however, the neuroprotective and neurodegenerative strategies emerged as a promising form of treatment in an attempt to reduce the progression of neural degeneration. The methodological lineation was performed according to the declaration of the PRISMA, based on articles searched in the databases: Pubmed, Lilacs, Scielo, Science Direct and Bireme. The search was limited to English language publications, having no filter from the initial date until July 2018. To quantify the effects of the treatment, the effect size (g), corrected for bias (g of Hedge) with 95% CI was used. The Meta-analyzes were used using the fixed effect model of the heterogeneity of effect sizes. The neuroprotectors were used by Tollosa (2011), Crossio (2012) and Lee (2012), in reducing glutamate, decreasing the action process and levels of oxidizing agents. In this context, levels of THA, NF-KB and TNF have been published to assess neuroprotection. A THA measurement showed an effect -5,67. Regarding %NF-KB, it had a 119.19 ( $p < 0.0001$ ) effect. Finally, an evaluation of TNF levels showed an effect 176,78 ( $p < 0.0001$ ). A statistical analysis of the data was restricted in the extracellular domains of TNF and NF-KB, suggesting that the use of neuroprotectors minimized neuronal death. Therefore, they suggest that the use of neuroprotectors in ALS promotes a greater survival of the spinal cord motoneurons, allowing a reduction of the process of combat to neurodegeneration. However, neuroprotectors act in different ways, as the use of two or more neuroprotectors together could have repercussions on different results.

**KEYWORDS:** Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS, Motoneurons diseases, Neuroinflammation, Excitotoxicity.

## 1 | INTRODUÇÃO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pelo acometimento dos neurônios motores superiores (NMS) e inferiores (NMI), tronco encefálico e medula espinal, sendo de rápida progressão [1,14,15].

A idade média do aparecimento da doença ocorre entre 50 e 65 anos, além de possuir um tempo curto de sobrevida, cerca de 3-5 anos. Aproximadamente 5 - 8% dos casos de ELA são familiares, e cerca de 20% ocorre devido a uma mutação no gene da superóxido dismutase Cobre/Zinco (SOD1) [12,18].

Possui perfil multifatorial e de etiologia desconhecida, com variedade genética e fatores ambientais. As causas mais prováveis para o desenvolvimento da doença implicam a excitotoxicidade na presença do glutamato, estresse oxidativo, alteração na função mitocondrial e neuroinflamação [15].

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), possuindo grande importância na cognição, transporte rápido no impulso nervoso, memória, movimentação, sensação, além de ser crucial para a plasticidade

sináptica. Os neurônios do SNC possuem dois tipos de receptores de glutamato: os ionotrópicos e o metabotrópicos. Os ionotrópicos são divididos em três grupos: N-metil-D-aspartato (NMDA), amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato e Kainato (AMPA/KA) e os metabotrópicos são do grupo mGluR, que podem ser mGluR1, mGluR3 e mGluR5 [4,19,20].

A definição de ionotrópico se dá devido a ativação desses receptores através de íons, ou seja, o aumento da concentração de íons específicos modulará positivamente a ativação dos receptores NMDA e AMPA/KA através do  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^{+}$  respectivamente. Ambos se agregam no mesmo complexo proteico transmembranar, dessa forma, a neurotransmissão mediada pelos receptores iGluRs são rápidas. [19,20].

No entanto, a ativação dos receptores metabotrópico ocorre por meio de uma proteína G que ao ser fosforilada desencadeará uma cascata de reações intracelulares, possibilitando a ativação de canais iônicos localizados na superfície da membrana plasmática do neurônio pós sinápticos, sendo considerada uma neurotransmissão mais lenta [19,20].

Segundo Ruggiero e col (2011), os receptores NMDA ficam localizados na membrana pós sináptica das sinapses excitatórias e possuem maior permeabilidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  do que os receptores AMPA e KA. Essa maior permeabilidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  faz com que ele contribua diretamente com mecanismos neurotóxicos.

Na família dos receptores L-Glu o mais estudado é o NMDA. Em estudos prévios, receptores L-Glu estão envolvidos no mecanismo de excitotoxicidade e degeneração neural e isto foi reforçado quando utilizaram injeção de NMDA intravítrea como um modelo de lesão in Vivo, estimulando a degeneração de células da retina de ratos. Sendo assim, o aumento da concentração do glutamato pode exercer em algumas situações efeitos neurotóxicos que podem induzir a degeneração neural. Segundo Sungyoub e col (2012), a excitotoxicidade causada pelo aumento dos níveis do glutamato tem se mostrado significativamente importante para a degeneração dos neurônios motores nesta patologia [13,16,17,19,23,25].

Esta hipótese é sustentada pelo aumento da concentração de glutamato encontrado no fluido cérebro espinal em pacientes com ELA [7]. Isso ocorre devido a uma diminuição da recaptção do glutamato pelas células da Glia e por transportadores próprios (GLT-1) presentes nas células neuronais pré-sinápticas e da medula espinal. A ineficiência na recaptção resulta em uma excessiva concentração de glutamato na fenda sináptica, ocasionando uma hiperestimulação dos receptores de glutamato. Promovendo a elevação nos níveis de  $\text{Na}^{+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo promover morte neuronal (Figura 1) [7,25].

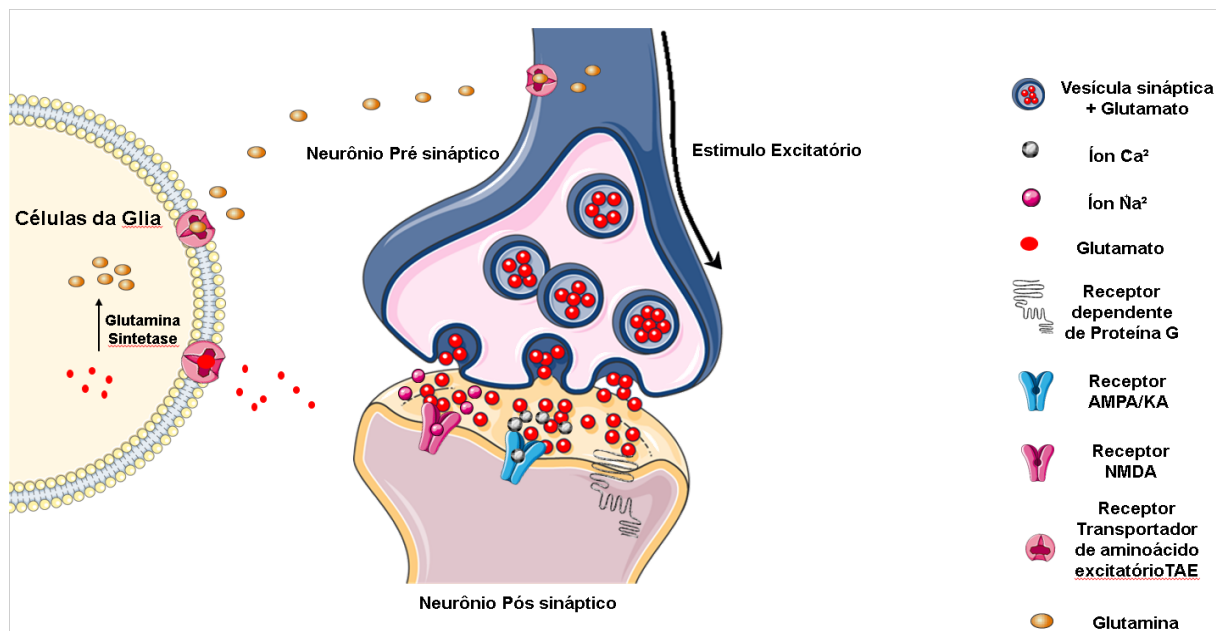


Figura 1: Ilustração da transmissão glutamatérgica e ativação dos receptores NMDA, AMPA/KA e mGluR através dos íons  $\text{Na}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$ . Após o estímulo excitatório, as células da glia e transportadores próprios do neurônio pré-sináptico realizam a recaptação do glutamato.

Dessa forma, a morte neuronal ocasionada pela excitotoxicidade promove um quadro neuroinflamatório. Em contrapartida, as células da Glia quando lesadas, liberam citocinas pró-inflamatórias, dentre elas interleucina seis (IL-6), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral (TNF), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Ciclooxygenase 2 (COX2), prostaglandina (PGE2) e espécie reativa de oxigênio (ROS) [1,5,11,15,18,25].

A síntese desses mediadores pró-inflamatórios e outros mecanismos de sinalização celular presentes na ELA induz a ativação do NF-KB. O NF-KB é um fator de transcrição nuclear que pode ser ativado através de estresse oxidativo e aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, além de estar envolvido na resposta imune inata e adaptativa [4]. Quando esse fator não está ativado ele se encontra no citoplasma ligado a uma proteína inibitória IKB. Esse complexo IKB impede a translocação do NF-KB para o núcleo aonde este será fosforilado e ativado [5,7].

Inúmeros fatores levam a fosforilação do IKB, o que é importante para a sua degradação. Dessa forma, depois de fosforilada IKB recebe a adição de uma ubiquitina, sendo endereçada para a degradação via proteassoma e resultando na ativação do NF-KB. No entanto, para controlar essa ativação, o NF-KB possui um inibidor fisiológico o IKB $\alpha$ . O IKB $\alpha$  se juntará a p50 impedindo que ela esteja livre e se associe ao NF-KB e conseqüentemente, translocada para o núcleo [5,7].

Estudos recentes apresentam diversos neuroprotetores, dentre eles o Cape, Bay - 11-7082, Receptor antagonista AMPA/KA [CNQX], Grelina, Antocianina, GFAP-IkBaAA e GFAP-IkBaAA/SOD1G93A. Estes possuem mecanismos de ação diferenciados na contenção da neurodegeneração e na diminuição do processo inflamatório. Alguns agem inibindo a ativação do NF-KB, na ativação microglial e conseqüentemente, promove a diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios. Outros, competirão pelo

mesmo sítio de ligação do glutamato, reduzindo o estresse oxidativo e ROS [1,10,15, 21].

Neste trabalho abordamos a ação dos neuroprotetores interferindo na excitotoxicidade promovida pelo glutamato e correlacionando com um melhor prognóstico da ELA. Desta forma, analisamos a efetividade dos neuroprotetores na contenção da degeneração neuronal e a sua possível eficácia no aumento da sobrevivência dos neurônios motores.

## 2 | METODOLOGIA

A revisão sistemática foi desenvolvida de acordo com a declaração do PRISMA, com base em artigos pesquisados nos bancos de dados do Pubmed, Lilacs, Scielo, Science Direct e Bireme. As buscas foram realizadas na língua inglesa, sem filtro para data inicial e até julho de 2018. As palavras chaves utilizadas para a realização da pesquisa foram ELA, Esclerose Lateral amiotrófica, doença do sistema imune, desordem imune e neuroinflamação.

Após a elaboração das palavras chaves, a busca nas bases de dados apresentou um total de 1.297 artigos, onde após a análise dos títulos e resumos foram selecionados 100 artigos para a leitura dos artigos integra. Após a aplicação dos critérios de inclusão, 6 artigos que contemplaram os critérios de elegibilidade, conforme demonstrado na figura 2.

Dados utilizados na análise estatística foram passados para o software Stata Intercooled 9.2. Os dados foram combinados, e realizamos metanálise com modelo de efeitos fixos. Para quantificar os efeitos do tratamento foi utilizado o tamanho do efeito (g), corrigido pelo viés (g de Hedge), com intervalo de confiança (IC) de 95%. Foram realizados testes de heterogeneidade e viés de publicação após análise, e os valores de  $p < 0,0001$  e  $p < 0,05$  foram considerados indicativos de heterogeneidade dos tamanhos de efeito.

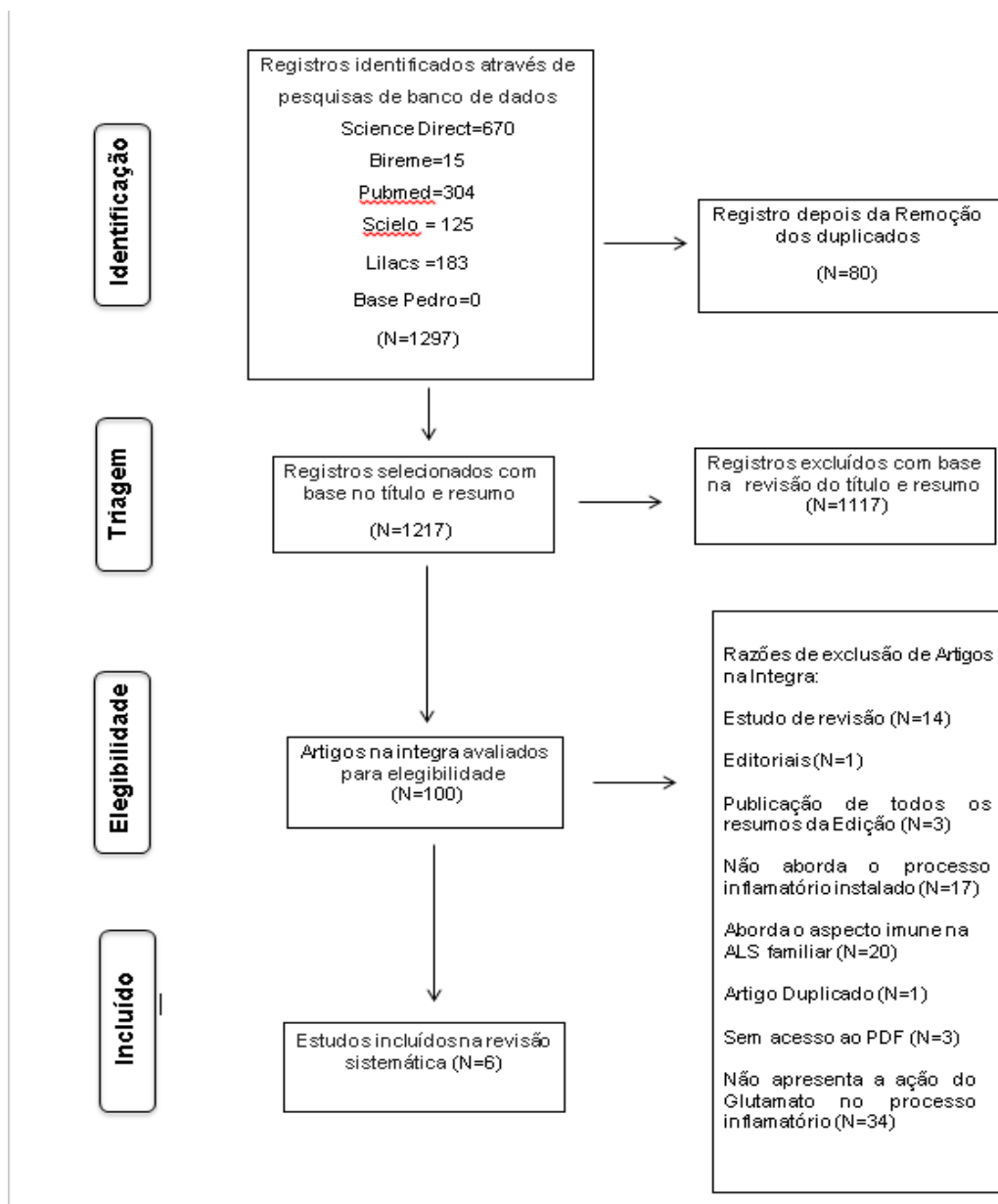


Figura 2: Fluxograma

### 3 | RESULTADO

A Metanálise foi realizada para cada indicador presente nos estudos, respeitando as avaliações e de acordo com a disponibilidade de indicadores, visto a existência de lacunas em determinados indicadores. Das análises metanalíticas realizadas verificam-se todos os valores de P com significância estatística (Tabela 1).

Neste estudo, foram observados efeitos dos neuroprotetores na contenção da neurodegeneração no grupo controle e experimental, e a correlação com a porcentagem do número de neurônios motores da medula espinal de ratos.

Indicador	Estudos	Paciente		Controle		Efeito Geral*	95%-IC	p-valor
		Média	±DP	Média	±DP			
THA	Tolosa, 2011	11,6	0,95	13	1,1	-5,67	[-2,16; -0,64]	<0,0001
	Lee, 2012	6,65	0,515	15,76	1,25			

% NF-KB	Tolosa, 2011	376,3	31,55	110,5	28,39	119,19	[243,57; 288,03]	<0,0001
	Crosio, 2012	105,8	6,7	35,8	9,2		[57,12; 82,88]	
TNF	Tolosa, 2011	1108,6	139,15	200	143,45	176,78	[803,91; 1.013,29]	<0,0001
	Lee, 2012	165,2	41,05	17,8	5,75		[126,42; 168,38]	

Tabela 1: Análise descritiva de cada indicador presente nos estudos.

Na ausência de neuroproteção, observamos uma redução do número de neurônios motores da medula espinal. O gráfico 1 mostra o tamanho de efeito dos estudos do Tolosa e col e Lee e col, onde comparamos o tamanho de efeito dos grupos com a presença de um indutor da degeneração threohydroxyaspartate (THA) e na ausência de neuroproteção. O THA é um inibidor da recaptção de glutamato, ou seja, ele inibe o transportador de glutamato induzindo um quadro de excitotoxicidade [15].

A partir da análise do gráfico 1, observamos um efeito geral de – 5,67 indicando que o grupo com ausência de neuroproteção e com a utilização do THA foi favorecido, ou seja, na ausência de neuroproteção e com a indução da degeneração observa-se uma redução do número de motoneurônios na medula espinal.

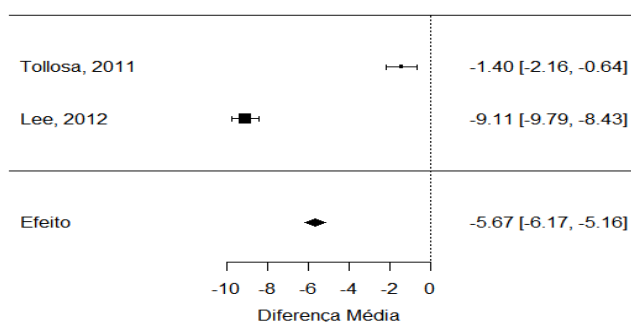


Gráfico 1: *Forest Plot* com Número de Neurônio Motor. Analisando o efeito da redução do Número de Neurônio motor da medula espinal, foi observado um efeito negativo -5,67 indicando uma diferença significativa entre pacientes e controles.

No entanto, na presença de neuroproteção, observamos uma redução da ativação de NF-KB o que promove uma diminuição da ativação astrocitária e redução da liberação de glutamato. Com a diminuição da concentração de glutamato na fenda sináptica, modulará negativamente os seus receptores localizados nos neurônios motores, reduzindo o influxo de  $Ca^{+2}$  e  $Na^{+}$ , minimizando o efeito da hiperestimulação e da sua excitotoxicidade (figura 2).

No gráfico 2, apresentamos o tamanho de efeito do estudo do Tolosa e col e Crosio e col, observamos o tamanho de efeito dos grupos com ausência e presença de neuroproteção. A partir dessa análise, demonstramos um efeito geral de 119,19, indicando que o grupo com a presença de neuroproteção foi favorecido em relação ao grupo com ausência de neuroproteção.

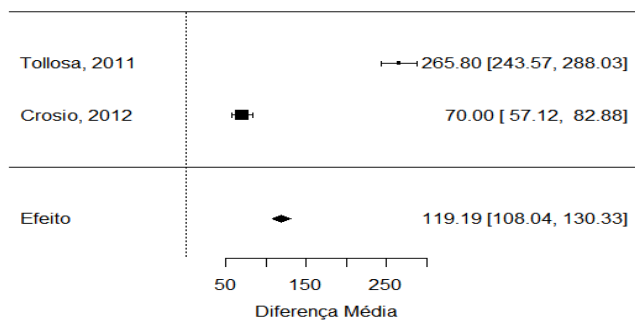


Gráfico 2: Forest Plot para a porcentagem de NF-KB. Analisando os efeitos de cada estudo, o efeito geral foi igual a 119,19 indicando uma diferença significativa entre pacientes e controles.

Além da redução da ativação de NF-KB, observamos também uma redução dos níveis extracelulares de TNF. Essa redução promove uma diminuição da ativação de NF-KB, o que irá refletir na redução da ativação astrocitária, na liberação de glutamato e conseqüentemente, uma diminuição da ativação microglial (figura 3).

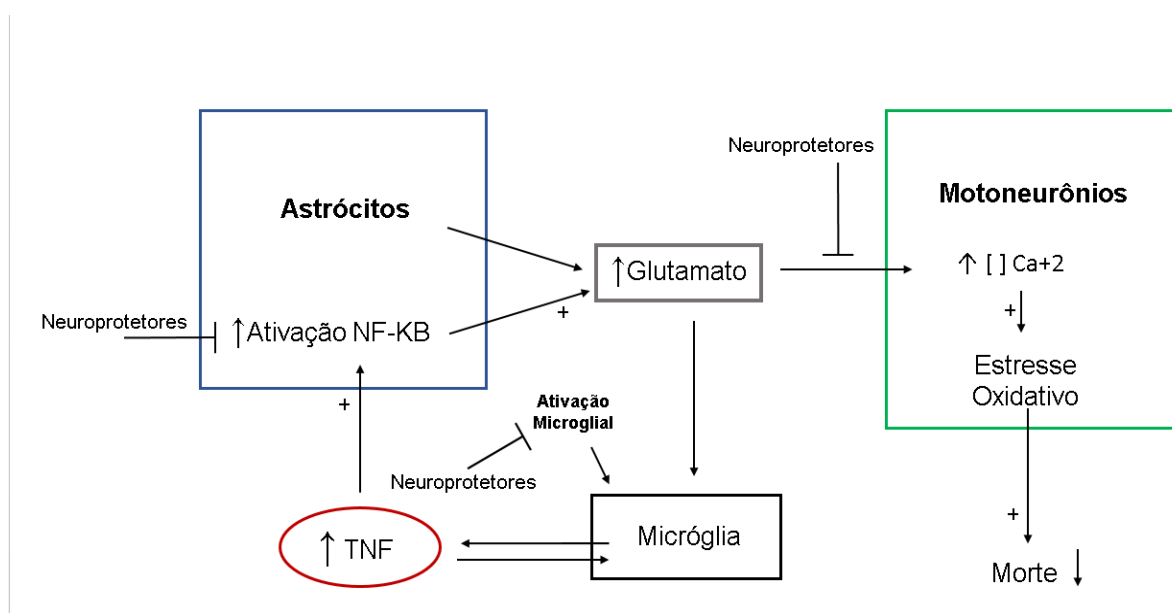


Figura 3: Inibição da ativação do NF-KB, ativação Microglial e hiperestimulação dos receptores de glutamato na presença de neuroproteção (Tolosa e col, 2011; Lee e col, 2012; Crosio e col, 2012).

O gráfico 3, mostra uma redução dos níveis extracelulares de TNF, onde analisamos os estudos do Tollosa e col e Lee e col e comparamos o tamanho de efeito entre os grupos. A partir dessa análise, observamos um efeito geral de 176,78 indicando que o grupo com a presença de neuroproteção foi favorecido em relação ao grupo com ausência de neuroproteção.

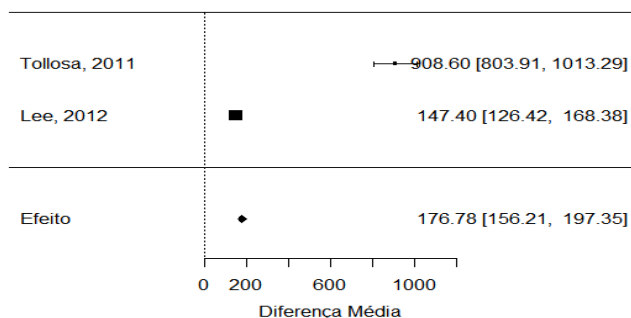


Gráfico 3: Forest Plot do indicador de TNF. Analisando os efeitos de cada estudo e o efeito geral foi de 176,78 indicando uma diferença significativa entre pacientes e controles.

Dessa forma, podemos concluir, a partir dos dados acima, que na presença de neuroproteção o processo degenerativo é atenuado devido à redução de fatores pró-inflamatórios que induzem o aumento da concentração de glutamato e favorecem o quadro neuroinflamatório. Assim, por meio de estratégias neuroprotetoras e neuroregenerativas é possível promover uma sobrevida aos motoneurônios da medula espinal nessa patologia.

#### 4 | DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a patogênese da ELA tem sido obtido, na maioria das vezes, a partir de modelos animais com a forma familiar, e este conhecimento tem permitido desenvolver modelos celulares *in vitro* para a forma esporádica e estudar as propriedades de sobrevivência destas células, sua interação com outros tipos celulares e a suscetibilidade em condições ambientais, que são alguns dos fatores envolvidos na patogênese da doença [2,9].

As doenças neurodegenerativas agudas e crônicas possuem a característica comum de perda de neurônios por mecanismos originados pela sobreativação dos receptores de glutamato, o qual ocorre por uma excessiva excitação sináptica mediada por este aminoácido, ao que chamamos excitotoxicidade. Por esse motivo, é importante sabermos os mecanismos de receptação do glutamato por neurônios ou células gliais, determinando o tempo que o neurotransmissor estará disponível na sinapse [6, 8].

A expressão alterada dos transportadores de glutamato na ELA é talvez um dos melhores exemplos estudados ligando neuropatologia à disfunção do transportador glutamatérgico. Em uma série de estudos descobriu-se um aumento nos níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano, uma diminuição na atividade de transporte, e níveis diminuídos de receptores recaptadores de glutamato em pacientes com ELA, em comparação com um controle ou população de referência com indivíduos que morreram de doenças não neurológicas [22].

Várias hipóteses foram cogitadas sobre a geração possível desta doença as mais citadas são: excitotoxicidade mediada por receptores AMPA, e toxicidade causada por



ganho de função de SOD1 mutado, o que eleva a geração de espécies reativas de oxigênio [6].

Para muitas doenças do sistema nervoso associadas com expressão alterada do transportador de glutamato, a atividade (e em alguns casos os níveis de proteína) foi medida em tecidos periféricos, evidenciando que muitos destes transportadores  $\text{Na}^+$  dependente não são exclusivos do sistema nervoso. Na verdade, a atividade do transporte  $\text{Na}^+$  dependente é mais baixa em plaquetas de pacientes com ELA e os níveis de glutamato no plasma são mais elevados [22].

Em nosso estudo, Tolosa e Lee, demonstram que a utilização de THA promoveu a inibição da recaptção do glutamato pelas células da glia e por transportadores próprios presentes nas células neuronais pré-sinápticas e da medula espinal. Essa inibição resulta em uma excessiva concentração de glutamato na fenda sináptica, ocasionando uma hiperestimulação de seus receptores promovendo um aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ , levando a morte neuronal.

No entanto, quando utilizado a neuroproteção, a análise estatística dos dados demonstrou que houve redução nos níveis extracelulares de TNF e na ativação NF-KB, sugerindo que a utilização dos neuroprotetores reduziu ativação microglial, astrocitária e minimizou o impacto neuronal.

Devido à importância da excitotoxicidade glutamatérgica como fator importante no desenvolvimento da ELA e à inexistência de fármacos eficientes para o tratamento, considera-se fundamental o estudo de drogas que possam reverter esta toxicidade, através da modulação da transmissão de glutamato. Além disso, lesão causada por estresse oxidativo parece ser fator patogênico comum nas diversas doenças neurológicas [24].

Sendo assim, sugere-se que a utilização dos neuroprotetores na ELA teria um papel importante em promover uma maior sobrevivência dos motoneurônios da medula espinal, possibilitando a redução do processo inflamatório, do estresse oxidativo e da neurodegeneração. No entanto, esses neuroprotetores possuem diferentes mecanismos de ação, assim a utilização de dois ou mais neuroprotetores em conjunto poderia repercutir em resultados diferentes na contenção da neurodegeneração.

## REFERÊNCIAS

1. Aimee N. Winter, Erika K. Ross, Heather M. Wilkins, Trisha R. Stankiewicz, Tyler Wallace<sup>1</sup>, Keith Miller, Daniel A. Linseman. An anthocyanin-enriched extract from strawberries delays disease onset and extends survival in the hSOD1<sup>G93A</sup> mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nutritional Neuroscience*, 2017.
2. Andrews J. Amyotrophic lateral sclerosis: clinical management and research update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2009;9(1):59-68.
3. Antero Salminen & Juha M. T. Hyttinen & Kai Kaarniranta. AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med* (2011) 89:667–676.

4. Antonio de Pádua Carobrez. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. *Rev Bras Psiquiatr* 2003;25(Supl II):52-8.
5. Claudia Crosio, Cristiana Valle, Arianna Casciati, Ciro Iaccarino, Maria Teresa Carri. Astroglial Inhibition of NF- $\kappa$ B Does Not Ameliorate Disease Onset and Progression in a Mouse Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *PLoS ONE*, 2011, Vol 6, Issue 3, e17187.
6. Corona JC, Tapia R. Mecanismos de Neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico*.2005; 29: 17-28.
7. Eunjin Lim, Sungyoub Lee, Endan Li, Yumi Kim, Seungjoon Park. Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate-induced excitotoxicity via ERK1/2 and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathways. *Experimental Neurology*, 230 (2011) 114–122.
8. Grewer C, Rauen T. Electrogenic Glutamate Transporters in the CNS: Molecular Mechanism, Pre-steady-state Kinetics, and their Impact on Synaptic Signaling. *J Membr Biol*. 2005; 203(1):1-20.
9. Hou LL, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2008;51(3):287-294.
10. Isaias Glezera, Tania Marcourakisa,b, Maria Christina Werneck Avellarc, Clarice Gorensteina,b, Cristoforo Scavonea. The role of the transcription factor NF- $\kappa$ B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. *Rev Bras Psiquiatr* 2000;22(1):26-30.
11. J. V. Berger, a. O. Dumont, m. C. Focant, m. Vergouts, a. Sternotte, a.-g. Calas, s. Goursaud and e. Hermans. opposite regulation of metabotropic glutamate receptor 3 and metabotropic glutamate receptor 5 by inflammatory stimuli in cultured microglia and astrocytes. *Neuroscience* 205 (2012) 29–38.
12. James A. Oakes<sup>1,2</sup>, Maria C. Davies<sup>2</sup> and Mark O. Collins. TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular Brain* (2017) 10:5.
13. Jeffrey D. Rothstein, M.D., Ph.D., Lee J. Martin, Ph.D., and Ralph W. Kuncl, M.D., Ph.D. Decrease glutamate transport by the brain and spinal cord in Amyotrophic Lateral Esclerosis. *The new england journal of medicine*, 1992.
14. Katie Moisse , Michael J. Strong. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica*, 2006, *Acta* 1762 (2006) 1083–1093.
15. Laia Tolosa, Víctor Caraballo-Miralles, Gabriel Olmos, Jerònia Lladó. TNF- $\alpha$  potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF- $\kappa$ B. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2010, 46 (2011) 176–186.
16. Mike O. Karla, Susan Hayesa, Branden R. Nelsona, Kristine Tana, Brian Buckinghamb, and Thomas A. Reha. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *PNAS*, December 9, 2008, vol. 105, no. 49, 19509.
17. Nikolas L. Jorstad, Matthew S. Wilken<sup>1</sup>, William N. Grimes<sup>3</sup>, Stefanie G. Wohl<sup>1</sup>, Leah S. VandenBosch, Takeshi Yoshimatsu<sup>1</sup>, Rachel O. Wong<sup>1</sup>, Fred Rieke, and Thomas A. Reh. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*. 2017 August 03; 548(7665): 103–107.
18. Pooja-Shree Mishra, Dinesh K. Dhull, A. Nalini, K. Vijayalakshmi, T. N. Sathyaprabha, Phalguni Anand Alladi and Trichur R. Raju. Astroglia acquires a toxic neuroinflammatory role in response to the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Neuroinflammation* (2016) 13:212
19. Rafael N. Ruggiero , Lezio S. Bueno-Júnior , Jana B. de Ross , Helene A Fachim<sup>3</sup> , Fernando

E. Padovan-Neto<sup>2</sup>, Suélen Merlo<sup>1</sup>, Carlos J. S. Rohner, Érika T. Ikeda, Janaína Brusco e Jorge E. Moreira. Glutamatergic neurotransmission and synaptic plasticity: molecular, clinical, and phylogenetic aspects. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2011;44(2): 143-56.

20. Rafael Rodrigues LIMA, Ana Maria Rabelo COSTA, Renata Duarte DE SOUZA e Wallace GOMES-LEAL. Secondary Neurodegeneration And Excitotoxicity. *Revista Paraense de Medicina* V.21 (1) janeiro-março 2007.

21. Shahid Ali Shah, Faiz Ul Amin, Mehtab Khan, Muhammad Noman Abid, Shafiq Ur Rehman, Tae Hyun Kim, Min Woo Kim and Myeong Ok Kim. Anthocyanins abrogate glutamate-induced AMPK activation, oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegeneration in postnatal rat brain. *Journal of Neuroinflammation* (2016) 13:286.

22. Sheldon AL, Robinson MB. The Role of Glutamate Transporters in Neurodegenerative Diseases and Potential Opportunities for Intervention. *Neurochem Int.* 2007; 51: 333-5.

23. Sotaro Ooto, Tadamichi Akagi, Ryoichiro Kageyama, Joe Akita, Michiko Mandai, Yoshihito Honda, and Masayo Takahashi. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *PNAS* September 14, 2004 vol. 101, no. 37 13655.

24. Stroeh E. Estudo do inibidor da 3-Hidróxi 3-Metilglutaril-Coenzima A Redutase (Atorvastatina) na Transmissão e Toxicidade Glutamatérgica (monografia). Florianópolis: UFSC, 2008. 53 p.

25. Sungyoub Lee, Yumi Kim, Endan Li, and Seungjoon Park. Ghrelin Protects Spinal Cord Motoneurons Against Chronic Glutamate Excitotoxicity by Inhibiting Microglial Activation. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2012, 16: 43-48.

## **SOBRE OS ORGANIZADORES**

**LETÍCIA BANDEIRA MASCARENHAS LOPES** Farmacêutica, Graduada em Farmácia pelo Centro Universitário INTA (UNINTA). Especialista em caráter de Residência Multiprofissional em Urgência e Emergência (SCMS e UNINTA), especialista em Gestão e Logística Hospitalar pela Universidade Cândido Mendes (UCAM), pós - graduanda em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêutico, pela Escola Superior da Amazônia (ESAMAZ), pós - graduanda em Análises Clínicas e Microbiologia pela Universidade Cândido Mendes (UCAM).

**TIAGO SOUSA MELO** Possui graduação em FARMÁCIA pela Universidade Federal do Ceará (2009). Doutor em Biotecnologia em Saúde pela Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO. Atualmente é professor dos Cursos de Farmácia e Odontologia e gestor de pesquisa do curso de Farmácia do Centro Universitário INTA. Também exerce atividade como tutor da Residência Multiprofissional em Urgência e Emergência da Santa Casa de Misericórdia de SobralCE. Tem experiência na área de Farmacologia Pré-Clínica de Produtos Naturais, com ênfase no estudo de plantas medicinais com ação em distúrbios metabólicos (diabetes, dislipidemia e obesidade) e Farmacologia Clínica.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-322-4

