I CONGRESSO INTERNACIONAL BIOEXPERIENCE 2023

LIVRO DE RESUMOS

1º Edição
Viçosa/ MG

***Copyright*©** Renner Philipe Rodrigues Carvalho, Rosinéa Aparecida de Paula, Silvânia Mól Pelinsari, Manoela Maciel dos Santos Dias, Rômulo Dias Novaes, Reggiani Vilela Gonçalves, Giuseppe Valacchi, Allan Rodrigues Pires, Caroline Tomaz Massardi, Eduarda Pires Costa, Fernanda Barbosa Lopes, Filipe Silveira Azevedo, Franciele de Assis Barbosa, Leonardo Lopes Silveira, Núbia Pagotto Matos, Patricia da Silva Mattosinhos, Rafael Neto Chirico, Adriano Simões Barbosa Castro, Gabriel Olufemi, Bianca Cristina Carvalho Reis, Faizan Ahmad, Isabela Pereira da Silva Bento, João Pedro Vianna Braga, Lucas Filipe Almeida, Luiz Vinicius de Souza Arruda, Luiza de Oliveira Possa, Marcela de Sá Hauck, Rayane Monique Bernardes Loch, 2024

Este livro segue as normas do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, adotado no Brasil em 2009.

Editor chefe: Dr. João Luiz Lani
Editor-chefe Adjunto: Dr. Renan Sallazar Ferreira Pereira

1ª impressão, 2024
Direitos desta edição reservados aos autores. *Printed in Brazil*/
Impresso no Brasil.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Ficha Catalográfica elaborada por Aline Graziele Benitez - CRB-1/3129

Congresso Internacional Bioexperience (1. : 2023 : Viçosa, MG)
I Congresso Internacional Bioexperience 2023 : livros de resumos. -- 1. ed. -- Viçosa, MG : Viçosa Editora & Consultoria Ambiental, 2024.

Vários autores.
Vários colaboradores.
Bibliografia.
ISBN 978-65-983001-4-2

1. Biologia - Congressos 2. Ciências da vida I. Título.

24-227557 CDD-574.06

COMITÊ EDITORIAL

Editor-Chefe
Dr. João Luiz Lani

Editor-chefe Adjunto:
Dr. Renan Sallazar Ferreira Pereira

Conselho Editorial
Dra. Ana Paula Gomes Soares Pereira, Universidade do Estado de Minas Gerais
Me. Christiano Demétrio de Lima Ribeiro, Universidade Federal de Viçosa, Brasil
Dr. Eustáquio Souza Dias, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Dr. Eder Paulo Moreira, Visiona Tecnologia Espacial S.A, Brasil
Dr. Emerson Ferreira Vilela, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Brasil
Dr. Eufran Ferreira do Amaral, Universidade Federal do Acre, Brasil
Dr. Jorge Silva Brito, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Dr. Luiz Carlos Couto, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Brasil
Dr. Marcelo Muta Hotta, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Dr. Renan Sallazar Ferreira Pereira, Universidade Federal de São João del-Rei, Brasil
Me. Silvania Mól Pelinsari, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

VICOSA EDITORA
Av. P. H. Rolfs, 305/1401, centro
CEP: 36.570 – 087- Viçosa, MG, Brasil
Tel. (31) 98656-3914

APOIO

BIO
EXPERIENCE
2023

Guaraciaba
CACHAÇA DE MINAS

BRAÚNA
specialty coffe

Jardim de
MINAS
decorações para eventos

Interodonto

Loja do
Laboratório

produtos
viçosa

Datamed
TECNOLOGIA PELA VIDA

FUNARBE
Fundação Arthur Bernardes

FAPEMIG

PESQUISA & PÓS-GRADUAÇÃO
Universidade Federal de Viçosa

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
UFV

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL
UFV- VIÇOSA

CCB
Centro de Ciências Biológicas

BIOCEL

APRESENTAÇÃO

O **I Congresso Internacional Bioexperience 2023** teve como objetivo principal promover o intercâmbio de conhecimentos e experiências entre palestrantes de renome nacional e internacional, além de profissionais e acadêmicos de graduação e pós-graduação de diversas áreas, como saúde, biologia, bioquímica, nutrição, farmácia, educação física, enfermagem e medicina. O evento visou fortalecer a colaboração interdisciplinar e fomentar a disseminação de avanços científicos e tecnológicos nessas áreas.

Email

bioexperience2023@gmail.com

Website

https://www.even3.com.br/congressobioexperience2023/

https://eventos.funarbe.org.br/i-congresso-internacional-bioexperience-2023

PREFÁCIO

É com imensa satisfação que apresentamos o livro de resumos do I Congresso Internacional Bioexperience 2023. Este evento foi cuidadosamente concebido para promover o intercâmbio de experiências e saberes entre uma ampla diversidade de participantes, incluindo palestrantes de renome nacional e internacional, além de profissionais e acadêmicos de graduação e pós-graduação. Contemplando áreas tão diversas quanto saúde, biologia, bioquímica, nutrição, farmácia, educação física, enfermagem e medicina, o congresso proporcionou um espaço singular para a discussão e o desenvolvimento de temas inovadores e de grande relevância científica.

A participação de especialistas de prestígio nacional e internacional foi um dos grandes destaques do evento, enriquecendo as trocas de conhecimento e oferecendo uma perspectiva global sobre os tópicos discutidos. Este livro de resumos, apresentado em versões simples e expandidas em inglês e português, reúne os conteúdos compartilhados ao

longo do congresso, refletindo a excelência e a diversidade dos trabalhos apresentados.

Esperamos que esta coletânea não apenas registre o êxito do Bioexperience 2023, mas também sirva de inspiração para futuras pesquisas e colaborações. Que este congresso seja o primeiro de muitos, continuando a promover a integração entre ciência, prática e inovação em um ambiente de aprendizado e crescimento constante.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- RESUMOS SIMPLES EM PORTUGUÊS.....13

Efeito das folhas de goiabeira, *Psidium guajava,* na qualidade das variáveis de qualidade de água no cultivo de larvas de barbo titeia , *Puntius titteya*.....13

Efeito do óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, em machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente, durante o transporte.....16

Potencial de ativos extraídos das partes aéreas de *Stachys Byzantina* K. Koch como ingredientes de dermocosméticos .19

Determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico das partes aéreas de *Stachys Byzantina K. K e* de suas partições pelos métodos do DPPH e do betacaroteno.....23

Treinamento físico resistido aumenta a expressão de marcadores de macrófago M2 no ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por Monocrotalina.....27

Cromatografia iônica: uma perspectiva verde na análise de alimentos.....30

Junção neuromuscular de camundongos adultos: modelo experimental de distrofia muscular de Duchenne.....33

Avaliação "in vitro" da eficiência do filme Antimicrobiano Incorporado com Nisina.....37

Treinamento físico resistido aumenta a expressão de mirna-1 e -214 no ventrículo direito de ratos sem prejudicar a função cardíaca 40

Perfil nutricional de crianças e adolescentes do ensino fundamental em escola municipal atendida pelo PNAE na cidade de Viçosa-MG 44

Efeitos do treinamento resistido associado ao tratamento com extrato de mirtilo sobre a concentração sanguínea de lactato em ratos com Hipertensão Arterial Pulmonar experimental 48

O treinamento físico combinado previne o remodelamento patológico do ventrículo esquerdo de ratos com Hipertensão Arterial Pulmonar 52

Repercussão do salto vertical na junção neuromuscular e ventre muscular em modelo experimental..... 55

Implementação de QR codes para otimização de processos e acesso em laboratório de pesquisa 58

Adaptações musculares do treinamento resistido agudo após modelo experimental de atrofia 62

Histomorfometria hepática de juvenis de Tilápia-do-Nilo *(Oreochromis niloticus)* alimentados com dietas suplementadas com óleo essencial de Hortelã-Pimenta (*Mentha piperita)* 66

Avaliação clínica pós-operatória da técnica de Ureterotomia Microcirúrgica: estudo experimental 69

Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* em isolados de Piodermite Canina – 10 anos depois 73

Utilização de membrana de celulose quimicamente modificada como método de desinfecção de efluentes.....76

Avaliação do tecido branquial de juvenis de lambaris-rosa (*Astyanax Lacustres*) após a anestesia com óleo essencial de hortelã pimenta (*Mentha Piperita*) 80

Efeito do uso do óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) como anestésico sobre o tecido branquial de juvenis de Lambaris-Rosa (*Astyanax lacustris*).....83

Transformação da levedura *Komagataella phafii* com o vetor pPICZαA-DENV1-NS1.....86

Abordagens de imunoinformática para construção de proteínas multi-epítopo a partir de proteínas estruturais do SARS-CoV-2 89

Mapeamento de diferentes sequências repetitivas nos cromossomos da formiga *Camponotus Rufipes* (Fabricius, 1775) 93

Avaliação de parâmetros oxidativos na próstata ventral de ratos após coexposição ao arsênio e níquel 96

Cefalexina- atualização para o uso clínico 100

O efeito subagudo do Calaris® em parâmetros espermáticos de camundongos Swiss 102

CAPÍTULO 2- RESUMOS SIMPLES EM INGLÊS 106

Physical-chemical characterization and fatty acid profile of Pequi Oil 106

Regional differences in porcine efferent ducts epithelium: morphological and histomorphometric description 109

Temperature-dependent alternative splicing affects gene expression in Aedes aegypti Mosquitoes Midgut.....113

Histomorphometric characteristics of the efferent duct epithelium in Equus Caballus 117

Dynamic activity of antioxidant enzymes in bovine epididymis 121

CAPÍTULO 3 - RESUMOS EXPANDIDOS EM PORTUGUÊS 125

Histologia das gônadas de *Ophioderma appressum* (Echinodermata) do Nordeste do Brasil 125

Sistema colorimétrico para detecção de *Pseudomonas* spp. à base de vesículas de pda e tween 80 138

Desenvolvimento de Formulação Vacinal Oral com Nanopartículas de PLGA 152

Efeito da exposição subcrônica ao Cloreto de níquel (ii) na morfometria do epidídimo.....167

Avaliação da atividade antimicrobiana da nanoestrutura de prata contra microrganismos envolvidos na mastite bovina 183

Vitanolídeos como inibidores de enzimas alvo para doença de Alzheimer: avaliação *in silico* de propriedades farmacológicas e relação estrutura-atividade 195

CAPÍTULO 4- RESUMOS EXPANDIDOS EM INGLÊS.....211

A histopathological assessment of gills in fish collected downstream from the Eustáquio and Santo Antônio Dams, in the Municipality of Paracatu, MG.....211

***Maclura Tinctoria (l.)* modulates the expression of morphological components, accelerating the closure of cutaneous wounds in balb/c mice 227**

Effect of cow's milk and soy drink (transgenic and non-transgenic) on the femur histomorphometry of BALB/c mice 267

CAPÍTULO 1- RESUMOS SIMPLES EM PORTUGUÊS

Efeito das folhas de goiabeira, *Psidium guajava*, na qualidade das variáveis de qualidade de água no cultivo de larvas de barbo titeia , *Puntius titteya*.

Daniele Gomes dos Santos[1], Alisson Luiz Martins Duarte[1], Jheneze Guimarães Pereira Rocha[1], Pedro Segantini Tótola[1], Jener Alexandre Sampaio Zuanon[1]

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

O *Puntius titteya*, conhecido como barbo titeia, é uma espécie ornamental muito apreciada pelos aquaristas devido à sua coloração vermelha vívida e comportamento pacífico em aquários comunitários. Entretanto, durante a fase larval, podem ocorrer perdas por mortalidade, resultantes da menor resistência ao manejo e das variações na qualidade da água. Para minimizar tais perdas, tem-se utilizado aditivos na água durante a larvicultura. Portanto, com o presente estudo objetivamos investigar os efeitos das

folhas de goiabeira, *Psidium guajava*, sobre o desempenho produtivo e qualidade da água no cultivo de larvas de *P. titteya*. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada aquário uma repetição. As concentrações de folhas de goiabeira testadas foram 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 g/L. As análises de qualidade de água foram realizadas em dois momentos: alimentação exclusiva com náuplios de artêmia e alimentação apenas com ração. Houve interação significativa entre as concentrações de folhas de goiabeira e tipo de alimentação das larvas. O pH da água ao final do período experimental foi menor do que ao final do período com fornecimento exclusivo de alimentos vivos (náuplios de artêmia), apenas no tratamento com 0,4 g/L de folhas de goiabeira. Durante o período de alimentação exclusiva com ração, os menores valores de amônia não ionizada foram observados nos tratamentos com 0,4 e 0,8 g/L de folhas de goiabeira. Ao final do experimento, os níveis de nitrito foram superiores aos registrados no período de

alimentação com náuplios de artêmia nos tratamentos com 0,4; 1,6 e 2,0 g/L. Não houve efeitos significativos das folhas de goiabeira sobre a taxa de sobrevivência e o peso médio final dos peixes. Quanto à contagem de microrganismos totais na água, os tratamentos com 0,4; 0,8; 1,2 e 1,6 g/L de folhas de goiabeira foram menores que o tratamento controle. A redução no teor de amônia não ionizada e o aumento de nitrito indicam que as folhas de goiabeira promoveram aumento da população de bactérias nitrificantes, microrganismos benéficos no ambiente de cultivo. Portanto, recomendamos o uso de 0,4 g/L de folhas de goiabeira na larvicultura de *P. titteya*, pois melhora a qualidade da água ao reduzir a amônia não ionizada e os microrganismos totais.

Palavras chave: Folha de goiabeira; larvas de peixe; peixe ornamental.

Agradecimentos: Agências de fomento- CNPq

Efeito do óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, em machos adultos de *Betta splendens*, embalados individualmente, durante o transporte

Daniele Gomes dos Santos[1], Jheneze Guimarães Pereira Rocha[1], Alisson Luiz Martins Duarte[1], Pedro Segantini Tótola[1], Jener Alexandre Sampaio Zuanon[1]

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Machos adultos de *Betta splendens*, em função do comportamento territorialista, precisam ser transportados individualmente, em pequenos sacos plásticos. Entretanto, a embalagem individual aumenta os custos em função da mão-de-obra e do número de embalagens utilizadas. Desta forma, a alternativa proposta pelos criadores seria o transporte desses peixes embalados coletivamente, com o uso de sedativo para redução da agressividade. Dentre os sedativos com potencial para serem utilizados para esse propósito, o óleo de cravo, *Syzygium aromaticum*, destaca-se em função de sua propriedade miorrelaxante, podendo

reduzir a atividade locomotora e o comportamento agonístico. Deste modo, foi necessário conduzir um experimento para verificar os efeitos do óleo de cravo em machos de betta durante o transporte individual, e posteriormente seguir com o estudo da viabilidade do transporte coletivo. Assim, objetivamos avaliar o transporte de machos adultos de *Betta splendens* embalados individualmente sob efeito do óleo de cravo. Os peixes foram transportados por 48h em diferentes concentrações de óleo de cravo: I0: 0 mg L^{-1}; I5: 5 mg L^{-1}; I10: 10 mg L^{-1} e I15: 15 mg L^{-1}. Foram avaliados a taxa de sobrevivência, os danos corporais, as repostas de estresse, o estado oxidativo das brânquias e a qualidade de água. Para avaliar o efeito do óleo de cravo, foi realizada análise de variância e regressão polinomial ao nível de 5 % de significância, utilizando o software R® 3.6.1 (pacote ExpDes.pt). Não houve efeito significativo do óleo de cravo na taxa de sobrevivência e nos danos corporais dos peixes, mostrando a segurança das concentrações utilizadas. Para as respostas

de estresse, o óleo de cravo mostrou efeito quadrático ($p<0,05$) no teor de cortisol, porém, não influenciou significativamente os teores de glicose e lactato sanguíneos. Para as variáveis de estado oxidativo, o óleo de cravo apresentou efeito ($p<0,05$) linear crescente para NO (óxido nítrico), efeito cúbico para PC (proteína carbonilada), e efeito quadrático para MDA (malondialdeído) e SOD (superóxido dismutase). Para a qualidade de água houve efeito quadrático do óleo de cravo sobre o pH da água. Machos adultos de *Betta splendens* podem ser transportados embalados individualmente, sob efeito de óleo de cravo, porém, são necessários novos estudos para avaliar outros sedativos que não causem danos oxidativos.

Palavras chave: Sedação; óleo essencial; peixe ornamental.

Agradecimentos Agências de fomento- CAPES.

Potencial de ativos extraídos das partes aéreas de *Stachys Byzantina* K. Koch como ingredientes de dermocosméticos

Victor Campana Leite[1], Jéssica Pereira Silva[1], Luciana Poty Manso dos Santos[1], Elita Scio Fontes[1], Nicolas Castro Campos Pinto[1]

Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil.[1]

O envelhecimento da pele é um fenômeno biológico que envolve a perda de tecido fibroso, redução na regeneração celular e diminuição da rede de vasos e glândulas, comprometendo a função de barreira promovida pela pele. Esse mecanismo está associado ao aumento da expressão da enzima hialuronidase, o que resulta na redução da disponibilidade de ácido hialurônico e, consequentemente, da hidratação e elasticidade da pele. Além disso, a exposição solar contribui significativamente para danos na pele e geração de radicais livres, o que leva ao fotoenvelhecimento. Este trabalho visa relatar o potencial

do extrato etanólico das partes aéreas de *Stachys byzantina* **(**EE) e de sua partição em diclorometano (PDCM) em inibir a hialuronidase e promover proteção solar. O extrato etanólico (EE) foi preparado por meio de extração com etanol em ultrassom a 50 ºC por 45 minutos. Após filtração e rota-evaporação, o EE foi particionado com diclorometano (PDCM), que também foi removido por evaporação rotatória. A metodologia de Tu e Tawata (2015) adaptada foi aplicada para determinar a inibição da hialuronidase: EE ou PDCM (20 μL) foi pré-incubada com hialuronidase bovina (1,50 U) em uma solução contendo tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio e albumina de soro bovino (BSA) por 10 min a 37°C. Depois adicionou-se ácido hialurônico de crista de galo e incubou-se por 45 minutos a 37°C. O Ácido hialurônico não digerido foi precipitado com solução de albumina ácida (1 mL) e a leitura da absorbância medida a 600 nm. As concentrações finais das amostras testadas foram de 500; 400; 300; 200 e 100 μg/mL. Um controle de 100% de atividade enzimática

e outro com 100% de precipitação do ácido hialurônico foram realizados. O Fator de Proteção Solar (FPS) e a razão UVA/UVB foram determinados seguindo a metodologia de Mansur et al. (1986) nas concentrações de (1000, 500 e 100 μg/mL) em espectrofotômetro, medindo as absorbâncias no intervalo de comprimentos de onda de 280 nm a 400 nm, com intervalos de 1 nm. PDCM apresentou IC_{50} para inibição da hialuronidase de 369 ± 11,642 μg/mL; enquanto o EE apresentou IC_{50} > 500 μg/mL. Já os valores de FPS obteve-se para o EE em: 1000 μg/ml - 37,88; 500 μg/ mL - 36,42 e 100 μg/mL - 9,25; e para PDCM: 1000 μg/mL - 38,01; 500 μg/ mL - 36,70 e 100 μg/mL - 9,92. A razão UVA/ UVB foi calculada segundo a metodologia de Springsteen (1999) com adaptações para a amostra mais promissora (PDCM). Os valores obtidos foram 1,09 para 1000 μg/mL, 0,64 para 500 μg/mL e 0,01 para 100 μg/mL. Com base nesses resultados, a proteção UVA foi classificada como "Ultra", "Superior" e "Muito Baixa", respectivamente, conforme o Sistema *Boot's Star Rating*. Pode-se concluir que,

principalmente, o PDCM apresentou potencial para investigações mais aprofundadas quanto à sua utilização em formulações dermocosméticas destinadas a reduzir o envelhecimento cutâneo e o fotoenvelhecimento.

Palavras chave: Envelhecimento; Hialuronidase; *Stachys byzantina*

Agradecimentos: Este trabalho contou com o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ 00067-21) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), bem como do Programa BIC (UFJF). Contou ainda com a assistência técnica de Delfino Antônio Campos e Éder Tostes.

Determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico das partes aéreas de *Stachys Byzantina K. K e* de suas partições pelos métodos do DPPH e do betacaroteno.

Victor Campana Leite[1], Jéssica Pereira Silva[1], José Alisson da Silva Lima[1], Nicolas Castro Campos Pinto[1]

[1]Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil.

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre radicais livres danosos e a capacidade do corpo de neutralizá-los, contribuindo para a progressão e desenvolvimento de várias doenças. A vasta biodiversidade brasileira abriga muitas Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) ricas em compostos antioxidantes, como polifenóis, carotenóides e vitaminas, os quais possuem potencial de proteger as células contra os danos oxidativos. Esse trabalho se propõe a investigar o potencial antioxidante do extrato etanólico (EE) e partições das partes aéreas de *S. byzantina*, uma planta distribuída na Mata Atlântica. O

material vegetal seco foi submetido à extração com etanol com auxílio de ultrassom a 50 ºC por 45 minutos, seguida da evaporação do solvente, para a obtenção do EE. O EE foi particionado com hexano, seguido de diclorometano, para a obtenção das partições hexânica (PHEX) e em diclorometano (PDCM), respectivamente. Os testes foram realizados após a completa remoção dos solventes. A atividade antioxidante foi avaliada usando o método DPPH descrita por Pires (2017) com adaptações. As concentrações das amostras variaram de 0,049mg/ml a 0,250mg/mL. A absorbância foi medida a 517 nm após incubação de 30 minutos à luz. A atividade antioxidante do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada segundo Marco (1968) com modificações. As amostras foram testadas em concentrações finais de 38,46; 19,23; 9,61; 4,8; 2,4 e 1,2 μg/mL em triplicata. Uma solução emulsificante foi preparada com água saturada de oxigênio, β-caroteno, ácido linoleico, Tween 40® e diclorometano. O diclorometano foi evaporado com gás nitrogênio, e em seguida adicionou-se água. Foram pipetados 10 μL das

amostras na placa contendo 250 μL da solução. O mesmo procedimento foi feito substituindo as amostras por metanol como controle, e a absorbância foi aferida a 470 nm por 120 minutos a 45ºC. Quercetina foi utilizada como substância de referência em ambas as metodologias. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.". Os valores de IC50 no teste do DPPH foram: 4,58 ± 0,29 (EE); 113,13 ± 10,44 (PHEX); 3,33 ± 0,13 (PDCM); 0,57 ± 0,07 (quercetina). No teste do betacaroteno observou-se os seguintes resultados para o IC_{50}: 25,643 ± 2,12 (EE); 10,13 ± 3,81; 5,58 (PHEX) ± 10,49 (PDCM); 3,38 ± 0,70 (quercetina). Em ambos os métodos a quercetina apresentou a maior atividade antioxidante, seguida da PDCM; no entanto é preciso considerar que o EE e suas partições são matrizes complexas e a quercetina é uma substância pura. Pode-se concluir que o EE e suas partições apresentaram potencial antioxidante *in vitro*, o que abre perspectivas para novas investigações quanto ao seu potencial na terapia de doenças envolvendo o estresse

oxidativo.

Palavras chave: Antioxidantes, Estresse oxidativo, *Stachys byzantina*

Agradecimentos: Este trabalho contou com o apoio e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ 00067-21) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), bem como do Programa BIC (UFJF). Contou ainda com a assistência técnica de Delfino Antônio Campos e Éder Tostes.

Treinamento físico resistido aumenta a expressão de marcadores de macrófago M2 no ventrículo direito de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por Monocrotalina

Thiago Souza e Silva[1], Felipe Couto Santos[2], Michele Dias de Oliveira Teixeira[2], Sara Caco dos Lucio Generoso[1], Leandro Licursi de Oliveira[2], Antônio José Natali[1]

[1]Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2] Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[3]Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

O desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) envolve um processo inflamatório do ventrículo direito (VD) com participação de células do sistema imune, enquanto o exercício físico aeróbico tem efeitos anti-inflamatórios. Entretanto, os efeitos do exercício físico resistido não são bem conhecidos. Este estudo investigou os efeitos do treinamento físico resistido (TR) sobre a

expressão de interleucina 10 (IL-10), *cluster domain* 206 (CD 206) e arginase 1 (Arg-1) no VD de ratos durante o desenvolvimento da HAP induzida por monocrotalina (MCT). Para tal, ratos Wistar com 45 dias de idade foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, a saber: Hipertenso sedentário (GHS, n=4) e Hipertenso treinado (GHT, n=4). A HAP foi induzida por uma injeção intraperitoneal de monocrotalina (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em solução salina. Doses equivalentes de solução salina foram injetadas nos animais controles. O TR foi realizado pelos animais do grupo GHT, consistindo em uma sessão diária de 15 subidas em escada vertical, com intervalos de 1 minuto, cinco dias por semana (de segunda a sexta-feira). A sobrecarga utilizada foi de 60% da carga máxima carregada, durante aproximadamente 4 semanas. Os animais do grupo GHS permaneceram em suas respectivas caixas. Após eutanásia, fragmentos do VD foram coletados e armazenados a -80° C para análise subsequente da expressão de RNAm (Ácido Ribonucleico mensageiro) de IL-10, CD 206 e Arg-1 por RT-PCR

(Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase). Os dados foram comparados usando-se o teste t de Student não pareado, ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados mostram que o TR aumentou a expressão de RNAm da IL-10 (GHS: 0,14 ± 0,11 UA vs. GHT: 6,86 ± 2,25 UA), CD 206 (GHS: 0,17 ± 0,21 UA vs. GHT: 33,86 ± 9,59 UA) e Arg-1 (GHS: 0,03 ± 0,02 UA vs. GHT: 8,46 ± 3,06 UA). Conclui-se que o TR realizado durante o desenvolvimento da HAP induzida por MCT aumenta a expressão de RNAm de marcadores de macrófago M2 no VD de ratos.

Palavras-chave: IL-10; Arg-1; CD 206

Agradecimentos: Agências de fomento- CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Cromatografia iônica: uma perspectiva verde na análise de alimentos

Jhonatan Faria da Costa[1], José Roberto Miranda Júnior[1], Muhammad Alhaji Adamu[1], Camila Rodrigues Carneiro[1], Jane Selia dos Reis Coimbra[1]

[1]Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

A incorporação dos princípios da química verde aos procedimentos analíticos visa auxiliar no desenvolvimento de métodos de análise sustentáveis cujos resultados sejam confiáveis e os tempos de análise sejam curtos. A implementação de práticas laboratoriais mais sustentáveis poderá contribuir também para a mitigação dos efeitos no meio ambiente e para a redução de custos pelo uso de menor quantidade de insumos. Entre as tendências analíticas que contribuem com o baixo impacto ambiental destacam-se: (i) a diminuição gradual do uso de solventes orgânicos e outros reagentes tóxicos na metodologia analítica, (ii) a miniaturização e automatização de métodos,

(iii) o controle mais eficiente do consumo de energia e (iv) a redução de resíduos e o reaproveitamento de solventes e materiais. A cromatografia iônica (CI) é uma técnica que se alinha aos princípios sustentáveis e fornece informações precisas sobre a composição iônica e a qualidade de alimentos, em termos do conteúdo de íons inorgânicos, como íons metálicos, ânions, cátions e outros elementos ionizáveis. A boa seletividade da CI, associada ao devido tratamento das amostras, permite a análise precisa de íons em matrizes alimentícias específicas, como leite e derivados lácteos. Os cromatógrafos de íons são fabricados com polímeros com considerável resistência química, como o PEEK (poliéter-éter-cetona) e/ou PTFE (politetrafluoretileno), que são também constituintes de tubos, conexões e gaxetas. De um ponto de vista metodológico, a CI utiliza predominantemente solventes à base de água (soluções ácidas e básicas), que são ecologicamente adequados e acessíveis. Assim, a técnica permite reduzir a quantidade de solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos e voláteis, e consequentemente,

diminuir o impacto ambiental decorrente do uso desses solventes. As cromatografias em fases líquida e gasosa requerem grandes volumes de solventes orgânicos, de maior custo e prejudiciais ao meio ambiente. A CI é um método cromatográfico de grande utilidade na análise de íons em alimentos devido à sua versatilidade, ao seu baixo potencial de impacto ambiental, baixa produção de resíduos e à possibilidade de levar à redução do consumo de solventes ao mesmo tempo em que preserva a eficácia da separação do componente da matriz alimentícia.

Palavras chave: Cromatografia iônica; química verde; alimentos.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Junção neuromuscular de camundongos adultos: modelo experimental de distrofia muscular de Duchenne

Matheus Bertanha Fior[1], Gabriel Ferreira Zanardo[1], Jurandyr Pimentel Neto[1], Natália Fermino Calzado[1], André Neri Tomiate[1], Adriano Polican Ciena[1]

[1]Laboratório de Morfologia e Atividade Física – LAMAF, Instituto de Biociências – IB, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro – SP, Brasil

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é descrita como uma patologia hereditária e progressiva que acomete em maior número a população masculina, devido ao carater recessivo ligado ao cromossomo sexual X. A fisiopatologia da DMD resulta da disfunção do gene responsável pela produção da distrofina, o que compromete a síntese da proteína nas fibras musculares. Como consequência, ocorre uma perda progressiva da massa muscular, levando a um comprometimento gradual da locomoção. A junção neuromuscular (JNM) compreende o complexo que une o sistema nervoso periférico e o sistema muscular e fazem

parte do aparelho locomotor. Nesta região os prolongamentos dos axônios se ligam às fibras musculares se apresentando como uma região de alta plasticidade e importância para o recebimento das sinapses neuronais. A JNM é composta pelas seguintes estruturas: região pré sináptica que engloba os terminais axônicos, a fenda sináptica onde são secretados os neurotransmissores de acetilcolina e a região pós sináptica composta pelos receptores de acetilcolina. Diante dos acometimentos provocados pela distrofia ao tecido muscular e ao aparelho locomotor geral, a análise morfológica da JNM permitirá evidenciar os comprometimentos na região pós sináptica, a degradação dos receptores de acetilcolina e o acometimento a via de sinalização entre sistema nervoso periférico e músculo estriado esquelético. O objetivo do presente estudo consistiu em analisar a morfologia da JNM frente aos acometimentos da DMD em modelo experimental. Foram utilizados 12 camundongos adultos (C57bl^{10} - 6 meses), divididos em 2 grupos Controle e *mdx* (Comitê de Ética Uso de Animais - UNESP Rio Claro - SP - nº: 07/2023).

Para as análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão, os animais de cada grupo foram eutanasiados com uma solução de ketamina (200 mg/kg) e xilazina (50 mg/kg) administrada via intraperitoneal. Em seguida, o músculo gastrocnêmio direito foi dissecado, fixado em solução de Karnovsky modificada e, posteriormente, pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio. As amostras foram então desidratadas em uma série crescente de álcoois, embebidas em resina e cortadas em seções ultrafinas. Essas seções foram corados com solução de acetato de uranila e citrato de chumbo aquoso, e as lâminas resultantes foram analisadas. Para a realização da microscopia de imunofluorescência as amostras do músculo gastrocnêmio foram criofixadas e seccionadas longitudinalmente (20 μm) para posterior incubação do anticorpo para imunomarcação da JNM (α-bungarotoxina). A junção neuromuscular (JNM) do grupo Controle exibiu a conformação padrão dos receptores de acetilcolina na região pós-sináptica, com uma definição ampla de sua área. Em contraste, o grupo mdx apresentou uma ampla variação

na forma dos receptores, caracterizada pela redução da conformação padrão, fragmentação estrutural e diminuição das áreas dos receptores. Concluímos que a DMD provoca um desarranjo dos receptores pós-sinápticos com a sua fragmentação e redução drástica afetando diretamente os padrões de sinalização da via entre sistema nervoso periférico e sistema muscular.

Palavras-chave: junção neuromuscular; distrofia muscular de Duchenne, a-bungarotoxina; morfologia.

Avaliação “in vitro” da eficiência do filme Antimicrobiano Incorporado com Nisina

Daniela Leocádio Silva[1], Arthur Kelton Machado Peixoto[2], Nilda de Fátima Ferreira Soares[1]

[1]Laboratório de Embalagens de Alimentos, Departamento Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

[2]Laboratório de Imunovirologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa.

A embalagem antimicrobiana é um tipo de embalagem ativa em que compostos antimicrobianos são incorporados e imobilizados no material da embalagem com o objetivo de reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos no alimento. Neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana de filmes biodegradáveis a base de pectina com o antimicrobiano Nisina Z e com nanocelulose (celulose nanofibrilada) no biocontrole de microrganismos patogênicos. Os filmes de pectina (Pec) foram produzidos pelo método “casting” e adicionado celulose nanofibrilada

(0 e 10 g/100 g de Pec) e Nisina Z (0 e 10 g/100 g de Pec) em cada filme. Para avaliar a atividade antimicrobiana do filme ativo foi aplicado o método de difusão em ágar, colocando-se discos (Ø = 1 cm) do filme ativo incorporados com as Nisina Z e celulose nanofibrilada sobre a superfície do Plate Count Agar-PCA contendo suspensão de microrganismos na concentração (10^5 células). A atividade antimicrobiana do filme ativo foi avaliada para culturas puras de *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). No teste de difusão em ágar, todos os tratamentos testados apresentaram diferenças significativas na inibição de *S. aureus* (ATCC 6538), com valores de $p < 0,05$. Neste estudo, observou-se que quanto maior a concentração de Nisina Z, maior é a zona de inibição contra *S. aureus*. "Para o microrganismo *E. coli*, os tratamentos 11 (0% NCF e 5% NIS) e 9 (5% NCF e 10% NIS) apresentaram as maiores zonas de inibição, com diâmetros de 1,8 ± 0,2 cm e 1,5 ± 0,2 cm, respectivamente. Os tratamentos 10 (5% NCF e 5% NIS), 7 (5% NCF e 5% NIS) e 3 (5% NCF e 10% NIS) não apresentaram halos de inibição para Escherichia coli. A

ação da Nisina Z foi menos eficaz contra o microrganismo gram-negativo *E. coli* em comparação com os microrganismos gram-positivos, como *S. aureus*. Os resultados obtidos indicam que o filme antimicrobiano incorporado com Nisina Z tem potencial para aplicação como embalagem ativa antimicrobiana para o acondicionamento de alimentos contaminados com as bactérias estudadas, contribuindo para a extensão da vida útil dos produtos e assegurando a segurança alimentar.

Palavras–Chave: Filme, antimicrobiano, nisina z.

Treinamento físico resistido aumenta a expressão de mirna-1 e -214 no ventrículo direito de ratos sem prejudicar a função cardíaca

Sara Caco dos Lúcio Generoso [1], Leôncio Lopes Soares[1], Luciano Bernardes Leite[1], Bruno Rocha de Avila Pelozin[2], Emily Correna Carlo Reis[3], Antônio José Natali[1]

[1]Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

[3]Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Adaptações estruturais e funcionais colaterais podem ser observadas em corações de atletas que estão sob altas cargas e volumes de treinamento físico. Estudos documentaram reduções na função do ventrículo direito (VD) durante exercícios aeróbicos intensos, causadas pela dilatação, disfunção elétrica e remodelamento adverso. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes que participam na modulação da expressão

gênica em nível pós-transcricional. Eles são capazes de inibir a tradução ou levar à degradação do RNA, portanto, podem mediar processos patológicos e fisiológicos. Por exemplo, o aumento na expressão de miRNA-1 e -214 desempenha um papel importante na patogênese de doenças cardíacas e são alvos de estudos sobre processos patológicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o treinamento físico resistido (TR) altera a função cardíaca e a expressão gênica dos miRNA's -1 e -214 no VD de ratos. Para tal, ratos Wistar ~ 200g foram divididos em grupo controle (C, n = 8) e grupo treinado (T, n = 8). Após adaptação ao protocolo de TR, os ratos do grupo T foram submetidos a um programa de TR (subida de escada; intensidade de 60% da carga máxima carregada), 5 vezes/semana durante quatro semanas. Foram realizados dois testes de carga máxima carregada pelos animais, antes do início e após o programa de TR, quando também foi realizado o exame ecocardiográfico. Em seguida, após eutanásia, o coração foi removido e processado para análises da expressão de miRNA’s (RT-PCR). A

normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e as diferenças entre os grupos testadas pelo teste t de Student não pareado. Os dados são apresentados como média ± DP e o nível de significância adotado foi $P < 0,05$. Os resultados mostraram que o programa de TR aumentou a carga máxima carregada pelos animais (T = 627,7 ± 29,09 g > C = 321,4 ± 21,38 g, $p < 0,0001$). No VD, o TR aumenta a expressão de miRNA-1 (T = 223,3 ± 65,57 [% do grupo C] > C = 100,0 ± 46,53, p = 0,0038) e -214 (T = 400,0 ± 96,39 [% do grupo C] > C = 100,0 ± 77,97, p = 0,0159). Não houve prejuízo, mas houve melhora da função do VD avaliada pela excursão sistólica do plano do anel tricúspide (T = 2,358 ± 0,15 mm > C = 2,063 ± 0,17 mm, p = 0,0033) e função do ventrículo esquerdo (VE) determinada pela fração de ejeção (T = 83,57 ± 4,03 % > C = 70,00 ± 7,11 %, p = 0,0009) e fração de encurtamento (T = 47,29 ± 4,34 % > C = 34,86 ± 4,94 %, p = 0,0003). Concluiu-se que, embora o TR de intensidade moderada aumente a expressão de miRNA1 e 214, ele não compromete a função cardíaca em ratos.

Palavras-chave: Treinamento resistido; fração de ejeção; microRNA

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Perfil nutricional de crianças e adolescentes do ensino fundamental em escola municipal atendida pelo PNAE na cidade de Viçosa-MG

Marina Amaral Cruz[1], Mariana de Fátima Albuquerque Pereira [2], Marcella da Silveira Santos [2], Fernanda Cristina da Silva Amaral[2], Tatiane Cristina Serafim[1], Raquel Maria Amaral Araújo[1]

[1]Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Prefeitura Municipal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) foi criado em 1979, mas somente com a Constituição Federal de 1988 que o direito à alimentação escolar para todos os alunos do ensino fundamental passou a ser assegurado. Atualmente, o PNAE é uma importante estratégia de Segurança Alimentar e Nutricional e promove o Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA). O programa se baseia na oferta de refeições para os estudantes, fornecendo a porcentagem mínima de 20% das suas necessidades, contribuindo para o desenvolvimento e

aprendizagem. Dessa forma, o acompanhamento do seu crescimento e desenvolvimento torna-se necessário para definição de intervenções oportunas. As diretrizes do PNAE incentivam a alimentação saudável e adequada, apoio ao desenvolvimento sustentável, a educação alimentar e nutricional, além de possuir uma legislação que aponta a utilização de alimentos que valorizem a cultura e hábitos alimentares locais, com base na sustentabilidade e potencial agrícola da região. O objetivo deste trabalho foi realizar o diagnóstico nutricional de crianças e adolescentes do ensino fundamental de uma escola municipal atendida pelo PNAE no munícipio de Viçosa, Minas Gerais. Com a autorização dos pais, foram realizadas pesagens dos participantes utilizando uma balança digital e aferição da estatura com um estadiômetro. Para análise do estado nutricional, foram utilizados os softwares WhoAntro e WhoAntro Plus, adotando os indicadores IMC/idade, peso/idade e estatura/idade. A classificação adotada incluiu: magreza acentuada, magreza, eutrofia, risco de sobrepeso, sobrepeso, obesidade ou obesidade grave. A

amostra foi distribuída por faixa etária da seguinte forma: grupo 1, composto por 37 estudantes de 0 a 5 anos; grupo 2, composto por 118 estudantes de 5 a 10 anos e grupo 3, composto por 150 estudantes de 10 a 15 anos. Participaram do estudo 305 alunos, o que corresponde a 68,2% do total de matriculados, sendo a maioria do sexo masculino (52,1%). No grupo 1, as seguintes classificações foram observadas: magreza (2,7%), eutrofia (78,4%), risco de sobrepeso (16,2%) e sobrepeso (2,7%). No grupo 2, foram registradas as seguintes classificações: magreza (1,7%), eutrofia (64,4%), sobrepeso (14,4%), obesidade (11%) e obesidade grave (8,5%). No grupo 3, composto por 150 estudantes, as seguintes classificações foram observadas: magreza (5,3%), eutrofia (66,7%), sobrepeso (16%), obesidade (10%) e obesidade grave (2%). Conclui-se que, embora a maioria dos estudantes apresente eutrofia, a ocorrência de excesso de peso, especialmente obesidade grave, alerta para a importância do monitoramento do estado nutricional nas escolas. Esse monitoramento é crucial para a implementação de intervenções oportunas,

visando a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis a longo prazo.

Palavras Chave: Estado nutricional; PNAE; Crianças e adolescentes.

Efeitos do treinamento resistido associado ao tratamento com extrato de mirtilo sobre a concentração sanguínea de lactato em ratos com Hipertensão Arterial Pulmonar experimental

Arthur Eduardo de Carvalho Quintão[1]; Leôncio Lopes Soares[1], Luciano Bernardes Leite[1], Sebastião Felipe Ferreira Costa[1], Patrick Turck[2]; Antônio José Natali[1].

[1]Departamento de Educação Física, Laboratório de Biologia do Exercício, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

O desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) envolve um processo inflamatório conjugado com estresse oxidativo que resulta em comprometimento cardiovascular e redução da disponibilidade de oxigênio. O objetivo desse estudo foi testar se a HAP, o treinamento resistido (TR) ou tratamento com extrato de mirtilo altera a concentração sanguínea de lactato de ratos em repouso. Para tal, ratos Wistar foram divididos em cinco grupos de 10 animais cada: sedentário controle (SC), sedentário

hipertenso (HS), Sedentário hipertenso + mirtilo (SHM), exercitados hipertensos (EH) e exercitados hipertensos + mirtilo (EHM). Os animais hipertensos receberam uma injeção intraperitoneal de monocrotalina (MCT) (60 mg/kg), enquanto os animais controles receberam o mesmo volume de solução salina. Animais dos grupos SHM e EHM receberam diariamente extrato de mirtilo (100 mg/kg/dia), por gavagem, durante o experimento. Os ratos exercitados foram submetidos a um programa de TR (subida de escada; 60% da carga máxima carregada), 5 vezes/semana, durante quatro semanas. Foram realizados dois testes de carga máxima carregada, um antes do início e outro após a conclusão do programa de treinamento resistido (TR), durante os quais foi avaliada a concentração sanguínea de lactato em repouso. As diferenças entre grupos foram testadas utilizando-se a ANOVA *one-way*, seguida do *post hoc* de Tukey, ao nível de significância de 5%. Os dados são média ± desvio padrão. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos para a carga máxima carregada antes do programa de exercício físico [SC =

218,90 ± 13,95 g; SH = 206,80 ± 6,45 g; SHM = 210,20 ± 17,08 g; EH = 205,50 ± 9,63 g e EHM = 212,60 ± 21,70 g]. Contudo, no 21º dia após os tratamentos, os ratos exercitados carregaram maiores cargas [EH = 541,10 ± 138,60 g e EHM = 469,40 ± 94,60 g], em comparação aos animais sedentários [SC = 329,60 ± 28,59 g; SH = 262,80 ± 54,60 g; e SHM = 310,10 ± 65,20 g]. Para as concentrações sanguíneas de lactato em repouso, antes dos tratamentos, não foram observadas diferenças entres os grupos experimentais [SC = 2,13 ± 0,33 mmol/L; SH = 2,10 ± 0,33 mmol/L; SHM = 2,11 ± 0,36 mmol/L; EH = 2,14 ± 0,43 mmol/L; e EHM = 2,10 ± 0,44 mmol/L]. Entretanto, no 21º dia de tratamento, as concentrações sanguíneas de lactato em repouso dos grupos EHM [2,86 ± 0,62 mmol/L], SC [2,26 ± 0,25mmol/L] e EH [2,97 ± 0,55 mmol/L] foram menores que as dos grupos SH [4,02 ± 0,59 mmol/L] e SHM [4,02 ± 0,51 mmol/L]. Ademais, animais que se exercitaram e/ou foram tratados com mirtilo, apresentaram menores concentrações, em comparação aos do grupo SH. Concluiu-se que a HAP induzida por MCT aumenta a concentração sanguínea de

lactato de ratos em repouso, enquanto o TR e/ou o tratamento com extrato de mirtilo podem amenizar tal elevação. Sugere-se que a associação desses tratamentos pode melhorar a tolerância ao esforço físico e a resposta metabólica em indivíduos com HAP.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, Esforço máximo, Monocrotalina.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

O treinamento físico combinado previne o remodelamento patológico do ventrículo esquerdo de ratos com Hipertensão Arterial Pulmonar

Mirielly Alexia Miranda Xavier[1], Luciano Bernardes Leite[2], Leôncio Lopes Soares[2], Luiz Otávio Guimarães Ervilha[1], Emily Correna Carlo Reis[3], Antônio José Natali[2]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa,

[2] Departamento de Educação Física, Laboratório de Biologia do Exercício, Universidade Federal de Viçosa,

[3]Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

Nos últimos anos, o treinamento físico combinado (TFC), que integra sessões de treinamento físico aeróbico e resistido de baixa a moderada intensidade, tem sido recomendado como uma ferramenta eficaz no controle de fatores de risco para doenças cardiovasculares. No entanto, os efeitos do TFC em pacientes com hipertensão arterial pulmonar (HAP) são pouco conhecidos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do TFC sobre a

morfologia do ventrículo esquerdo (VE) de ratos com HAP. Para tal, ratos Wistar (200g) foram divididos em 3 grupos de 7 animais: Sedentário controle (SC); Sedentário hipertenso (SH) e Exercício hipertenso (EH). Os animais dos grupos SH e EH receberam uma injeção intraperitoneal de monocrotalina (MCT) (60 mg/kg) para desenvolvimento da HAP, enquanto os animais do grupo SC receberam o mesmo volume de solução salina. Os animais do grupo EH foram submetidos a um programa de TFC realizado em esteira rolante (treinamento aeróbico) e em escada vertical, em dias alternados (segunda a sexta-feira), por 3 semanas. Os animais dos grupos SC e SH permaneceram em suas respectivas caixas. A eutanásia dos animais foi realizada no 23º dia após injeção de MCT. Após a eutanásia, o VE foi removido e processado para as análises de interesse. Os dados foram analisados usando-se a ANOVA *one-way*, seguida de post hoc de Tukey. Os resultados mostraram que os animais com HAP tiveram redução no percentual de cardiomiócitos, aumento no percentual de matriz extracelular e de colágeno total. Essas alterações indicam

remodelamento adverso do VE. Todavia, o TFC foi capaz de prevenir esse remodelamento adverso do VE (ex. aumento no percentual de cardiomiócitos, redução no percentual de matriz extracelular e de colágeno total). Em conclusão, o TFC aplicado previne o remodelamento adverso do VE de ratos com HAP induzida por MCT.

Palavras-chave: Treinamento Resistido, Colágeno total, Monocrotalina.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Repercussão do salto vertical na junção neuromuscular e ventre muscular em modelo experimental

Isabella Gomes[1], Natália Fermino Calzado[1], Mariana Baptista[1], Paula Camargo de Oliveira[1], Adriano Polican Ciena[1], Lara Caetano Rocha-Braga[1]

[1]Instituto de Biociências, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, São Paulo, Brasil.

O tecido muscular esquelético possui ampla plasticidade, possui estimulação sináptica através da Junção Neuromuscular (JNM). A JNM é responsável pela ativação do potencial de ação e consequente contração muscular. O salto vertical (SV) é uma capacidade funcional realizada em diversos esportes, que exige força e resistência muscular, além de adaptações sistêmicas quando executado de forma periodizada. O objetivo do presente estudo consiste em descrever as características histoquímicas e morfológicas da região do ventre e JNM do músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* submetidos ao protocolo de SV. Foram utilizados ratos *Wistar* adultos (n=20), divididos nos

grupos: Sedentário (S) e Salto Vertical (SV). Os animais do grupo SV foram submetidos ao protocolo experimental de Salto em meio aquático com sobrecarga de 50%, realizando três sessões semanais durante um período de quatro semanas. Para as análises foram utilizadas técnicas de histoquímica de ATPase miofibrilar e imunofluorescência da fenda pós-sináptica (α-Bungarotoxina, 1:1000). O estudo apresentou descobertas significativas sobre os efeitos do treinamento de SV. Notavelmente, as fibras musculares do tipo IImantiveram seu tamanho, enquanto as fibras do tipo I mostraram uma menor densidade nervosa. Isso sugere uma adaptação específica relacionada ao SV. Além disso, o Salto vertical destacou a relevância no contexto da fadiga neuromuscular aguda e crônica após o exercício, especialmente em atividades de resistência. Outro ponto importante foi o impacto do SV na morfologia da JNM, com uma redução no tamanho dos receptores de acetilcolina (AChR) na JNM. Essa alteração pode influenciar a comunicação entre os nervos e os músculos. Por fim, o estudo ressaltou que a fadiga induzida pelo exercício de

alta intensidade pode remodelar a estrutura da JNM, o que é relevante para entender como o corpo responde à fadiga muscular.

Palavras Chave: Músculo estriado esquelético; fenda pós-sináptica; exercício.

Agradecimento: Agência de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/ n° 2020/07418-4)

Implementação de QR codes para otimização de processos e acesso em laboratório de pesquisa

Alícia Beatriz Moreira de Queiroz[1], Analice Martins Duarte[1], Elizabeth Bárbara Epalanga Pires[1], Monique Renon Eller [1].

[1]Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Nos laboratórios de pesquisa das Instituições Públicas de Ensino, a participação numerosa de estudantes, tanto da graduação quanto da pós-graduação, em projetos financiados por agências de fomento e empresas privadas, frequentemente acarreta desafios de gestão interna. Esses desafios estão relacionados à administração dos equipamentos, documentos, materiais e reagentes, o que pode resultar na inacessibilidade desses recursos essenciais para a condução dos experimentos. A falta de uma gestão adequada pode resultar em práticas não conformes, comprometendo a qualidade dos resultados e a segurança da equipe de pesquisa. Essa situação impacta adversamente o progresso das pesquisas realizadas nesses

laboratórios. Portanto, importância é fundamental implementar ferramentas de qualidade que garantam a disponibilidade e eficiência no uso dos equipamentos, documentos, materiais e reagentes. Isso não apenas resguarda a segurança dos usuários, mas também promove a manutenção adequada dos equipamentos e assegura a possibilidade de replicação dos experimentos de forma confiável. O objetivo deste trabalho trata-se da utilização de QR Codes para acesso a processos de Gestão de Qualidade e Boas Práticas de Laboratório (BPL), realizados por meio do ciclo PDCA, visando a gestão eficaz e aprimorada do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos – LAPROBQI, vinculado à Universidade Federal de Viçosa e coordenado pela Profª. Monique Renon Eller. A abordagem de controle de qualidade em laboratórios abarca a aplicação de procedimentos padronizados, monitoramento contínuo e, quando necessário, a implementação de correções. As Boas Práticas de Laboratório englobam uma série de aspectos, tais como infraestrutura, documentação, qualificação e capacitação do pessoal, gestão documental,

rastreabilidade e armazenamento adequado. O ciclo PDCA, por sua vez, adota uma abordagem sistemática para a melhoria de processos, compreendendo as etapas de planejamento, execução, verificação e ação corretiva, com o propósito de alcançar níveis desejados de eficiência e qualidade. A metodologia incluiu a revisão de literatura, a criação de QR Codes, a análise de regulamentos, aplicação do ciclo PDCA para supervisionar as operações do laboratório e formulário de feedback antes e após as implementações. A utilização de QR Code possibilitou um acesso simplificado e rápido a manuais, registros de manutenção, interfaces de agendamento e aos próprios Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) de cada equipamento. Além disso, por meio do QR Code implementou-se um sistema de controle de acesso ao laboratório. Foram obtidos resultados positivos por meio de um formulário de feedback abordando vários aspectos, como organização, utilização de equipamentos, gestão de documentos e acesso ao laboratório. Em específico, observou-se uma melhoria significativa na qualidade das

relações no laboratório. Inicialmente, a avaliação das relações estava em 33,93%, mas após a implementação das melhorias, essa avaliação elevou-se para 57,14%, representando um aumento de 23,21%. Com isso, as relações no laboratório agora são classificadas como "muito boas". Recomenda-se adoção de QR Codes e a integração de tecnologias para aprimorar os processos internos do laboratório, juntamente com a constante atualização das práticas implementadas.

Palavras chave: Laboratório; QR Code; Otimização.

Agradecimento: A todos os colaboradores do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos – LAPROBQI da Universidade Federal de Viçosa.

Adaptações musculares do treinamento resistido agudo após modelo experimental de atrofia

Bruna Aléxia Cristofoletti Grillo[1], André Neri Tomiate[1], Gabriel Ferreira Zanardo[1], Lara Caetano Rocha-Braga[1], Adriano Polican Ciena[1]

[1]Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF), Instituto de Biociências, UNESP Rio Claro, Brasil.

A atrofia muscular é caracterizada pela proteólise exacerbada de proteínas musculares, redução da mobilidade e força, a qual advém de distúrbios hereditários ou fisiopatológicos e acarreta vulnerabilidade estrutural e funcional de músculos estriados esqueléticos. Apesar da gravidade, a intervenção do treinamento resistido é eficaz em reverter seus efeitos a longo prazo, no entanto, elucidar as adaptações primárias, sua cronologia e correlações, é indispensável para compreender a complexidade estrutural musculoesquelética. Diante disso, o objetivo do estudo consistiu em investigar as repercussões do período agudo de treinamento resistido no músculo gastrocnêmio

em modelo experimental após atrofia muscular. Foram utilizados 35 ratos *Wistar* organizados em 7 Grupos: Controle (C), não submetidos a nenhum protocolo; Imobilizado (I), submetidos ao protocolo de atrofia muscular por 10 dias; Imobilizado 24 horas (I_{24h}), 24 horas com livre movimentação após o fim do protocolo de atrofia muscular; Treinado (T), submetidos a 1 sessão de treinamento resistido; Treinado 24 horas (T_{24h}), 24 horas após a sessão de treinamento; Imobilizado Treinado (IT), submetidos ao protocolo de atrofia muscular por 10 dias e 1 sessão de treinamento resistido: Imobilizado Treinado 24 horas (IT_{24h}); 24 horas após a sessão de treinamento. As amostras foram processadas para análises morfoqualitativas e quantitativas através da microscopia de luz (Hematoxilina e Eosina, e Picro-Sírius Red) para identificação dos núcleos e tecido conjuntivo; e ATPase Miofibrilar, para identificação dos fenótipos das fibras musculares. A análise morfométrica revelou no Grupo I, comparado ao Grupo C, maior valor de Dimensão Fractal (DF) no tecido conjuntivo ($p<0,001$), e menor área de secção

transversa (AST) das fibras tipo I e II ($p<0,0001$). O Grupo I_{24h}, apresentou menor AST das fibras tipo I e II ($p<0,0001$) em comparação ao Grupo I. O Grupo T, demonstrou menor AST das fibras tipo I ($p<0,0001$) e maior AST das tipo II ($p<0,0001$) em relação ao Grupo C. O Grupo T_{24h}, em comparação ao Grupo T, apresentou maior valor de DF no tecido conjuntivo ($p<0,0001$), maior AST das fibras tipo I ($p<0,0001$) e menor AST nas tipo II ($p<0,0001$). O Grupo IT demonstrou maior valor de DF nos núcleos e tecido conjuntivo ($p<0,0001$) em comparação ao Grupo C, e menor AST nas tipo I e II ($p<0,0001$) em comparação aos Grupos C, I e T. O Grupo IT_{24h}, apresentou menor valor de DF nos núcleos em relação ao Grupo IT ($p<0,0001$), e tecido conjuntivo em comparação aos Grupos IT ($p<0,01$), I_{24}($p<0,0001$) e T_{24h}($p<0,05$), além de menor AST nas fibras tipo I ($p<0,0001$) em comparação ao Grupo T_{24h}, e tipo II ($p<0,0001$) em relação os Grupos IT e I_{24h}, e maior AST das II ($p<0,0001$) em comparação ao Grupo T_{24h}. Concluímos que o músculo gastrocnêmio demonstra notável plasticidade em suas estruturas no período agudo de

treinamento após atrofia muscular, com destaque na AST das fibras, as quais demonstraram alterações mais expressivas.

Palavras chave: Treinamento Agudo; Atrofia muscular; Músculo Estriado Esquelético.

Agradecimento: Agências de fomento: Edital 23/2022 da Pró-reitoria de Pós-graduação em parceria com a Pró-reitoria de Graduação da Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'.

Histomorfometria hepática de juvenis de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus)* alimentados com dietas suplementadas com óleo essencial de Hortelã-Pimenta (*Mentha piperita)*

Mateus Magalhães Olegário [1], Roger Valderrama Londoño [1], Cristiana Leonor da Silva Carneiro[1], Felipe Rodrigues Saturnino [1], Sirlene Rodrigues Souza Sartori [1], Ana Lucia Salaro [1]

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

O óleo essencial de hortelã-pimenta, *Mentha piperita*, (OEHP) vem sendo utilizado em dietas para peixes por promover ação digestiva, atuar na motilidade intestinal e secreção de enzimas digestivas, promovendo assim maior crescimento dos peixes. Entre os órgãos estudados para avaliar a ação de aditivos alimentares, destaca-se o fígado por ser um órgão responsável pela síntese e armazenamento de nutrientes, bem como desintoxicação do organismo. Assim, com este estudo, objetivamos avaliar a histomorfometria e as prováveis alterações no tecido hepático de juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus)*

alimentados com dietas suplementadas com OEHP. Após oito semanas de alimentação dos peixes com as dietas-teste (com 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g kg^{-1} de OEHP), foram coletados fragmentos do fígado de 12 peixes por tratamento, os quais foram incluídos em resina glicol metacrílico e cortados em micrótomo para a obtenção de lâminas histológicas. Estas foram coradas com Alcian Blue + PAS, fotografadas com o uso de fotomicroscópio e analisadas com software Image J®. Foram avaliados a porcentagem de núcleos dos hepatócitos (NUC), capilares (CAP), glicogênio (GLI), gordura (GOR) e citosol dos hepatócitos (CIT), por meio de contagem utilizando uma grade de 234 pontos. A partir da análise estatística de contrastes ortogonais, observou-se apenas efeito linear positivo do óleo essencial de hortelã-pimenta sobre o citosol dos hepatócitos. Aplicando-se o teste de Dunnet, observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o que recebeu dietas suplementadas com 0,8 g kg^{-1} de OEHP, evidenciando uma diminuição na porcentagem de glicogênio e um aumento na porcentagem de citosol no

tecido hepático. Entendemos que a diminuição do glicogênio pode estar associada a desequilíbrios fisiológicos prejudiciais ao crescimento e a saúde do animal e portanto, para preservar a morfologia e funcionalidade hepática, os resultados histomorfométricos obtidos nos levam a concluir que não é recomendável a utilização de dosagens que extrapolem 0,8 g kg^{-1} de dieta.

Palavras chave: Nutrição animal; óleos essenciais; histomorfometria.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Avaliação clínica pós-operatória da técnica de Ureterotomia Microcirúrgica: estudo experimental

Thamara Lourdes Silva Maciel[1], Andréa Pacheco Batista Borges[1], Camila Aparecida Lopes[1], Carla de Oliveira Loures[1], Carolina Camargos Rocha[1], João Victor Ferreira de Matos[1]

[1]Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

A cirurgia ureteral é tecnicamente exigente, especialmente em pequenos animais, como mostram estudos anteriores em felinos que apresentaram altas taxas de complicações (31%) e mortalidade (21%) associadas à ureterotomia. No entanto, a falta de padronização na técnica levanta dúvidas sobre os possíveis fatores envolvidos nesses resultados. Diante disso, objetivou-se avaliar a segurança da ureterotomia microcirúrgica (UM) e comparar os padrões de sutura longitudinal e transversal na clínica pós-operatória. Os dados do presente estudo fazem parte de uma pesquisa aprovada pelo CEUA da UFV (03/2022), onde foi conduzido um ensaio clínico randomizado duplo-cego utilizando coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo

experimental. Para isso, foi usada uma amostra de 31 coelhos hígidos da raça Nova Zelândia, sendo 16 machos e 15 fêmeas, adultos, não castrados, com cerca de 3,65 Kg. Logo, os animais foram distribuídos em três grupos: GC ou controle (celiotomia mediana, n=10), GL (UM com sutura longitudinal, n=11) e GT (UM com sutura transversal, n=10). A UM foi realizada com magnificação de 20X usando um microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M-2222) e consistiu em uma incisão longitudinal de 3 mm no terço médio do ureter direito, seguida por sutura penetrante parcial em padrão simples separado, utilizando nylon 10-0 com agulha cilíndrica de 100 micras (Bioline® NL10CR38). No pós-operatório, os animais receberam administração de enrofloxacina (10 mg/Kg/SID por 5 dias), tramadol (5 mg/Kg/BID por 2 dias), meloxicam (0,3 mg/Kg/SID por 2 dias), dipirona (25 mg/Kg/BID por 5 dias) e metoclopramida (0,2 mg/Kg/TID por 5 dias). Durante os primeiros cinco dias após a cirurgia, os animais foram avaliados quanto a alimentação, micção, defecação, coloração de mucosa, hidratação, frequência cardíaca e

respiratória, borborigmos intestinais, temperatura retal (TR), escore de dor e possíveis alterações da ferida cirúrgica. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância, Teste de Tukey e teste de Freeman-Halton utilizando o sofwtare Statistical Analysis System, adotando um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Durante o período de acompanhamento pós-operatório foi verificado que os 31 coelhos apresentaram um estado clínico satisfatório, sem registro de óbitos e sem alterações significativas nos parâmetros clínicos, escore de dor ou complicações na ferida cirúrgica. Os coelhos permaneceram com os parâmetros vitais dentro da referência para a espécie. Foram observadas diferenças significativas pontuais entre os grupos, conforme serão descritas a seguir. No segundo dia, o GL e GT mostraram uma maior associação com a redução na defecação e no apetite em comparação ao GC. No terceiro dia, o GL apresentou uma maior correlação com a redução na defecação do que os outros grupos. No terceiro e quinto dia, o GT exibiu TR mais baixa do que GL e GC. Em suma, os achados deste experimento indicam que

a UM é segura e o padrão de sutura ureteral não influencia na ocorrência de alterações clínicas relevantes no pós-operatório inicial. Como próxima etapa são necessários estudos clínicos em gatos para confirmar a eficácia da UM como alternativa a outras intervenções cirúrgicas.

Palavras chave: Microcirurgia; Ureteres; Manejo Pós-operatório.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* em isolados de Piodermite Canina – 10 anos depois

Camila Aparecida Lopes[1], Lissandro Gonçalves Conceição[1], Luís Augusto Nero[1], Maria Aparecida Scatamburlo Moreira[1], Rafaela da Silva Rodrigues[1], Thamara Lourdes Silva Maciel[1]

[1]Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

A piodermite é um termo usado para se referir a infecções bacterianas que afetam a pele, geralmente decorrentes de causas subjacentes, como alergias, distúrbios de queratinização e endocrinopatias. Na Medicina Veterinária, entre os agentes causadores dessas infecções cutâneas em cães, destacam-se membros do gênero *Staphylococcus*, sendo a espécie de *S. pseudintermedius* a mais comumente associada a essa condição. Além disso, outros membros desse gênero também estão relacionados, embora com menor frequência, como *S. schleiferi* e *S. aureus*, sendo este último um patógeno oportunista relevante na Saúde Humana. Entretanto, *S. pseudintermedius* é um residente

comum da pele e mucosa de cães, capaz de colonizar ou causar infecções tanto em animais saudáveis quanto naqueles já acometidos por piodermite. O presente estudo investigou a prevalência de *S. pseudintermedius* em cães portadores de piodermite atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), dez anos após uma pesquisa anterior. Foram selecionados 36 cães com diagnóstico estabelecido de piodermite por exame físico e/ou citológico entre novembro de 2022 e fevereiro de 2023. Amostras de lesões dermatológicas, como pústulas e colarinhos epidérmicos, foram coletadas com swabs estéreis e cultivadas em Ágar Sangue de Carneiro a 37°C por 24 horas. As colônias obtidas foram purificadas e analisadas quanto à morfologia, hemólise e coloração de Gram, e posteriormente submetidas a testes bioquímicos, incluindo catalase, coagulase, Voges-Proskauer e DNase, para identificação fenotípica. Após a identificação preliminar, os isolados foram analisados por PCR para identificação da espécie, com amplificação do gene da termonuclease (nuc). Dos 36 cães analisados, a piodermite

superficial predominou com 33 casos (91,66%), afetando principalmente animais com idade igual ou superior a 7 anos, dos quais 16 (88,88%) eram fêmeas e 17 (94, 44%) machos. Foram obtidos 105 isolados de *Staphylococcus* coagulase positivos; 97 (92,38%) foram identificados como *S. pseudintermedius* por provas bioquímicas, e 96 (91,42%) foram confirmados por PCR. Estes resultados reafirmam a posição de destaque de *S. pseudintermedius* como agente etiológico predominante da piodermite em cães diagnosticados no Hospital Veterinário da UFV, corroborando as descobertas da pesquisa realizada na mesma instituição em 2012. Além disso, ressalta-se a importância da vigilância contínua dessa bactéria devido ao risco de transmissão para outros animais e humanos.

Palavras chave: Piodermite; *Staphylococcus pseudintermedius*; Prevalência

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Utilização de membrana de celulose quimicamente modificada como método de desinfecção de efluentes

Vinícius dos Santos Romagnoli [1,2], Maria Eduarda de Almeida Pinto [1,2], Luiza de Oliveira Possa [1,2] Renato Lima Senra[1,2], Graziela dos Santos Paulino[1,2], Tiago Antônio de Oliveira Mendes[1,2]

[1]Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

A incidência de doenças transmitidas pela água está relacionada com a qualidade da água potável disponível para consumo, uma vez que estas infecções ocorrem por ingestão ou contato com água contaminada por microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, vírus e protozoários. Assim, o objetivo deste trabalho é modificar quimicamente uma membrana de celulose comercial e testá-la como membrana de adsorção para desinfecção de efluentes. Para a modificação química, foi utilizada uma membrana de celulose regenerada com 12.000-14.000Da. A

membrana foi lavada em água destilada e seca em estufa a 37ºC por 2 horas. Após a secagem, a membrana foi submetida ao processo de oxidação, imersa em recipiente com 1L de solução de Ácido Bórico a 0,1M, pH 10,5, 2g de Brometo de Sódio e 0,3g de TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina**)** e homogeneizada por agitação magnética a temperatura ambiente por 3h. Posteriormente, a membrana foi seca em estufa a 60ºC por 10 minutos. Após a secagem, a membrana foi impregnada com uma pasta de alginato, composta de 40mL de solução de Ácido Bórico, adicionada de 5g de Alginato e 6mL de Hipoclorito de Sódio, homogeneizados até obter uma pasta lisa e completamente homogênea. A pasta foi aplicada em toda a superfície da membrana e mantida por 1h e lavada. Posteriormente, foi incubada em solução de metanol (250 mL) e PEI (polyethylenimine) (4g) por 24h. Posteriormente, foi incubada em 20mL de solução de glutaraldeído a 25ºC por 2h e lavada em água destilada. A membrana modificada foi submetida à Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e

testada em um protótipo de uma estação de tratamento. O experimento foi realizado em duas fases: a primeira com a lâmpada UVC desligada e a segunda com a lâmpada UVC acesa, utilizando um volume final de 20L de solução salina com 30mL de inóculo de cultura de *E. coli*, em concentração de $1x10^6$ células. Foram coletadas alíquotas de 5mL após a passagem pelo filtro contendo a membrana sem modificação, passagem pelo filtro com membrana modificada e com a lâmpada desligada e passagem pelo filtro com membrana modificada e lâmpada ligada. A eficiência foi demonstrada por plaqueamento em agar Luria Bertani utilizando a técnica da microgota. A metodologia desenvolvida para a modificação química da membrana de celulose mostrou-se eficiente conforme demonstrado pela análise espectroscópica, indicando um aumento no conteúdo de grupos amino e carboxílico em relação à membrana controle. Houve importante diferença na adição dos grupos químicos quando se utilizou maior quantidade total de pasta de alginato. A partir dos resultados dos plaqueamentos das alíquotas pré e pós

filtração, consegue-se perceber uma menor concentração bacteriana após a passagem da solução contaminada pela membrana, quando comparada com a passagem pelo filtro sem a membrana, com melhor resultado encontrado combinando a membrana com a luz UV ligada. A combinação da membrana modificada com e sem a irradiação de luz ultravioleta foi importante para a diminuição de quantidade bacteriana total, demonstrando efetividade da metodologia desenvolvida.

Palavras-chave: Celulose; Membrana de adsorção; Efluente.

Agradecimento: Agências de fomento**:** CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Avaliação do tecido branquial de juvenis de lambaris-rosa (*Astyanax Lacustres*) após a anestesia com óleo essencial de hortelã pimenta (*Mentha Piperita*)

Nilton Junior Teixeira Martins[1], Felipe Rodrigues Saturnino[1], Isabella Gonzalez-Gamboa[1], Pedro Henrique Costa Neves[1], Mariella Bontempo Duca de Freitas[1], Ana Lúcia Salaro[1]

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

O aumento significativo na produção de peixes tem estimulado linhas de pesquisas relacionadas a redução do estresse acometidos pelos animais durante o manejo produtivo, como por exemplo a biometria. O óleo essencial de hortelã pimenta (OEHP) vem apresentando resultados promissores como como agente anestésico nos processos de manejo produtivo. Desta forma, com essa pesquisa objetivamos avaliar o *status* oxidativo do tecido branquial de juvenis de lambari-rosa anestesiados com níveis de 50, 75, 100, 125 e 150 μL L^{-1} de OEHP e submetidos a biometria. Juvenis (1,43 ± 0,2g; 2,84 ± 0,13 cm) foram anestesiados com

diferentes níveis de OEHP e em seguida pesados e medidos. Um grupo de peixes foi exposto à solução contendo 5 mL L^{-1} de etanol, sendo considerados grupo controle. Amostras de tecido branquial dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos foram coletadas após 1 e 96 horas de recuperação para a avaliação do estresse oxidativo. Foram realizadas medições da atividade da proteína carbonilada (PC), do malondialdeído (MDA), da glutationa-S-transferase (GST), da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). O óleo de hortelã pimenta diminuiu significativamente os níveis de PC em comparação com o controle (p<0,05). A menor atividade de GST e PC foi registrada no período de 96 horas. Entretanto, os níveis mais altos de MDA, SOD e CAT foram observados na concentração de 150 μL L^{-1}. Observa-se que, embora a atividade da CAT e da SOD tenha aumentado na maior concentração do anestésico, o nível elevado de MDA sugere a ocorrência de peroxidação lipídica. Conclui-se que o óleo essencial de hortelã-pimenta (OEHP) utilizado como anestésico contribui para a redução do estresse oxidativo

nas brânquias. No entanto, seu uso não é recomendado em concentrações de 150 μL L^{-1} ou maiores, pois pode induzir estresse adicional ao animal.

Palavras chave: Anestesia, *Mentha piperita*, estresse.

Agradecimento: Apoio financeiro: FAPEMIG, CNPq, CAPES.

Efeito do uso do óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllus*) como anestésico sobre o tecido branquial de juvenis de Lambaris-Rosa (*Astyanax lacustris*).

Nilton Junior Teixeira Martins*[1], Isabella Gonzalez-Gamboa[1], Kemilli Pio Gregório[1], Cristiana Leonor da Silva Carneiro[1], Josiane Aparecida Teixeira[1], Ana Lúcia Salaro[1].

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Os anestésicos naturais e sintéticos são utilizados durante os procedimentos da produção e pesquisa com peixes, por atenuarem os efeitos do estresse associado a esses procedimentos. Peixes em situações estressantes ficam mais agitados podendo sofrer injúrias, quedas e a perda do muco de proteção corporal. Portanto, anestesiar os peixes antes dos mais diversos procedimentos da produção e/ou da pesquisa é uma das estratégias que vem resultando efeitos positivos para atenuar o estresse dos peixes durante tais eventos. Entre os anestésicos naturais utilizados destaca-se o óleo essencial de cravo (OEC). Assim, o objetivo desta

pesquisa é avaliar o efeito do uso do óleo essencial de cravo como anestésico sobre o tecido branquial de juvenis de lambaris rosa. Foi avaliado o estresse oxidativo do tecido branquial dos juvenis (1,43 ± 0,2g; 2,84 ± 0,13 cm) uma e 96 horas após anestesiados com óleo essencial de cravo nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μL L^{-1} e submetidos ao procedimento de biometria. Um grupo de peixes foi exposto à solução contendo 5 mL L^{-1} de etanol (grupo controle) e utilizados para comparações das análises de estresse oxidativo. Amostras das brânquias dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos foram coletadas uma e 96 horas após a indução. A atividade dos marcadores de estresse oxidativo tecidual foi avaliada através da quantificação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa-S-transferase (GST), bem como dos produtos do estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e proteína carbonilada (PC). Os peixes anestesiados com óleo essencial de cravo (OEC) apresentaram uma redução na concentração de proteína carbonilada (PC) tanto após 1 hora quanto após 96 horas em

comparação com o controle ($p<0,05$). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não foi afetada por nenhuma das concentrações de OEC. No entanto, observou-se uma menor atividade de catalase (CAT), malondialdeído (MDA) e glutationa-S-transferase (GST) após 1 hora. Por outro lado, após 96 horas, as atividades de CAT e GST foram maiores na concentração de 50 $\mu L\ L^{-1}$, acompanhadas de um leve aumento na concentração de PC. Esse resultado demonstra que o sistema de defesa antioxidante acompanhou o aumento da PC como uma resposta à proteção do tecido branquial. Conclui-se que o uso do OEC reduz significativamente a atividade das enzimas antioxidantes, como a PC, em comparação com o controle, e que a atividade das enzimas antioxidantes varia independentemente da concentração do óleo de cravo.

Palavras chave: Óleo essencial; estresse; peixe.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Transformação da levedura *Komagataella phafii* com o vetor pPICZαA-DENV1-NS1

Ana Paula de Paiva Lima[1], John Williams Oliveira Prates[2], Eleandro Fernandes Foraux[1], Arthur Kelton Machado Peixoto[1], Sérgio Oliveira de Paula[1], Roberto Sousa Dias[1]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

A dengue é uma doença causada pelo vírus DENV, que possui quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4) e pertence à família Flaviviridae. É transmitida pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo encontrada, principalmente, em regiões tropicais, incluindo o Brasil. A dengue ainda não possui uma ampla cobertura vacinal e seus sintomas são, geralmente, inespecíficos, como febre e dor no corpo, o que dificulta o diagnóstico. Em casos graves, o paciente pode chegar a desenvolver a Dengue grave, que provoca hemorragias e pode levar à morte. A proteína NS1, altamente conservada entre os flavivírus,

além de ser muito imunogênica é facilmente detectada no sangue nos primeiros dias de infecção, sendo promissora tanto para o diagnóstico precoce da dengue quanto para o desenvolvimento de vacinas. A levedura K*omagataella phaffii* se mostrou eficiente na produção de proteínas heterólogas, apresentando mecanismos de expressão semelhantes às de mamíferos. O vetor utilizado neste trabalho, pPICZαA-DENV1-NS1, possui o gene da proteína NS1 como inserto, além de genes de resistência à zeocina, o que possibilita o uso deste antibiótico na seleção dos organismos transformados. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi transformar a levedura *K. phaffi* KM71H com o vetor pPICZαA-DENV1-NS1, visando a expressão da proteína NS1. Em primeiro lugar, o vetor pPICZαA-DENV1-NS1 foi construído pela empresa GenScript e clonado em cultura de *Escherichia coli* TOP10F, para sua propagação. As bactérias foram cultivadas e seu DNA plasmidial foi extraído, purificado e linearizado. Em sequência, as leveduras foram cultivadas em meio YPD líquido e transformadas com o vetor por eletroporação. As

leveduras foram plaqueadas em meio YPD sólido com 100 μg/mL do antibiótico zeocina e incubadas a 30ºC por 4 dias. Dentre as colônias que cresceram, 14 foram coletadas e submetidas à uma reação de PCR para a confirmação da transformação, utilizando primers para o promotor AOX1, presente no vetor construído. A eletroforese em gel de agarose a 1% confirmou a transformação de três colônias pela detecção de um *amplicon* de cerca de 1500 pb, correspondente ao tamanho esperado da sequência alvo. Portanto, este trabalho se mostra promissor e de interesse para a prospecção de novas biotecnologias. Os próximos passos incluem a produção da proteína NS1 pela levedura, seguida de sua aplicação em testes diagnósticos e no desenvolvimento de vacinas.

Palavras chave: Dengue; Expressão de proteínas; *Komagataella phaffii*.

Agradecimentos: Agências de fomento: CAPES, CNPQ e ao LIVM.

Abordagens de imunoinformática para construção de proteínas multi-epítopo a partir de proteínas estruturais do SARS-CoV-2

Leonardo Pereira de Araújo[1], Natália Cristina de Melo Santos[1], Hunter Villela Augusto[1], Nelson José Freitas da Silveira[2], Patrícia Paiva Corsetti[1], Leonardo Augusto de Almeida[1]

[1]Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil

[2]Departamento de Ciência da Computação, Instituo de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil

A COVID-19 é uma síndrome respiratória aguda grave causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, que já resultou na morte de aproximadamente 705 mil pessoas no Brasil e 6,5 milhões em todo o mundo. Atualmente, não há terapia específica ao vírus, tornando o diagnóstico e o rápido isolamento do paciente a alternativa no controle da doença. O uso de vacinas para prevenção é o método mais eficaz para o combate da COVID-19, e estudos voltados para

melhorar a durabilidade imunológica dessas vacinas estão em constante desenvolvimento. Nessa perspectiva, o principal objetivo deste estudo foi desenvolver um candidato a vacina de múltiplos epítopos obtidos a partir de proteínas estruturais do SARS-CoV-2. Para isso, foram usados cinco epítopos obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa por abordagens de imunoinformática, no qual, os epítopos lineares únicos e mais promíscuos capazes de interagir com as moléculas de MHC-I, MHC-II e receptores de células B foram obtidas a partir proteínas envelope, membrana, nucleocapsídeo e de superfície (Spike). Os cinco epítopos foram concatenados com dois adjuvantes: β-defensina e PADRE (epítopo pan-DR). Esses componentes foram unidos em três versões, usando ligantes rígidos, flexíveis ou cliváveis, resultando em 3 proteínas quiméricas. Posteriormente, as proteínas foram avaliadas quanto à antigenicidade, alergenicidade, estabilidade e solubilidade em servidores online, além de terem sido submetidas a análises de modelagem molecular para desenvolvimento da estrutura tridimensional das

proteínas, dinâmica molecular e ancoramento molecular aos receptores semelhantes a Toll (TLR) TLR-2, TLR4 e TLR-8. Finalmente, a previsão da resposta imunogênica foi realizada para três doses da potencial vacina das proteínas quiméricas, e a previsão de clonagem foi realizada em um sistema de expressão em *Escherichia coli*. Os resultados indicaram que as três proteínas têm potencial para análises *in vitro* e *in vivo*, pois demonstram boa estabilidade, antigenicidade, solubilidade e ausência de riscos alergênicos. Além disso, observou-se uma boa interação com os receptores, uma vez que as proteínas quiméricas são capazes de interagir com as porções de adjuvante e epítopos. Por fim, a predição de respostas imune apontou bons níveis de respostas adaptativas humorais evidenciados pela produção de IgM e IgG para as três proteínas, com uma leva vantagem para a proteína quimérica com ligantes flexíveis. A predição de respostas celulares adaptativas mediadas pela produção de interferon-gama (IFN-γ), revelou um perfil de resposta de linfócitos T auxiliares 1 (T_H1), e as concentrações das

demais citocinas se mantiveram semelhantes para todos os modelos propostos nesse trabalho. Portanto, a segurança da vacina e a confirmação dos resultados demonstrados pelas análises *in silico* devem ser realizadas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras chave: Bioinformática; Vacionologia reversa; COVID-19.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES e FAPEMIG.

Mapeamento de diferentes sequências repetitivas nos cromossomos da formiga *Camponotus Rufipes* (Fabricius, 1775)

Ana Paula Rocha Moraes[1], Gisele Amaro Teixeira[2], Luísa Antônia Campos Barros[2], Hilton Jeferson Alves Cardoso de Aguiar[2], Denilce Meneses Lopes[1]

[1]Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

[2]Universidade Federal do Amapá, Campus Binacional, Oiapoque, Amapá, Brasil

Formigas do gênero *Camponotus* apresentam uma vasta diversidade ecológica e uma ampla distribuição geográfica, principalmente em áreas neotropicais. Esse grupo, possivelmente não monofilético, tem o maior número de espécies e subespécies de formigas descritas, com 1496 táxons inseridos em 43 subgêneros. *Myrmothrix* é um desses subgêneros, que engloba 14 espécies, incluindo *Camponotus rufipes*. Estudos citogenéticos em *C. rufipes* mostraram uma fusão robertsoniana envolvendo dois cromossomos

subtelocêntricos de tamanho médio. Esse rearranjo é caracterizado como um polimorfismo cromossômico, tendo indivíduos com 2n=40 e 2n=39 dentro de uma mesma colônia. Neste estudo, foi realizado o mapeamento cromossômico dos motifs teloméricos $(TTAGG)_n$ e $(TCAGG)_6$, e dos microssatélites $(GA)_{15}$, $(CA)_{15}$, $(CAA)_{10}$ e $(GAG)_{10}$, com ênfase nos cromossomos envolvidos no rearranjo. Larvas de *C. rufipes* foram coletadas em Ponte Nova e Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de gânglios cerebrais de larvas e submetidos à solução hipotônica de colchicina e fixadores. O mapeamento cromossômico foi realizado por hibridização in *situ* fluorescente, e as sondas $(TTAGG)_n$, $(TCAGG)_6$, $(GA)_{15}$, $(CA)_{15}$, $(CAA)_{10}$ e $(GAG)_{10}$ foram marcadas diretamente com Cianina-3 durante síntese pela empresa Sigma. Sequências de $(TTAGG)_n$ e $(TCAGG)_6$ foram localizadas na região telomérica dos cromossomos em indivíduos 2n=39 e 2n=40, porém houve também marcações de $(TCAGG)_n$ dispersas na eucromatina. O microssatélite $(GA)_{15}$ foi observado nos braços longos dos

cromossomos no cariótipo de 2n=39 e 2n=40, correspondendo a regiões eucromáticas. No cromossomo metacêntrico rearranjado, o $(GA)_{15}$ estava presente ao longo de ambos os braços. Os microssatélites $(CA)_{15}$ e $(CAA)_{10}$ apresentaram marcações dispersas ao longo de todos os cromossomos, apesar de que o $(CA)_{15}$ apresentou marcação fraca e o $(CAA)_{10}$ também esteve presente em algumas regiões terminais. O $(GAG)_{10}$ apresentou marcações nos braços curtos dos cromossomos pequenos, já e em cromossomos maiores o microssatélite estava disperso. Os dados obtidos neste estudo incorporam novo conhecimento citogenético molecular para a espécie e apoiam a hipótese de fusão Robertsoniana como origem do cariótipo com 2n=39 cromossomos.

Palavras chave: Citogenética; telômeros; microssatélites.

Agradecimento: Agências de fomento: CNPQ (124479/2022-7)

Avaliação de parâmetros oxidativos na próstata ventral de ratos após coexposição ao arsênio e níquel

João Victor Leles Faria[1], Luiz Otávio Guimarães-Ervilha[2], Thainá Iasbik Lima[3], Mariana Machado-Neves[4]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, UFV

Elementos químicos presentes na crosta terrestre podem se tornar biodisponíveis a partir de ações naturais e antrópicas no ambiente. A consequência dessas ações é a contaminação do solo, ar e água, tornando plantas, animais e homens susceptíveis a elementos potencialmente tóxicos. Dentre eles podemos citar o arsênio. Este metaloide pode ser encontrado na água de beber nas formas inorgânicas arsenito e arsenato, expondo mais de 100 milhões de pessoas de diferentes países no mundo aos seus efeitos deletérios à saúde. Sabe-se que o arsênio pode causar hipertensão, diabetes, neoplasias e distúrbios reprodutivos. Outro elemento danoso à saúde é o níquel. Este metal de

transição pode desencadear, por exemplo, alterações neoplásicas, comportamentais e neuronais. No sistema reprodutor masculino, a exposição a cada um desses elementos pode ocasionar danos teciduais em testículo, epidídimo e próstata, prejudicando a formação e funcionalidade dos espermatozoides. O principal mecanismo de ação dos metais é a geração do estresse oxidativo, a partir do desbalanço entre a atividade de enzimas antioxidantes e formação de radicais livres. Não se sabe, porém, se a coexposição a mistura desses agentes pode intensificar seus efeitos no organismo. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da coexposição ao arsênio e níquel sobre parâmetros oxidativos na próstata ventral de ratos Wistar adultos. Para isso, foram utilizados 20 ratos Wistar adultos (70 dias de idade) divididos em quatro grupos experimentais (n = 5/grupo; CEUA número 45/2021). Animais controle receberam água de beber, enquanto ratos do grupo controle arsênio receberam 1mg kg^{-1} deste metaloide, em solução de arsenito de sódio, e ratos do grupo controle níquel

receberam 7mg kg^{-1} deste elemento em solução de cloreto de níquel. Por fim, ratos do grupo coexposição receberam, ao mesmo tempo, os dois elementos nas suas respectivas concentrações. As soluções foram fornecidas em bebedouro, diariamente por 70 dias. No dia seguinte ao final da exposição, os animais foram eutanasiados para obtenção da próstata ventral. Fragmentos desta glândula foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80ºC, para realização de ensaios *in vitro.* Esses ensaios incluíram a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa S-transferase, bem como mensuração das concentrações de capacidade de redução férrica do plasma e de marcadores do estresse oxidativo como óxido nítrico, malondialdeído e proteínas carboniladas (PC). Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que animais coexpostos aos dois elementos tiveram atividades reduzidas de SOD e aumentadas de CAT em relação aos controles ($p < 0,05$). As

concentrações de PC foram maiores em ratos expostos aos elementos, fornecidos juntos ou separados, que em ratos controle ($p < 0,05$). Os demais parâmetros não diferiram entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Pode-se concluir que a coexposição ao arsênio e níquel alterou a atividade de enzimas antioxidantes com aumento da oxidação de proteínas na próstata ventral. Os parâmetros alterados podem afetar a atividade secretora da glândula e, consequentemente, prejudicar a viabilidade de espermatozoides.

Palavras chaves: Mistura de metais, glândula sexual acessória, catalase

Agências de fomento: FAPEMIG e CNPQ

Cefalexina- atualização para o uso clínico

Carolina de Araújo Motta[1], Diogo Vieira de Morais[1], Igor Moreira Raminho[1], Isabella Vitória Barbosa Silva[1], Lucas Matheus Souto Pêgo[1], Maria Gabriela Barbosa Ventura[1], Sacha Gabrieli Macedo de Azevedo[1]

[1]Faculdade Dinâmica do Vale do Piranga, Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil

A Cefalexina é um antibiótico da classe das cefalosporinas, efetiva contra alguns tipos de bactérias causadoras de infecção urinária, no trato respiratório, em tecidos moles, na pele e nos ossos. Em geral, tem ação contra *Streptococcus*, *Stafilococcus, Escherichia coli, Klebsiella* sp e *Proteus mirabilis*, possuindo extenso uso clínico e grande relevância para a saúde pública. Entretanto, é cada vez mais frequente o surgimento de versões desses agentes infecciosos que apresentam resistência ao antimicrobiano, o que desperta preocupação nos profissionais da saúde e traz maior complexidade aos casos relacionados. Diante deste cenário, o presente artigo tem como principal objetivo a busca por

maiores atualizações para o uso clínico do medicamento em questão, mediante o atual obstáculo da resistência bacteriana. Assim, foi realizado um estudo transversal, utilizando dados de artigos publicados nas plataformas Scielo, Lilacs e Pubmed, em um prazo de até 10 anos, bem como uma seleção detalhada dos mesmos, tendo em vista sua relevância e conformidade com o tema proposto. Os estudos em questão evidenciam a importância de se considerar os padrões de resistência bacteriana locais e advertem sobre a observância das indicações clínicas, posologias e duração do tratamento. Diante do exposto, observa-se a necessidade de uso criterioso da Cefalexina, considerando as recomendações e evidências existentes. Além disso, é essencial conscientizar os pacientes sobre a importância de aderir ao tratamento prescrito para minimizar o desenvolvimento de resistência microbiana.

Palavras-chave: Cefalexina, cefalosporinas, resistência bacteriana

O efeito subagudo do Calaris® em parâmetros espermáticos de camundongos Swiss

Isabela Pereira da Silva Bento[1], Luiz Otávio Guimarães-Ervilha[1], Izabela da Silva Lopes[1], Mariana Machado-Neves[1]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Herbicidas são amplamente usados na agricultura para o combate de pragas, podendo deixar resíduos em produtos alimentícios. Por isso, é crucial compreender os possíveis riscos desses produtos aos seres vivos, a fim de reduzir seus impactos, restringir sua venda ou até proibir sua comercialização. O Calaris® é uma mistura de dois herbicidas, atrazina e mesotriona, com pouco conhecimento sobre seus efeitos em animais e humanos. Neste contexto, este estudo avaliou os efeitos da exposição subaguda ao herbicida Calaris® em parâmetros espermáticos de camundongos Swiss. Trinta camundongos Swiss machos adultos foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais

foram mantidos em condições controladas de luz, temperatura, e tiveram acesso livre a água e alimentação. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFV) sob o número de protocolo 33/2023. Os camundongos foram divididos em cinco grupos experimentais (n=6/ grupo): Grupo Controle, que recebeu 0,2mL de água (veículo do herbicida), e quatro grupos de animais recebendo Calaris® nas concentrações de 0,2mg/kg, 2mg/kg, 20mg/kg e 200mg/kg, diariamente por gavagem. Após 7 dias de tratamento, os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados. Os epidídimos foram dissecados, sendo a região da cauda do órgão fragmentada e colocada em meio Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) por 5 minutos a 37°C, para liberação dos espermatozoides. A motilidade espermática foi examinada usando 10µL do fluido, colocado entre lâmina e lamínula, e aquecidos a 37°C. Duzentos espermatozoides por animal foram avaliados em microscópio em aumento de 400×, sendo classificados como móveis ou imóveis (%). A morfologia espermática foi feita

utilizando fluido fixado em formaldeído tamponado 4%. Duzentos espermatozoides foram examinados em microscópio no aumento de 1000X e as anormalidades foram classificadas em defeitos na cabeça, peça intermediária e cauda. Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$. As análises estatísticas foram feitas no GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados mostraram que animais expostos a 2mg/kg (90,28±3,00%) e 20mg/kg (89,56±3,40%) de Calaris® apresentaram redução na motilidade espermática em comparação a animais controle (98,40±0,97%; $p<0,05$). Animais expostos à 200mg/kg também apresentaram menor motilidade espermática (83,6±4,90%) que animais controle (98,40±0,97%) e aqueles que receberam 0,2 mg/kg (94,08±4,08%) do herbicida ($p<0,05$). Quanto à morfologia espermática, não houve diferença entre os grupos experimentais para o percentual de espermatozoides com morfologia normal ($p>0,05$). No entanto, camundongos

expostos a 200mg/kg de Calaris® apresentaram maior proporção de espermatozoides com defeitos na cabeça (6,00±2,18%) que animais controle (3,50±0,96%) e aqueles expostos ao herbicida nas doses de 0,2mg/kg (4,83±2,01%), 2mg/kg (5,00±0,91%) e 20mg/kg (4,67±0,55%; $p<0,05$). Pode-se concluir que altas doses de Calaris® reduziram a motilidade espermática e aumentaram a proporção de defeitos na cabeça em espermatozoides. Para um entendimento mais aprofundado desse processo, são necessários estudos sobre a produção e maturação dos espermatozoides, associada à exposição ao herbicida Calaris®.

Palavras chave: Espermatozoide, Herbicida, Motilidade Espermática

Agradecimento: Agências de fomento: FAPEMIG, CAPES e CNPQ

CAPÍTULO 2- RESUMOS SIMPLES EM INGLÊS

Physical-chemical characterization and fatty acid profile of Pequi Oil

Camila Rodrigues Carneiro[1], Adamu Muhammad Alhaji[2,3], Edimar Aparecida Filomeno Fontes[2], Simone Monteiro e Silva[4,5], Marcio Arêdes Martins[6], Eduardo Basílio de Oliveira [2]

[1]Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Departamento de Ciência e Tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[3]Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Aliko Dangote Universidade de Ciência e Tecnologia, Wudil, Nigeria

[4]Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

[5]Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás

[6]Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade de Brasília, Brasília, MG, Brasil

Vegetable oils provide essential nutrients for human consumption, assist the body in absorbing fat-soluble vitamins, and bolster the immune system. Notably, pequi oil stands out due to its abundant composition of bioactive compounds, justifying its use in traditional medicine for combating aging and maintaining cardiovascular health, as well as its culinary application. Among the bioactive compounds found in pequi oil are antioxidants (carotenoids and phenolic compounds), unsaturated fatty acids (omega-3,omega-6, DHA, and EPA), and vitamins (A,C, and E). However, the literature contains limited data related to the chemical composition of pequi oil. In this context, the present study characterized pequi oil in terms of its identity, quality, and fatty acid profile. The Analysis of acidity, peroxide value, saponification value, iodine value, and refractive index was carried out in accordance with the standards of the Adolfo Lutz Institute (2008). Total carotenoid content was quantified using UV-visible spectrophotometry, and the fatty acid profile was

determined through gas chromatography. The obtained results were as follows: saponification value of 202.70 ± 1.49 mg KOH/g, iodine value of 49.83 ± 2.47 g I2/100g, refractive index of 1.46 ± 0.00, total carotenoid content of 114.37 ± 0.35 μg/g, acidity index of 3.77 ± 0.01 mg KOH/g, and peroxide value of 9.66 ± 0.01 meq/kg. The acidity and peroxide values fall within the range established by Brazilian regulations for unrefined vegetable oils, which are 4 mg KOH/g for the acidity index and 15 meq/kg for the peroxide index. The fatty acid profile of pequi oil indicated higher levels of oleic acid (58.63%) and palmitic acid (37.18%). In smaller proportions, linoleic acid (1.66%), stearic acid (1.63%), and palmitoleic acid (0.89%) were also quantified. Therefore, pequi oil is a source of carotenoids and unsaturated fatty acids with potential uses in food enrichment and pharmaceutical formulations.

Keywords: Vegetable oil; Chemical composition; Nutrient.

Funding agencies: CAPES, CNPQ, and FAPEMIG

Regional differences in porcine efferent ducts epithelium: morphological and histomorphometric description

Tayná Bolsam da Silva[1], Kamilla Dias Paes Silva[1], Renner Philipe Rodrigues Carvalho[2], Iara Magalhães Ribeiro[1], Mônica Morais Santos[3], Mariana Machado-Neves [1,2]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
[2]Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
[3]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

The efferent ducts are small, delicate tubules whose primary function is to transport sperm from the testicular network to the epididymis. They also play a crucial role in sperm concentration by reabsorbing most of the fluid and

proteins of the testicular fluid, which is essential to male fertility. Despite their significance, limited attention has been directed towards investigating porcine efferent ducts' morphological and functional attributes. Therefore, this study aimed to comprehensively describe the histomorphometric characteristics of the efferent duct epithelium in pigs. Five adult pigs were selected and orchiectomized, and their efferent ducts were fixed in 10% formaldehyde (CEUA 1064/2021, 1076/2021). The efferent ducts were dissected and segmented into three distinct regions: proximal, medial, and distal. These segments were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90%, and absolute) for posterior embedding in 2-hydroxyethyl methacrylate. Histological sections of 3 μm in thickness were stained with toluidine blue and used to obtain images of the efferent duct epithelium in an optical microscope coupled to a digital camera. The images were analyzed using Image Pro Plus 4.5 software to quantify the epithelium height, cilia length, and the proportion of ciliated, non-ciliated, and basal cells. For each animal, 30

sections from each region were evaluated. All results were assessed for normality using the Shapiro-Wilk test. Quantitative data were subjected to one-way ANOVA and means compared by Tukey's post hoc test. Significant differences were considered when $p < 0.05$, and results were expressed as mean ± standard deviation. A pseudostratified ciliated columnar epithelium was observed consistently in all regions analyzed. This epithelium was composed of ciliated cells, non-ciliated cells, and basal cells. Non-ciliated cells exhibited a basal spherical nucleus with vacuolated cytoplasm, whereas ciliated cells presented an apical spherical nucleus with multiple vesicles. The height of the epithelium was found to be higher in the medial (47.21 ± 4.37 μm) and distal (54.73 ± 4.50 μm) regions compared to the proximal region (21. 91 ± 9.32 μm; $P < 0.05$). A progressive increase in cilia length was also observed from the proximal (7.16 ± 0.71 μm) to the medial (9.20 ± 0.93 μm) and distal (11.55 ± 0.69 μm; $P < 0.05$) regions. Regarding cell proportion, ciliated cells were notably absent in the proximal region of the efferent ducts

(0.00 ± 0.00%), while their proportion in the medial (29.61 ± 7.33%; $P < 0.05$) and distal (39.81 ± 1.10%) regions did not differ from each other ($P > 0.05$). Although non-ciliated and basal cells were present in all portions, the proportion of non-ciliated cells differed between the three regions ($P < 0.05$). Specifically, the highest proportion of these cells was observed in the proximal region (99.60 ± 0.68%), followed by the medial (67.01 ± 6.36%) and distal (55.20 ± 0.89%) regions. In conclusion, this study revealed considerable histological variation in the epithelium along the length of the efferent ducts. These variations suggest different stages of epithelial activity and a specific luminal microenvironment for each region, which is required for sperm maturation.

Keywords: swine; fertility; sperm.

Funding: CAPES, CNPQ and FAPEMIG.

Temperature-dependent alternative splicing affects gene expression in Aedes aegypti Mosquitoes Midgut

Priscila Gonçalves Ferreira[1], Miqueias Fernandes[2], Camila Aparecida Profeta[1], Gustavo Ferreira Martins[3], Courtney Cuinn Murdock[4], Tiago de Oliveira Mendes[1]

[1]Departament of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

[2]Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[3]Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

[4]Department of Entomology, College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University, Ithaca, NY, United States of America

Temperature is one of the most significant abiotic factors that influence in vector resistance to pathogens. Research

has provided substantial insights into the immunological and oxidation process that are impacted by temperature. However, we are only just beginning to understand the complexity underlying mosquito–pathogen interactions. Here we went further and investigated, firsthand, the impact of temperature on alternative splicing in *Aedes aegypti* mosquitoes midgut under different temperatures. First, RNASeq data from Ae. aegypti midguts exposed to three temperatures (20, 28 and 36°C) for two time (24 and 48 hr) were recovered from NCBI SRA (ID: PRJNA615972). To identify differential alternative splicing events (ASE) between the temperature of 28°C and other temperatures (20 and 36°C), we used the statistical parameters of replicate multivariate analysis of transcript splicing (rMATS). Five main alternative splicing types, including skipping exon (SE), retention intron (RI), alternative 5′splice site (A5SS), alternative 3′splice site (A3SS) and mutually exclusive exons (MXE), which satisfied the criteria of FDR q-value <0.5, were screened out as differential alternative splicing genes. To validate

differential ASE in the response to temperature, total RNA was extracted from 20 dissected midguts 24 h after blood ingestion using the RNeasy Mini Kit as instructed by the manufacturer. Few genes were found with differential alternative splicing when comparing low (20°C) and high (36°C) temperatures with standard rearing conditions (28°C). Interestingly, between listed genes, we found Trypsin (TRY), Ferritin (FER), Thioredoxin (TRX) and Peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC), genes previously shown to have their expression modulated by temperature. Experimental validation of TRX and PGRP-LC, genes already well known for their role in defending against pathogen establishment, confirmed the results that TRX have a differentially spliced exon in warmer conditions that can affect its activity. Differently, for PGRP-LC our experimental results do not showed differential alternative splicing between temperature treatments. Our results revealed some promising targets for future studies of its role in Ae. aegypti competence to transmit arboviruses of human concern.

Keywords: Temperature; Alternative splicing; *Aedes aegypti.*

Fundings: Agências de fomento: FAPEMIG.

Histomorphometric characteristics of the efferent duct epithelium in Equus Caballus

Tayná Bolsam da Silva[1], Kamilla Dias Paes Silva[1], Renner Philipe Rodrigues Carvalho[2], Iara Magalhães Ribeiro[1], Mônica Morais Santos[3], Mariana Machado-Neves[1,2]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
[2]Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
[3]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

The efferent ducts connect the testicular network to the epididymis, where most of the testicular fluid is reabsorbed, contributing to sperm concentration. Although many studies have been conducted on laboratory animals, there is limited information available on the morphological and functional aspects of the efferent ducts in large

domestic mammals, such as equines. Considering the active contribution of efferent ducts to reproductive functions and the significant economic importance of stallion fertility for the equestrian industry, the present study was designed to describe the epithelial characteristics of the efferent ducts of adult horses. The study was conducted with five adult stallions, aged between 5 and 7 years (CEUA/UFV 1064/2021 and 1076/2021). Following orchiectomy, tissue samples were collected and fixed in 10% formaldehyde. Subsequently, the efferent ducts were dissected and segmented into proximal, medial, and distal regions. The fragments were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol (70%, 80%, 90%, and absolute) for posterior embedding in 2-hydroxyethyl methacrylate. Histological slides containing sections with 3 μm thickness were stained with toluidine blue, placed with Entellan, and analyzed under light microscopy. For morphometric analyses, ten digital images of the proximal, medial, and distal efferent ducts were obtained using a photomicroscope and analyzed using the software Image

Pro Plus 4.5. Epithelium height, cilia length, and the proportion of ciliated, non-ciliated, and basal cells were determined based on 30 sections per region per animal. All results had their normality evaluated by the Shapiro-Wilk test, and data were subjected to one-way ANOVA followed by the post hoc Tukey test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Histological sections from all regions of the efferent ducts showed pseudostratified columnar epithelium with ciliated cells. Ciliated cells had a central, ovoid nucleus and cytoplasm without vacuoles. In contrast, non-ciliated cells presented a basal, spherical nucleus and vacuolated cytoplasm. Some basal cells were also observed. The morphometry of the epithelium height, cilia length, and the relative distribution of epithelial cell types did not differ among proximal, medial, and distal regions ($p > 0.05$). While ciliated cells help propel sperm toward the epididymis, non-ciliated cells are involved in the reabsorption of part of the testicular fluid, which explains the presence of cytoplasmic vacuoles. Furthermore, morphological differences and variations in

cellular proportions between the proximal, medial, and distal regions of efferent ducts are frequently reported for other species, such as rats and mice. However, the considerable individual variability observed in equine species could explain these results. In conclusion, the findings of this study do not show significant regional morphometrical differences in the epithelium composition of efferent ducts in equines.

Keywords: Stallion; fertility; sperm.

Funding: CAPES, CNPQ and FAPEMIG.

Dynamic activity of antioxidant enzymes in bovine epididymis

Iara Magalhães Ribeiro[1], Arabela Guedes A. Viana[2], Renner P. R. Carvalho[2], Tayná Bolsam da Silva[2], Mariana Machado-Neves[1,2]

[1] Department of Veterinary Medicine, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
[2] Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Male infertility is a growing global concern and, approximately 25% of the etiology of infertility is still unknown. Understanding the physiological processes associated with sperm formation and its regulation up to fertilization is essential for uncovering the factors contributing to this rising infertility trend. Spermatozoa require a specific level of reactive oxygen species (ROS) to perform essential functions related to capacitation. In this

context, it is reasonable to expect that the microenvironment around mammalian sperm during their journey through the epididymis employs a sophisticated mechanism to manage the generation and recycling of ROS. Therefore, the objective of the present study is to uncover the distribution and functional significance of key antioxidant enzymes throughout the epididymal duct. Testes and epididymides were obtained from five 36-month-old crossbred bull. The efferent ducts, caput, corpus and cauda regions of the epididymis were dissected, frozen in liquid nitrogen, stored at -80 °C and homogenized in PBS (pH 7.4). The homogenate was centrifuged and the supernatant was used to analyze the antioxidant enzyme activities: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-Transferase (GST). All results had their normality evaluated by the Shapiro-Wilk test. Data were submitted to One-way ANOVA followed by the post hoc Tukey test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. SOD activity was higher in the efferent ducts than in the caput and corpus regions ($p < 0.05$). In the cauda, SOD

activity was higher than in the caput ($p < 0.05$), but did not differ from corpus region ($p > 0.05$). In the cauda region, CAT activity was lower in relation to the caput, corpus, and efferent duct ($p < 0.05$). Furthermore, GST activity was higher in the efferent ducts than in the corpus and cauda regions ($p < 0.05$). The region-specific expression of epididymal antioxidant enzymes suggests that the requirements for these molecules vary along the length of the epididymis. The higher SOD activity observed in the efferent ducts is indicative of a heightened need for protection against superoxide anion (O_2^-) during the early stages of sperm maturation. Seminiferous tubules and Leydig cells generate O_2^- at different rates, suggesting that the efferent ducts play a critical role in shielding sperm from potential damage caused by this ROS during their initial journey through the epididymis. Regarding CAT activity, the elevated levels observed in proximal regions emphasize the importance of efficient hydrogen peroxide detoxification in the initial stages of sperm maturation, neutralizing reactive oxygen/nitrogen species and

promoting an ideal microenvironment for sperm maturation. The high GST activity in the efferent ducts highlights the importance of phase II detoxification reactions in the initial stages of sperm maturation, a protective mechanism for newly transported spermatozoa.These findings provide insights on the dynamic response of epididymis to the spermatozoa physiology, highlighting the intricate interplay between oxidative defense mechanisms and sperm maturation.

Keywords: infertility; oxidative stress; antioxidante enzymes

Funding: CAPES, CNPQ and FAPEMIG.

CAPÍTULO 3 - RESUMOS EXPANDIDOS EM PORTUGUÊS

Histologia das gônadas de *Ophioderma appressum* (Echinodermata) do Nordeste do Brasil

Alessandra Lopes de Araújo[1], Sirlene Souza Rodrigues Sartori[1], Jimena García Rodríguez[2], Amanda Ferreira Cunha[1]

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Departamento de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Introdução

Ophiuroidea é a classe mais diversa do filo Echinodermata (Stöhr e O'Hara, 2012). São cosmopolitas e popularmente conhecidas como serpentes-do-mar e estrelas-de-cesto devido aos movimentos e flexibilidade de seus braços, sendo o último nome utilizado para caracterizar os ofiuróides com braços ramificados (Brusca et al., 2016). São

caracterizados por sua simetria pentarradial, com cinco braços articulados e alta capacidade de regeneração de seus membros, e sua anatomia consiste em um disco central rígido, onde ficam concentradas as gônadas e sistema digestório (Stöhr e O'Hara, 2012). Seu padrão alimentar é generalista (Yokoyama e Amaral, 2008) e, embora seu papel ecológico seja pouco explorado, sugere-se que contribuam com a redistribuição da matéria orgânica do fundo do mar pela sua participação em diversos níveis tróficos (Stratanenko & Denisenko, 2020). São dioicos, e podem se reproduzir tanto assexuadamente, através de fissão, ou sexuadamente, através da produção e liberação de gametas (Brusca et al., 2016). O padrão da gametogênese varia de espécie para espécie e consiste basicamente na maturação dos gametas, crescimento da gônada e desova, sendo a maioria com fertilização externa. A desova pode ser contínua, ocorrendo durante o ano todo, ou anual, com um único evento de desova durante o ano, podendo ser uma desova curta ou longa. A reprodução é influenciada principalmente pela temperatura da água e pelo

fotoperíodo, sendo favorecida por temperaturas mais elevadas (Hendler, 1991). Portanto, em regiões temperadas, a reprodução tende a ser somente nos meses de verão, enquanto que nos trópicos a reprodução é mais longa. (Hendler, 1995) *Ophioderma appressum* (Say, 1825) é uma espécie da família Ophiodermatidae encontrada no nordeste e sudeste do Brasil, frequentemente em águas rasas e áreas de recifes de corais e bancos de algas (Gondim et al., 2013). É um predador noturno onívoro com dieta diversificada (Latife et al., 2021). Embora a espécie seja relativamente bem conhecida no Brasil pela sua ecologia e hábitos de vida, sua biologia reprodutiva ainda é pouco explorada. Trata-se de uma espécie dioica com dimorfismo sexual (Hendler, 1995), porém detalhes do seu ciclo reprodutivo, como a frequência de desova e os diferentes estágios de maturação dos seus gametas ainda não são bem conhecidos. Nesse sentido, esse estudo tem o objetivo de inferir os padrões reprodutivos de *O. appressum* a partir da análise histomorfológica de suas gônadas e gametas, a fim

de compreender aspectos relacionados ao ciclo reprodutivo e gametogênese da espécie.

Material e métodos

Exemplares da espécie *Ophioderma appressum* (Say, 1825) foram obtidos na base do Projeto Coral Vivo, no Ecoparque, em Arraial d'Ajuda, Bahia, Brasil. Cerca de 11 espécimes foram coletados em março de 2022, de forma aleatória e durante o dia, na Praia dos Pescadores (16°29'28.80''S 39°04'03.57''O), localizada em frente à base do projeto, sob maré baixa e com auxílio de um snorkel. Os indivíduos foram encontrados embaixo de rochas e entre esqueletos de corais. Os animais coletados foram transportados vivos em água do mar dentro de baldes plásticos para os viveiros sob condições naturais localizados na base. Após 7 dias mantidos nos viveiros, os animais foram anestesiados e eutanasiados individualmente com mentol, o disco foi medido com um paquímetro manual e o peso úmido foi aferido. Foram transferidos para tubos Falcon e fixados em formalina 10% durante 24 horas, e em seguida conservados

em álcool 70%. Posteriormente, foram dissecados para separação das gônadas. Seus discos foram abertos com auxílio de uma lupa, pinças e tesouras apropriadas para o procedimento e as gônadas foram expostas, removidas, e transferidas para tubos de 1,5mL com álcool 70%. As gônadas foram submetidas ao processamento histológico (desidratação, inclusão, microtomia, coloração) e fotografadas. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas das gônadas e gametas. Entre os dados quantitativos, foram obtidos dados do número e diâmetro dos ovócitos das fêmeas, além do diâmetro das gônadas femininas. Para a obtenção do número de ovócitos por espécime, foram contados todos os ovócitos presentes nas gônadas, independente do seu estado de maturação. O diâmetro das gônadas e dos ovócitos foi medido a partir de fotografias das lâminas obtidas por microscopia ótica utilizando o programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Como forma de padronização foram obtidas medidas de diâmetro de 30 ovócitos providos de núcleos e nucléolos, e os ovócitos medidos foram escolhidos nos cortes 1, 5 e 10

da lâmina, para evitar a medição do mesmo ovócito, conforme a metodologia descrita em Borges et al. (2009). Dentre os dados qualitativos, os ovócitos das fêmeas foram classificados quanto ao seu estado de maturação e de acordo com o seu tamanho (cf. Borges et al., 2009). A análise dos ovócitos quanto ao seu grau de maturação envolveu não somente sua classificação com base no tamanho, mas também a análise de aspectos qualitativos relacionados à morfologia da célula e coloração. Já nas gônadas masculinas, foram coletados apenas dados qualitativos, a partir da classificação das gônadas de acordo com sua composição celular.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote básico (*stats*) da linguagem R de programação v. 4.3.0 (R Core Team, 2023). Para visualização dos resultados, gráficos foram construídos utilizando-se o pacote *ggplot2* v. 3.4.2 (Wickham, 2016) da linguagem R.

Resultados e Discussão

Dos 11 indivíduos analisados, 6 eram fêmeas e 5 machos, cujos discos em média apresentaram 13,25 e 12,58 mm de diâmetro, e 2,57 e 2,26 gramas, respectivamente. Macroscopicamente, as gônadas femininas são divididas em lobos envoltos por sacos contendo ovócitos de formato arredondado e coloração alaranjada. Já os machos possuem a gônada ramificada, fusiforme e de coloração esbranquiçada. Ao analisar histologicamente as gônadas (Figura 1) tanto femininas quanto masculinas, foi observado que ambas são envolvidas por um saco externo e um interno, sendo que esse último entra em contato com os gametas. Nas gônadas femininas foi possível observar os quatro tipos de ovócitos, que foram classificados de acordo com os intervalos de tamanho e características morfológicas observados e descritos (Tabela 1). De acordo com a composição de ovócitos, conclui-se que as gônadas estavam maduras por terem uma concentração elevada de ovócitos maduros e pré-maduros. Além disso, é possível que o *O. appressum* possui desova anual, longa e assíncrona, por ter sido observado todos os tipos de ovócitos na gônada. Isso

sugere que mesmo após os ovócitos crescerem e amadurecerem, a gônada continua produzindo novos ovócitos, sendo possível encontrar ovócitos maduros e imaturos simultaneamente.

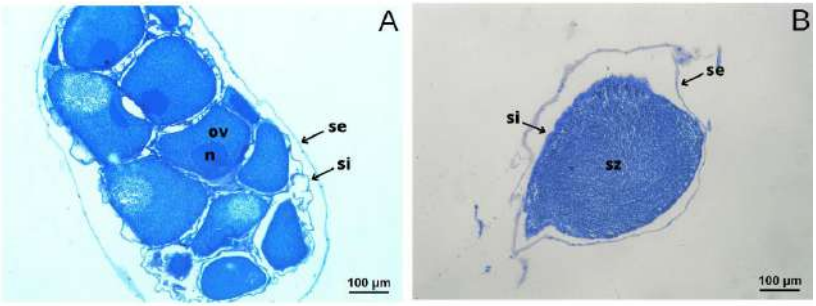


Figura 1. Fotografias de microscopia óptica de lâminas histológicas das gônadas de *O. appressum*. (A) gônada feminina com ovócitos maduros (maiores) e em estado de maturação (menores). (B) gônada masculina com espermatozóides maduros. Ambas coradas por AT e em aumento de 10x. si = saco interno; se = saco externo; ov = ovócito; n = núcleo; sz = espermatozoides.

Tabela 1. Classificação dos tipos de ovócitos em gônadas femininas utilizada neste estudo (segundo Borges et al., 2009), de acordo com o nível de maturação do ovócito.

Classificação	Tamanho	Características morfológicas	Quantidade
Ovócito pré-vitelogênico	<75 um	Formato irregular, pequeno e citoplasma escuro	26
Ovócito em vitelogênese inicial	75 - 150 um	Formato irregular, pouco maiores que os ovócitos pré-vitelogênicos, citoplasma claro.	21
Ovócito pré-maduro	151 - 300 um	Formato arredondado, citoplasma claro e com gotículas lipídicas e preenchido com gotículas lipídicas	75
Ovócito maduro	>300 um	Formato arredondado,citoplasma claro e com gotículas lipídicas abundantes e totalmente preenchido com vitelo.	31

Em relação às gônadas masculinas, foi possível observar que todos os animais apresentaram gônadas maduras, já que estavam preenchidas majoritariamente por espermatozóides, sendo observada apenas uma camada de células espermatogênicas (espermatogônias e espermatócitos) na periferia da gônada e em baixas quantidades. As células espermatogênicas possuem

formato arredondado e são maiores se comparadas aos espermatozoides.

Conclusão

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível concluir que a espécie *Ophioderma appressum* apresenta um padrão de maturação das gônadas condizente com um ciclo reprodutivo assíncrono, e possivelmente anual longo. A assincronicidade na reprodução da espécie é suportada pela presença de ovócitos em diferentes estágios de maturação na mesma gônada, principalmente ovócitos pré-maduros e maduros. Considerando a variação de tamanho e características morfológicas dos ovócitos, foi possível identificar quatro diferentes tipos de ovócitos nas gônadas femininas da espécie. As gônadas masculinas estavam todas maduras, pela presença majoritária de espermatozoides no seu interior. A presença de machos e fêmeas com gônadas maduras apoia as previsões de que a espécie se reproduz durante os meses quentes em regiões tropicais.

Referências bibliográficas

Borges, M., Yokoyama, L. Q., & Amaral, A. C. (2009). Gametogenic cycle of *Ophioderma januarii*, a common Ophiodermatidae (Echinodermata: Ophiuroidea) in southeastern Brazil. *Zoologia (Curitiba)*, *26*, 118-126.

Brusca, R.C., Moore, W., Shuster, S.M., 2016. Invertebrates, third ed. Sinauer Associates, Massachusetts.

Gondim, A. I., Alonso, C., Dias, T. L., Manso, C. L., & Christoffersen, M. L. (2013). A taxonomic guide to the brittle-stars (Echinodermata, Ophiuroidea) from the State of Paraíba continental shelf, Northeastern Brazil. *ZooKeys*, (307), 45.

Hendler G (1991) Echinodermata: Ophiuroidea. In: Giese AC, Pearse JS, Pearse VB (eds) Reproduction of marine

invertebrates, Vol VI. Echinoderms and lophoporates. Boxwood Press, Pacific Grove, CA, p 355–511

Hendler, G. (1995). Class Ophiuroidea. *Echinoderms of Florida and the Caribbean: sea stars, Sea urchins and allies. Smithsonian Institution Press, Washington*, 89-195.

Lafite, N. F., Christoffersen, M. L., & Gondim, A. I. (2021). Feeding biology of the brittlestar Ophioderma appressum (Say, 1825) (Echinodermata, Ophiuroidea) in a tropical shallow reef from the Brazilian coast. *Marine Biology Research*, *17*(3), 286-294.

R Core Team, 2023

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Stratanenko, E. A., & Denisenko, S. G. (2020). Growth of Stegophiura nodosa (Echinodermata, Ophiuroidea) in the Pechora Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *100*(7), 1129-1133.

Stöhr, S., O'Hara, T. D., & Thuy, B. (2012). Global diversity of brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea). *Plos one*, *7*(3), e31940.

Wickham, H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New
York.

Yokoyama, L. Q., & Amaral, A. C. (2008). The diet of Ophionereis reticulata (Echinodermata: Ophiuroidea) in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, *25*, 576-578.

Sistema colorimétrico para detecção de *Pseudomonas* spp. à base de vesículas de pda e tween 80

Arthur Vinicius de Abreu Oliveira[1], Elizabeth Bárbara Epalanga Pires[1], Letícia Tereza Ferla[1] Ramila Cristiane Rodrigues[2], Taíla Veloso de Oliveira [1], Monique Renon Eller [1]

[1]Departamento de Tecnologia da Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Introdução

A identificação precoce de microrganismos contaminantes e infecciosos é essencial para que medidas de controle sejam tomadas em ambientes industriais e hospitalares. Por exemplo, bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem grande relevância no contexto da contaminação em laticínios e frigoríficos por produzirem enzimas termorresistentes. Esse gênero também abriga espécies como *P. aeruginosa*, um patógeno oportunista e de alta periculosidade a pacientes imunocomprometidos (GERRA et al., 2019). Nesse sentido,

os métodos de detecção utilizados para a tomada de decisão nesses ambientes devem ser rápidos, sensíveis e simples de aplicar, características essas próprias de plataformas colorimétricas (OLIVEIRA et al., 2013).

Nesse contexto, as vesículas de polidiacetileno (PDA) têm sido amplamente estudadas como plataformas transdutoras, uma vez que sua produção é de baixo custo e simples, e podem ser utilizadas em uma variedade de aplicações. Primeiramente, monômeros de diacetileno, como o 10,12-ácido pentacosadinoico (PCDA), são auto-organizados juntamente com um lipídio estrutural, na forma de vesículas. Essas vesículas podem, ainda, ser fusionadas a moléculas sensoras para reconhecimento específico de um analito alvo. A primeira transição colorimétrica dessas vesículas ocorre durante sua produção, via reação de polimerização sob luz ultravioleta (UV), passando do transparente para o azul. Na presença da molécula-alvo ou em caso de alterações físicas no sistema, a suspensão pode mudar de cor, normalmente adquirindo colorações rosa, vermelha ou amarela

(OLIVEIRA et al., 2013), mas podendo ainda adquirir coloração roxa devido à perturbação intermediária na estrutura da cadeia carbônica de polidiacetileno, que causa uma transição do estado eletrônico do sistema. Portanto, essas vesículas podem ser usadas como plataformas transdutoras para biossensores, uma vez que a transição colorimétrica pode ser quantificada e associada à concentração da molécula-alvo na solução. Devido a essas características, vários estudos têm sido desenvolvidos, especialmente na área de embalagens inteligentes e testes diagnósticos. (OLIVEIRA et al., 2015; ZHOU et al., 2022).

As vesículas de PDA podem ser produzidas a partir de diferentes composições lipídicas, responsáveis por compactar a estrutura. Os principais compostos utilizados são dimiristoil-fosfocolina, e a esfingomielina (SPH) em conjunto com colesterol (CHO) (OLIVEIRA et al. 2013). No entanto, esses lipídios podem aumentar significativamente o preço dos sistemas. Portanto, outras substâncias, como os polissorbatos, comercialmente conhecidos como Tween, poderiam ser usadas como uma opção para compor a

membrana, a um custo mais acessível. O Tween 80 é um éster de sorbitano etoxilado e com propriedades anfifílicas, ideais para serem usadas como composto de vesículas (ROLDAN-CRUZ et al. 2016).

No presente estudo, foi realizada a avaliação da produção de vesículas de PDA, juntamente com Tween 80, visando a identificação de *Pseudomonas* spp. Para isso, utilizou-se uma proteína sensora gênero específica previamente padronizada para esse fim (CARVALHAIS, 2019), para o qual foi recentemente pedida a proteção de propriedade intelectual (BR 10 2021 002166 7).

Material e métodos

Vesículas de PDA foram produzidas a partir de monômeros de diacetileno (PCDA) e composições lipídicas pré-estabelecidas (PCDA/Tween 80; PCDA/SPH/CHO) (1mM), adaptado de Pires et al. (2011). As vesículas produzidas foram caracterizadas quanto ao tamanho, pH, carga superficial (potencial Zeta) e índice de polidispersidade. As diferentes composições foram

produzidas de forma independente, ao menos três vezes, e as análises foram realizadas em triplicata. Em seguida, as vesículas produzidas foram associadas à molécula sensora (receptor) (CARVALHAIS, 2019) e a transição de cor foi avaliada pela interação com suspensões de *P. fluorescens* ATCC 13525. A sensibilidade dos sistemas (PCDA/Tween80) produzidos foi avaliada em função da presença das suspensões bacterianas nas concentrações de 10^0 a 10^7 UFC.mL^{-1}. A especificidade do sistema foi avaliada utilizando suspensões contendo 10^6 UFC.mL^{-1} contendo as bactérias *P. aeruginosa* ATCC 25619, *E. coli* ATCC 11229, *Staphylococcus* sp. ATCC 6538, em placa de 96 poços contendo 150 μL de vesículas e 50 μL de células.

A concentração de células nas suspensões foi padronizada a partir da densidade óptica a 600 nm, corrigida para valores de concentração de células por meio de curvas de correlação previamente estabelecidas. Os testes foram realizados em triplicata e a variável resposta foi a mudança de cor, a qual foi avaliada qualitativamente (a olho nu) e quantitativamente por meio da absorbância

das suspensões a 540 nm (vermelho). O custo de produção dos sistemas foi calculado com base na quantidade exigida de cada composto para produção de cada sistema, dividido pelo rendimento (volume gerado x volume utilizado para cada uso).

Resultados

As vesículas de PCDA/Tween80 apresentaram tamanho médio de 345,3 nm, com índice de polidispersividade (PDI) de 0,315, e potencial zeta de -30,1 mV em pH 5,71, enquanto que as vesículas de PCDA/SPH/CHO apresentaram tamanho médio de 239,3 nm, PDI de 0,432, e potencial zeta de -21,1 mV em pH 4.78. As curvas de correlação [DO (y) x Número de células (x)] para quantificação das bactérias *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* foram, respectivamente: $y = 0,0188x + 0,2546$ ($R^2 = 0,7634$); $y = 0,0483x + 0,334$ ($R^2 = 0,932$); $y = 0,0415x + 0,1903$ ($R^2 = 0,9212$); Ambas as vesículas foram seletivas para a identificação de *Pseudomonas* sp. por meio da transição de cor. As vesículas produzidas com Tween 80 alteram a partir de 25 min de

contato com as suspensões bacterianas, adquirindo tons rosa/roxa. Por outro lado, a transição de cor das vesículas produzidas a partir de SPH e COH foi observada em 30 min de contato, adquirindo tons rosa/vermelho. Por outro lado, ambas as vesículas mantiveram sua coloração inicial azul quando em contato com os outros microrganismos, indicando que não houve alteração. A sensibilidade das vesículas, nesse caso, para a detecção de *P. fluorescens* foi de 10^4 UFC.mL^{-1}, conforme imagem abaixo.

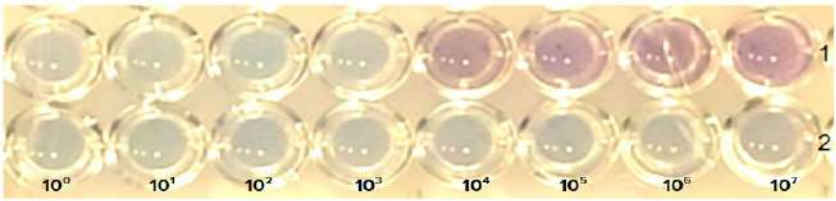


Figura 01: Teste de sensibilidade das vesículas de PCDA/Tween 80 incorporadas com a proteína sensora e adicionadas de suspensões celulares a 10^0 a 10^7 UFC.mL^{-1} de (1) *Pseudomonas fluorescens* e (2) *Escherichia coli* (controle), após 25 min de contato, em temperatura ambiente.

Fonte: Os autores (2023)

Discussão

O índice de polidispersividade das vesículas de PDA, produzidas pela nova metodologia proposta, indica presença de tamanhos de partículas relativamente homogêneos, ao considerar as recomendações feita por Xia et al. (2023) para suspensões com PDI inferior a 0,300. Mais importante, essas suspensões foram mais monodispersas e uniformes do que aquelas produzidas a partir da metodologia padrão. A vantagem sobre a produção das novas vesículas fica ainda mais evidente se considerarmos que o método de produção foi mais prático, rápido e econômico. Nesse caso, aboliu-se a necessidade do uso de reagentes como clorofórmio e, consequentemente, sua retirada do sistema por meio da dispersão de nitrogênio comprimido. Dessa forma, as novas vesículas propostas podem ser produzidas sem a necessidade de equipamentos limitados. O potencial zeta (ζ) é determinado pela interação entre as cargas das partículas coloidais e os íons do meio dispersante, enquanto o pH influencia diretamente na estabilidade e na interação das vesículas com o meio

(OĆWIEJA, 2019). A estabilidade das vesículas pode ser prevista por meio da análise dessas cargas superficiais, que são diretamente correlacionadas ao pH do sistema, e são capazes de promover a repulsão eletrostática do sistema devido a presença de cargas positivas ou negativas na superfície dessas partículas evidenciado pela presença de H+ e OH na dispersão. De tal modo a provocar a ocorrência de agregação e sedimentação.

Ambas as vesículas foram capazes de identificar *Pseudomonas* spp. a partir de uma concentração de 10^4 $UFC.mL^{-1}$ em 25 min de contato. A validação da seletividade, especificidade e sensibilidade foi claramente demonstrada pela ausência de qualquer alteração colorimétrica quando em contato com suspensões contendo as bactérias *E. coli* e *S. aureus.* Dessa forma, é possível, por meio do emprego do sistema colorimétrico desenvolvido, o controle cotidiano da qualidade de produtos em empresas lácteas e cárneas, visto que métodos tradicionais são mais demorados para obtenção do diagnóstico. Estes resultados ressaltam a viabilidade do emprego do sistema baseado em

polidiacetileno (PDA) no desenvolvimento e aplicação de métodos de detecção de microrganismos de forma rápida, econômica e simplificada, sem requerer a expertise de profissionais altamente especializados. Entre os sistemas desenvolvidos, a seletividade foi evidenciada em ambos. No entanto, o sistema composto por PCDA/Tween apresentou melhor desenvoltura e aplicabilidade devido à maior praticidade nas etapas de produção e ao custo reduzido.

Conclusão

O sistema colorimétrico proposto aqui é inovador, construído com base em vesículas de PCDA/Tween80, e demonstrou ter potencial na detecção de *Pseudomonas* sp em até 25 min de contato, de forma específica. Vale destacar ainda que, esse sistema de detecção colorimétrica oferece vantagens em termos de rapidez e praticidade quanto aos tradicionais, além de custos inferiores em comparação com o teste de PCDA/SPH/CHO. No entanto, é crucial realizar estudos mais aprofundados, uma vez que uma maior

sensibilidade pode demonstrar um maior interesse industrial, já que concentrações de 10^4 UFC.mL^{-1} podem apresentar início de deterioração para determinados alimentos.

Referências bibliográficas

CARVALHAIS, J. F. (2019) Detection and control of Pseudomonas using phage and phage protein. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, **Universidade Federal de Viçosa**.

KOH, J. J.; LIU, S.; ZENG. W.; ZOU, H.; WANG, L.; SURESH, V., BEUERMAN, R.; CAO. D.; (2023) Eltectron donating group substituted and α-d-mannopyranoside directly functionalized polydiacetylenes as asimplified bio-sensing system for detection of lectin and *E. coli*. **Sensor and Actuators B**, 178:563-571.

OLIVEIRA, T. V.; SOARES, N. F. F.; SILVA, D. J.; ANDRADE, N. J.; MEDEIROS, E. A. A.; BADARÓ, A.T. (2013) Development of pda/phospholipids/lysine vesicles to detect Pathogenic bactéria. **Sensors and Actuators B**, v. 18, p. 385–392, 2013.

OĆWIEJA, M.; MORGA, M. Electrokinetic properties of cysteine-stabilized silver nanoparticles dispersed in suspensions and deposited on solid surfaces in the form of monolayers. **Electrochimica acta**, v. 297, p. 1000–1010, 2019. doi: 10.1016/j.electacta.2018.11.213.

DE OLIVEIRA, G. B., FAVARIN, L., LUCHESE, R. H., & MCINTOSH, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**,46, 313-321.

MURAKAMI, M.; KAWANO, S.; YAMAMOTO, T.; KATO, T. Vesicles formed by polydiacetylene-based polymers. **Chemical Communications**, v. 55, n. 44, p. 6199-6210, 2019.

PIRES, A. C. dos S.; SOARES, N. de F. F.; SILVA, L. H. M. da; SILVA, M. C. H.; ALMEIDA, M. V. de; HYARIC, M. L.; ANDRADE, N. J. de; SOARES, R. F.; MAGESTE, A. B.; REIS, S. G. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria, **Sensors and Actuators B: Chemical,** v. 153, p. 17-23, 2011. doi:10.1016/j.snb.2010.09.069

ROLDAN-CRUZ, C.; VERNON-CARTER, E. J.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Assessing the stability of Tween 80-based O/W emulsions with cyclic voltammetry and electrical impedance spectroscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 511, p. 145–152, 20 dez. 2016.

ZHOU, J., DUAN, M., HUANG, D., SHAO, H., ZHOU, Y., & FAN, Y. (2022). Label-free visible colorimetric biosensor for detection of multiple pathogenic bacteria based on engineered polydiacetylene liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, 606, 1684–1694. doi:10.1016/j.jcis.2021.07.155

Xia, J., Sun, X., Jia, P., Li, L., Xu, K., Cao, Y., Lu, X. & Wang, L. (2023). Multifunctional sustainable films of bacterial cellulose nanocrystal-based, three-phase pickering nanoemulsions: A promising active food packaging for cheese. **Chemical Engineering Journal**, *466*, 143295. https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143295.

Agradecimentos:

Este trabalho só foi possível graças ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por meio do código de financiamento 001. Os autores também agradecem ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos que contribuiu significativamente para a realização deste trabalho.

Desenvolvimento de Formulação Vacinal Oral com Nanopartículas de PLGA

Vinícius dos Santos Romagnoli[1,2], Renato Lima Senra[1,2], Wyver Moreira Gonçalves[1,2], Carlos Daniel Oliveira Silva[1,2], Tiago Antônio de Oliveira Mendes[1,2]

[1]Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Introdução

A tecnologia no desenvolvimento de vacinas tem evoluído rapidamente nos últimos anos, intimamente ligado ao avanço nas técnicas de manipulação de macromoléculas e organismos vivos (BRISSE et al., 2020; MINOR, 2015). Um dos pontos críticos nesse desenvolvimento e produção de novas vacinas está relacionado à forma de entrega do antígeno de interesse, sendo as principais formas de administração das formulações a via intramuscular, subcutânea e oral (ZHANG; WANG; WANG, 2015). Cada

forma de administração apresenta vantagens e desvantagens, que dependem de alguns fatores, como natureza da formulação, facilidade e segurança. Nesse sentido, a vacinação por via oral tem ganhado espaço no mercado de produção de vacinas humano e veterinário (CREIGHTON; WOODROW, 2019). A vacinação oral apresenta vários desafios em relação à estabilidade e eficácia do candidato vacinal, devido ao grande número de obstáculos encontrados no trato gastrointestinal, como presença de diversas proteases, muco e variações bruscas de pH (VELA RAMIREZ; SHARPE; PEPPAS, 2017). O contato do antígeno vacinal administrado com diversos tipos de moléculas e condições pode diminuir sua efetividade, fazendo-se necessário o desenvolvimento de mecanismos de proteção ao antígeno para aumento de estabilidade, como utilização de nanopartículas de polímeros resistentes aos fatores descritos (AMIN; BOATENG, 2023). Nanopartículas são cápsulas com dimensão variando entre 2nm até 10μm, formadas de polímeros que apresentam natureza hidrofóbica e

capacidade de envolver o antígeno de interesse, aumentando sua estabilidade (ALLAHYARI; MOHIT, 2016). Nesse sentido, o PLGA (Poli (ácido lático-co-ácido glicólico)) se mostra uma opção relativamente fácil e barata de se utilizar, além de ser eficiente na estabilização da formulação vacinal (AMIN; BOATENG, 2023; GU et al., 2019). O PLGA funciona como protetor para o antígeno vacinal por ser resistente ao suco gástrico. Sua natureza ácida faz com que, em contato com o pH ácido estomacal, permaneça protonado e com a estrutura intacta. Assim que entra em contato com o pH alcalino do intestino delgado, a partícula se ioniza a partir de uma reação ácido-base, formando sal solúvel em água e liberando o antígeno de interesse (DING; ZHU, 2018). Além de utilizado como sistema de entrega, o PLGA também apresenta função de adjuvante quando associado com antígeno vacinal, aumentando resposta humoral e celular, em especial Th1, com aumento de endocitose por células apresentadoras de antígeno (GU et al., 2020). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho é desenvolver uma formulação vacinal

composta de proteína recombinante quimérica nanoencapsulada em polímero PLGA para teste de controle de infecção por *Brachyspira spp.*

Material e métodos

Para expressar o antígeno quimérico contra *Brachyspira spp*, 10µL do estoque do clone positivo foram pré-inoculados em 50mL de meio de cultura *Luria Bertani* (LB) líquido contendo 1mg/mL de Canamicina e incubadas overnight a 37°C sob agitação de 180rpm. Após o crescimento, as culturas foram inoculadas em frasco erlenmeyer contendo 2000mL de meio LB líquido (Canamicina 1mg/mL) e cultivadas até densidade óptica (OD 600nm) de 0,5-0,6 a 37°C sob agitação de 180rpm. Após atingir a OD desejada, a expressão proteica foi induzida com a adição de 1mM de IPTG por 3 horas a 37°C sob agitação a 180rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 13000 rpm, 10 minutos a 4ºC e em seguida armazenada a -80ºC. O pellet obtido após a centrifugação foi ressuspendido em 100mL de tampão de ligação (20mM $NaHPO_4$, 500mM

NaCl e 20mM imidazol, pH 7.6). Posteriormente, o conteúdo ressuspendido foi sonicado em banho de gelo por 10 minutos, a 60% de amplitude, para lise celular. Após a etapa de sonicação, o conteúdo foi centrifugado a 14000rpm, 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, correspondente à fração solúvel, foi coletado e armazenado a 4ºC. O pellet, correspondente à fração insolúvel, foi ressuspendido com tampão de ligação (20mM $NaHPO_4$, 500mM NaCl e 20mM imidazol, pH 7.6), adicionado de ureia 8M. Para confirmação da expressão e purificação do antígeno quimérico, foi realizada uma análise por Western Blotting, utilizando anticorpo específico contra cauda de histidina presente na estrutura da proteína. O antígeno quimérico foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel e quantificado utilizando o método colorimétrico de Bradford. O preparo da nanopartícula de Poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) com o antígeno quimérico foi baseada em método de dupla emulsão. A primeira solução foi composta de PLGA com diclorometano e homogeneizada com vórtex em

velocidade máxima por 5 minutos. A essa solução, foi adicionado o antígeno, com concentração de 0,2mg/mL. A primeira emulsificação foi realizada em banho ultrassônico a 4ºC (Sonicator Sonics Vibra Cell VC-505) em amplitude e potência máximos por 5 minutos de pulso contínuo. Após a formação da primeira emulsão, foi adicionada solução aquosa de álcool polivinílico (PVA), a uma concentração de 1% e misturado em vórtex com velocidade máxima por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a segunda emulsificação em banho ultrassônico a 4ºC em amplitude e potência máximos por 10 minutos. Posteriormente à emulsificação, a solução foi colocada sob agitação em agitador magnético por 2 horas para evaporação do solvente orgânico, utilizando velocidade máxima. As nanopartículas de PLGA formadas foram submetidas a três ciclos centrifugação (14000rpm, 4ºC) e redispersão em água destilada. Para análise da formação e dispersão das nanopartículas, utilizou-se o método de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para análise de carga superficial das nanopartículas, foi utilizada a avaliação de potencial zeta. Para análise de

eficiência de encapsulamento, foi realizado o DLS para verificar a formação das nanopartículas em conjunto com o método de Bradford, para quantificação do antígeno não-encapsulado. O teste de estabilidade da formulação foi realizado armazenando doses individuais nas temperaturas de 4ºC e 42ºC por duas semanas. As nanopartículas foram rompidas utilizando uma simulação do sistema gastrointestinal, utilizando uma variação de pH entre 2 e 10. A proteína recuperada foi quantificada e analisada por SDS-PAGE para análise de integridade proteica.

Resultados

A expressão da proteína de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e Western Blotting. Das frações analisadas, a fração insolúvel foi selecionada para purificação por cromatografia de afinidade. As alíquotas resultantes da purificação foram agrupadas em um *pool* e quantificadas pelo método de Bradford. A concentração da proteína purificada foi de

0,2mg/mL, com rendimento final de 2mg/L de inóculo. Com essa proteína purificada, foi realizada a produção das nanopartículas de PLGA. Após análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS), pode-se comprovar a formação da nanopartícula pela formação dos gráficos de dimensão. As análises foram realizadas em triplicatas técnicas, representadas pelas curvas de diferentes cores. O tamanho médio das triplicatas, pelo volume e pela intensidade, foram similares, permanecendo em torno de 4,0μm. O desvio-padrão baixo entre as triplicatas indica uma padronização do método de encapsulamento em relação ao tamanho das partículas, com baixa variabilidade de dimensão no mesmo lote de produção. A análise de potencial zeta indicou uma carga de -13,6mV, com desvio-padrão de 5,26. Calculando a área sob a curva do gráfico de dimensão da análise por DLS, obteve-se uma eficiência de encapsulamento do antígeno de 93,1%, com os outros 6,9% sendo cápsulas vazias. Quantificando a proteína livre presente na formulação com as nanopartículas pelo método de Bradford, a concentração foi de 0,039mg/mL. Subtraindo

o total de antígeno utilizado na produção das nanopartículas pelo total de proteína livre, obtém-se uma eficiência de 80,5% de encapsulamento pelo método colorimétrico. A proteína quantificada após a simulação de digestão por variação de pH apresentou valor similar à proteína utilizada para a síntese das nanopartículas, indicando eficiência do método. O teste de estabilidade da formulação em diferentes temperaturas indicou a manutenção da proteína íntegra no período realizado, sem diferenças entre as duas temperaturas testadas. O teste deverá ser conduzido por períodos maiores de tempo para determinação de um prazo máximo de utilização da formulação vacinal.

Discussão

A expressão do antígeno proposto e seu encapsulamento utilizando nanopartículas de PLGA desenvolvido apresentam potencial para escalonamento devido ao rendimento, alta taxa de eficiência, facilidade metodológica e baixo custo de manutenção. Isso exige poucas adequações

do método para a produção em larga escala na indústria, com a finalidade comercial. Em relação ao tamanho das nanopartículas, estudos relatam uma variação de dimensão ótima entre 250nm e 10μm para utilização como entrega de medicamentos e antígenos vacinais (ALLAHYARI, 2016; AMIN; BOATENG, 2023; SHIPUNOVA et al., 2021; WANG et al., 2021). Nesse sentido, a partícula desenvolvida apresenta um padrão de tamanho dentro do esperado para ser utilizada como um *delivery* de antígeno vacinal por via oral. A tendência é que, com esse padrão de dimensão, a partícula apresente uma vantagem de resistir mais tempo no trato gastrointestinal, devido sua, proporcionalmente, menor superfície de contato. Isso facilitaria a entrega do antígeno a porções mais distais do intestino (ALLAHYARI, 2016). Para corroborar essa hipótese, estudos *in vivo* com diferentes tamanhos de partícula devem ser realizados. O potencial zeta negativo também é consistente com dados de estudos prévios. A carga negativa na partícula apresenta a desvantagem de dificultar o encapsulamento de determinadas proteínas de interesse, diminuindo a

eficiência (GU et al., 2019; KIM et al., 2017). No caso do presente estudo, a carga negativa da superfície da partícula de PLGA formada não interferiu na taxa de eficiência de encapsulamento, mantendo-a acima de 80% nos dois métodos utilizados para sua determinação, o que aumenta a exposição farmacocinética no organismo (BUTREDDY et al., 2021). Em relação à estabilidade da nanopartícula de PLGA sintetizada, a mesma apresentou resistência às diferentes temperaturas testadas, confirmado pela integridade do antígeno proteico em gel de poliacrilamida e no padrão de dispersão das nanopartículas. Esse resultado corrobora com dados da literatura sobre a estabilidade desse tipo de nanopartícula entre as temperaturas de 4ºC e 42ºC (ANDHARIYA et al., 2019). Outros testes de estabilidade devem ser realizados por um período maior de tempo e em outras condições ambientais, como outras temperaturas e diferentes faixas de pH.

Conclusão

A metodologia de nanoencapsulamento de antígeno vacinal proteico com PLGA desenvolvida apresenta vantagens, como alta taxa de eficiência no encapsulamento e alta estabilidade em temperaturas de estresse, além de exercer uma função de adjuvante quando administrado por via oral. Também apresenta potencial de escalabilidade para desenvolvimento de produtos comerciais, devido ao baixo custo e facilidade no processo de fabricação.

Palavras-chave: Nanopartícula; Poli (ácido lático-co-ácido glicólico); Antígeno vacinal.

Agradecimento: Agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências bibliográficas

ALLAHYARI, M.; MOHIT, E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. **Human Vaccines**

and Immunotherapeutics, v. 12, n. 3, p. 806–828, 3 mar. 2016.

AMIN, M. K.; BOATENG, J. Surface functionalization of PLGA nanoparticles for potential oral vaccine delivery targeting intestinal immune cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 222, 1 fev. 2023.

ANDHARIYA, J. V. et al. Effect of minor manufacturing changes on stability of compositionally equivalent PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p. 532–540, 20 jul. 2019.

BRISSE, M. et al. Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 583077, 30 set. 2020.

BUTREDDY, A. et al. **Plga/pla-based long-acting injectable depot microspheres in clinical use: Production and characterization overview for protein/peptide**

delivery. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, 2 ago. 2021.

CREIGHTON, R. L.; WOODROW, K. A. Microneedle-Mediated Vaccine Delivery to the Oral Mucosa. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 4, 21 fev. 2019.

DING, D.; ZHU, Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, p. 1041–1060, 1 nov. 2018.

GU, P. et al. Polyethylenimine-coated PLGA nanoparticles-encapsulated Angelica sinensis polysaccharide as an adjuvant to enhance immune responses. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, 1 nov. 2019.

GU, P. et al. Polyethylenimine-coated PLGA nanoparticles-encapsulated Angelica sinensis polysaccharide as an adjuvant for H9N2 vaccine to improve immune responses

in chickens compared to Alum and oil-based adjuvants. **Veterinary Microbiology**, v. 251, 1 dez. 2020.

KIM, S. Y. et al. Synthetic vaccine nanoparticles target to lymph node triggering enhanced innate and adaptive antitumor immunity. **Biomaterials**, v. 130, p. 56–66, 1 jun. 2017.

SHIPUNOVA, V. O. et al. Plga nanoparticles decorated with anti-her2 affibody for targeted delivery and photoinduced cell death. **Molecules**, v. 26, n. 13, 1 jul. 2021.

VELA RAMIREZ, J. E.; SHARPE, L. A.; PEPPAS, N. A. Current state and challenges in developing oral vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 114, p. 116–131, 15 maio 2017.

WANG, W. et al. Improved oral delivery of insulin by PLGA nanoparticles coated with 5β-cholanic acid conjugated glycol chitosan. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 16, n. 6, 1 nov. 2021.

Efeito da exposição subcrônica ao Cloreto de níquel (ii) na morfometria do epidídimo

Isabela Pereira da Silva Bento[1], Luiz Otávio Guimarães-Ervilha[1], Rafael Reis Domingues[1], Tatiana Prata Menezes[1], Mariana Machado-Neves[1]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Introdução

O níquel (Ni) é um elemento naturalmente presente na crosta terrestre. Há relatos de contaminação por Ni em águas subterrâneas e superficiais em vários países, como China e Dinamarca (Rehman et al., 2017). Constantemente estamos expostos ao íon, principalmente através da ingestão, inalação e absorção pela pele (Genchi et al., 2020). Após o contato, o Ni é transportado pelo sangue através da albumina e se acumula principalmente no fígado, rins e testículos, levando a problemas como degeneração hepática (Das et al., 2006), distúrbios renais (Obone et al., 1999), encolhimento dos túbulos seminíferos e redução do número de espermatogônias (Kakela et al., 1999; Pandey et

al., 1999). Estudos têm demonstrado toxicidade reprodutiva do Ni nos sistemas neuroendócrino e gonadal, afetando a função ovariana e testicular (Forgacs et al., 2012; Elangovan et al., 2016). O epidídimo, um órgão essencial no sistema reprodutor masculino, desempenha um papel crucial na aquisição da motilidade progressiva, capacidade fecundante e armazenamento dos espermatozoides (Domenicone et al., 2016). No entanto, os impactos específicos da exposição ao Ni na arquitetura epididimária ainda não está completamente esclarecida. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da exposição crônica ao cloreto de Ni, nas concentrações de 20 e 40 mg kg^{-1}, em parâmetros histomorfométricos epididimários.

Material e métodos

Vinte e quatro ratos Wistar machos, com 70 dias de idade, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram mantidos em condições controladas de fotoperíodo e temperatura, com acesso livre à alimentação e água. A pesquisa foi conduzida de acordo

com os princípios éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética e Utilização de Experimentação Animal da UFV (CEUA; protocolo nº 044/2008). Os ratos foram divididos em três grupos (n=8/grupo): Grupo Controle, que recebeu apenas água; Grupo Ni 20 mg kg^{-1}; e Grupo Ni 40 mg kg^{-1}. Os animais foram expostos oralmente ao Ni na forma de Cloreto de Ni (II) em concentrações de 2,02 g L^{-1} e 4,04 g L^{-1}, respectivamente. Após 60 dias de exposição, os ratos foram pesados e eutanasiados para a coleta dos epidídimos. Os órgãos foram pesados e fixados por 24 horas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2) (Karnovsky, 1965), seccionados em quatro regiões (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda), e processados para análises histomorfométricas. O tecido foi incluído em resina de metacrilato de glicol (Historesin®, Leica; Leica Microsystems, Alemanha). Cortes histológicos (3 μm) foram corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1%. As análises histomorfométricas envolveram a medição de diâmetros dos ductos, altura do epitélio e proporções

volumétricas em diferentes regiões do epidídimo. Foi utilizada uma grade com 266 pontos no software ImageJ para análises dos componentes do ducto. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Student Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

Resultados

Animais expostos a 40 mg kg^{-1} de Ni apresentaram menor peso corporal e peso absoluto do epidídimo que animais controle e expostos a 20 mg kg^{-1} de Ni ($p < 0,05$; Tabela 1).

Ratos expostos a 20 e 40 mg kg^{-1} de Ni apresentaram redução no diâmetro do ducto epididimário e altura do epitélio do segmento inicial ($p < 0,05$; Tabela 2). Na região da cabeça epididimária, animais expostos a 40 mg kg^{-1} de Ni apresentaram menor altura do epitélio que animais controle e expostos a 20 mg kg^{-1} de Ni ($p < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 1: Peso corporal e peso do epidídimo de ratos Wistar controle e expostos com 20 e 40 mg kg^{-1} Ni por 60 dias.

	Controle	20 mg kg^{-1} Ni	40 mg kg^{-1} Ni
Peso corporal (g)	370± 15,28[a]	342,20 ± 54,40[a]	293,50± 31,69[b]
Peso Absoluto do epidídimo (g)	0,62± 0,13[a]	0,56± 0,07[a]	0,46± 0,08[b]
Peso Relativo do epidídimo (g/100g)	0,16±0,03 [a]	0,16±0,00[a]	0,15±0,01[a]

Os valores são expressos como média ± SD. [abc]Letras diferentes na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls**.**

Animais expostos a 20 mg kg^{-1} de Ni apresentaram diâmetros luminais maiores na cauda epididimária que ratos controle e aqueles expostos a 40 mg kg^{-1} de Ni ($p < 0,05$; Tabela 2).

Análises estereológicas indicaram redução no percentual de epitélio e lúmen sem espermatozoides no segmento inicial de animais expostos ao Ni comparados aos seus controles ($p < 0,05$; Tabela 3). Animais exposto a 40 mg kg^{-1}de Ni apresentaram aumento na porcentagem de lúmen

com espermatozoides, comparado aos animais controle e 20mg kg^{-1}($p < 0,05$; Tabela 3).

Tabela 2: Diâmetros dos ductos e luminais (μm) e altura epitelial (μm) em três regiões do epidídimo de ratos Wistar controle e expostos com 20 e 40 mg kg^{-1} Ni por 60 dias.

		Controle	20 mg/kg Ni	40 mg/kg Ni
Segmento inicial	Diâmetro do ducto	195,5 ± 5,6[a]	175,5 ± 7,8[b]	157,1± 22,6[c]
	Diâmetro luminal	118,0 ± 6,7[a]	111,1 ± 7,3[a]	102,1 ± 21,6[a]
	Epitélio altura	40,3 ± 1,8[a]	33,0 ± 2,7[b]	33,6± 2,4[b]
Cabeça	Diâmetro do ducto	360,2 ± 48,2[a]	351,9 ± 41,4[a]	353,5 ± 30,2[a]
	Diâmetro luminal	307,1 ± 42,1[a]	289,5 ± 36,7[a]	267,9 ± 38,5[a]
	Epitélio altura	29,0 ± 4,1[a]	26,6 ± 1,2[a]	23,2 ± 2,0[b]
Cauda	Diâmetro do ducto	341,0 ± 26,9[a]	393,2 ± 92,0[b]	428,0 ± 20,3[b]
	Diâmetro luminal	300,2 ± 27,2[a]	430,0 ± 86,0[b]	345,3 ± 47,0[a]
	Epitélio altura	17,9 ± 0,9[a]	19,5 ± 3,5[a]	19,9 ± 1,4[a]

Os valores são expressos como média ± SD. [abc]Letras diferentes na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls.

Tabela 3: Proporções volumétricas (%) do segmento inicial do ducto do epidídimo de ratos Wistar controle e tratados com 20 e 40 mg kg^{-1} Ni por 60 dias.

	Controle	20 mg kg^{-1} Ni	40 mg kg^{-1} Ni
Epitélio	44,8 ± 7,9 [a]	35,1± 1,0[b]	35,6± 3,8[b]
Lúmen sem espermatozoide	6,6 ± 4,7[a]	1,7± 1,7[b]	1,6± 0,7[b]
Lúmen com espermatozoide	14,3 ± 7,6[a]	23,9 ± 2,4[a]	27,8± 7,5[b]

Os valores são expressos como média ± SD. [ab]Letras diferentes na mesma linha são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Newman Keuls.

Discussão

Estudos anteriores exploraram os efeitos da intoxicação por Ni na histomorfometria testicular (Su et al., 2011; Murawska-Cialowicz et al., 2012; Elangovan et al., 2016; Sun et al., 2016). No entanto, há escassez de pesquisas sobre os efeitos do Ni na histomorfometria do epidídimo. Este estudo mostrou que a exposição subcrônica ao Ni resultou

em alterações na organização do parênquima epididimário, especialmente no segmento inicial e na cabeça. Os resultados indicaram que a exposição a 40 mg kg-1 de Ni levou à diminuição do peso corporal e do peso absoluto do epidídimo após 60 dias. Estudos investigaram a toxicidade do Ni através da exposição oral em distintas doses, cronicidade e formas químicas, resultando em significativa redução no peso corporal (Dieter et al., 1988; Obone et al., 1999; Cempel & Janicka, 2002; Toman et al., 2012). Os pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos masculinos são indicadores para a saúde reprodutiva, uma vez que são influenciados pela estimulação androgênica, mantendo suas funções e morfologia (Mäkelä et al., 2019). A diminuição no peso do epidídimo pode ser atribuída à redução no número de espermatozoides originados nos testículos, alterações séricas de testosterona e estruturais do órgão (Pant et al., 1995). O segmento inicial dos animais expostos ao Ni se mostrou o mais susceptível à contaminação por este metal de transição. No presente estudo, esta região apresentou diminuição na altura do

epitélio e no diâmetro do ducto, que podem estar associados à redução da atividade celular e do volume citoplasmático das células principais, bem como alterações na proporção do lúmen com espermatozoides e do lúmen sem espermatozoides. De fato, Oliveira (2010), analisando o testículo dos animais usados no presente estudo, observou diminuição da produção de espermatozoides em animais expostos ao Ni. A região do segmento inicial é metabolicamente mais ativa, estimulando a funcionalidade das regiões epididimárias seguintes (Santos et al., 2019). O desafio contínuo e prolongado às células epiteliais da região, causado pela exposição ao Ni, pode comprometer as funções do segmento. Considerando a região da cabeça, observamos diminuição da altura do epitélio nos animais expostos a 40 mg kg^{-1}. No entanto, essa alteração não afetou outros parâmetros morfométricos, como lúmen e diâmetro do ducto e proporção dos constituintes do epidídimo. Em animais expostos a 20 mg kg^{-1} de Ni, o aumento do diâmetro do ducto na região da cauda foi provavelmente devido ao aumento do diâmetro luminal.

Conclusão

Pode-se concluir que a administração crônica de Ni, nas doses testadas, provocou alterações morfométricas no epidídimo de ratos Wistar, principalmente na região do segmento inicial. Essas alterações podem prejudicar a maturação dos espermatozoides, interferindo na sua capacidade fecundante, comprometendo assim a fertilidade do indivíduo. Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar quais são os efeitos do Ni no epidídimo, no tempo crônico de exposição, como a avaliação histopatológica e de estresse oxidativo.

Referências bibliográficas

Cempel, M., & Janicka, K. (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biological trace element research*, *90*(1-3), 215–226.

Das, K. K., Gupta, A. D., Dhundasi, S. A., Patil, A. M., Das, S. N., & Ambekar, J. G. (2006). Effect of L-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology in rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, *17*(1), 29–44.

Dieter, M. P., Jameson, C. W., Tucker, A. N., Luster, M. I., French, J. E., Hong, H. L., & Boorman, G. A. (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *Journal of toxicology and environmental health*, *24*(3), 357–372.

Käkelä, R., Käkelä, A., & Hyvärinen, H. (1999). Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, *123*(1), 27–37.

Obone, E., Chakrabarti, S. K., Bai, C., Malick, M. A., Lamontagne, L., & Subramanian, K. S. (1999). Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. *Journal of toxicology and environmental health. 57*(6), 379–401.

Oliveira, M. F. (2010). Efeito da exposição crônica ao níquel nos testículos de ratos Wistar adultos. Viçosa. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.

Pandey, R., Kumar, R., Singh, S. P., Saxena, D. K., & Srivastava, S. P. (1999). Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, *12*(4), 339–346.

Pant, N., Prasad, A. K., Srivastava, S. C., Shankar, R., & Srivastava, S. P. (1995). Effect of oral administration of carbofuran on male reproductive system of rat. *Human & experimental toxicology*, *14*(11), 889–894.

Forgacs et al., 2012 Forgacs, Z., Massányi, P., Lukac, N., & Somosy, Z. (2012). Reproductive toxicology of nickel - review. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, *47*(9), 1249–1260.

Domeniconi, R. F., Souza, A. C., Xu, B., Washington, A. M., & Hinton, B. T. (2016). Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side?. *Biology of reproduction*, *95*(1), 10.

Elangovan, P., Jalaludeen, A. M., Ramakrishnan, R., & Pari, L. (2016). Protective Effect of Troxerutin on Nickel-Induced Testicular Toxicity in Wistar Rats. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, *35*(2), 133–146.

Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human Health and

Environmental Toxicology. *International journal of environmental research and public health*, *17*(3), 679.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. Journal of Cell Biology, 27, 137-138A.

Mäkelä, J. A., Koskenniemi, J. J., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2019). Testis Development. *Endocrine reviews*, *40*(4), 857–905.

Murawska-Ciałowicz, E., Bal, W., Januszewska, L., Zawadzki, M., Rychel, J., & Zuwała-Jagiełło, J. (2012). Oxidative stress level in the testes of mice and rats during nickel intoxication. *TheScientificWorldJournal*, *2012*, 395741.

Rehman, S., Tang, T., Ali, Z., Huang, X., & Hou, Y. (2017).

Integrated Design of MnO_2 @Carbon Hollow Nanoboxes to Synergistically Encapsulate Polysulfides for Empowering

Lithium Sulfur Batteries. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, *13*(20), 10.1002/smll.201700087.

Santos, F. A., da Costa, D. F., da Silva, A. F., Pessoa, R. M. D. S., Figueiredo Rocha, V. C., Olinda, R. G., Dantas, A. F. M., de Melo, M. A., Peña Alfaro, C. E., Azevedo, S. S., & Alves, C. J. (2019). Microbiological, molecular, and histopathological findings in goats experimentally infected with Actinobacillus seminis. *Microbial pathogenesis*, *133*, 103555.

Su, L., Deng, Y., Zhang, Y., Li, C., Zhang, R., Sun, Y., Zhang, K., Li, J., & Yao, S. (2011). Protective effects of grape seed procyanidin extract against nickel sulfate-induced apoptosis and oxidative stress in rat testes. *Toxicology mechanisms and methods*, *21*(6), 487–494.

Sun, H., Wu, W., Guo, J., Xiao, R., Jiang, F., Zheng, L., & Zhang, G. (2016). Effects of nickel exposure on testicular function, oxidative stress, and male reproductive

dysfunction in Spodoptera litura Fabricius. *Chemosphere*, *148*, 178–187.

Toman, R., Massányi, P., Adamkovicova, M., Lukac, N., Cabaj, M., & Martiniakova, M. (2012). Quantitative histological analysis of the mouse testis after the long-term administration of nickel in feed. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, *47*(9), 1272–1279.

Palavras-chave: Segmento inicial, ducto epididimário, níquel

Agradecimentos: Agências de fomento: FAPEMIG, CAPES e CNPQ.

Avaliação da atividade antimicrobiana da nanoestrutura de prata contra microrganismos envolvidos na mastite bovina

Marília Magalhaes Gonçalves[1], Verônica Reinoso[1], Igor José Boggione Santos[1], Jane Selia dos Reis Coimbra[1]

[1]Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Introdução

A mastite bovina é uma ocorrência importante na criação de gado, que promove prejuízos por perda de animais [1] e alterações do leite obtido [2], [3]. A bactéria *Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos principais agentes causadores de doença, mas a adoção de programas de controle deste microrganismo em rebanhos tem levado a aumento de casos causados por patógenos menos comuns, como a *Escherichia coli* [5]. O protocolo para tratamento da mastite envolve a aplicação de antibióticos. Entretanto, seu uso excessivo e generalizado tem levado a um aumento de microrganismos resistentes a estes antimicrobianos [6]. Além disso, os antibióticos podem ser encontrados na forma de

resíduos no leite e nem sempre promovem a cura total do animal [7]. Diante disso, novas alternativas de tratamento são necessárias e as nanoestruturas com atividade antimicrobiana se apresentam como uma opção promissora. Nanoestruturas metálicas têm demonstrado propriedades antimicrobianas e antibiofilmes que se destacam na literatura e já foram aplicadas contra patógenos causadores de mastite, apresentando efeito de diminuição da viabilidade sem toxicidade às glândulas mamárias [8]. Desta forma, este trabalho tem como objetivo verificar a ação antibacteriana da Nanoestrutura de Prata contra *S. aureus* e *E. coli*, microrganismos envolvidos com a mastite bovina, além da possibilidade de sua aplicação em substituição aos agentes de controle utilizados atualmente.

Material e métodos

A síntese das nanoestruturas de prata foi conduzida conforme metodologia de Jana et al. (2001) [9], adaptada por Antunes et al. (2013)[10]. Um fluxo controlado (2,5 $mL.min^{-1}$) de citrato de sódio (1 $mmol.L^{-1}$) foi adicionado, com o

auxílio de uma bomba peristáltica dosadora, a uma solução de nitrato de prata (1 mmol.L^{-1}), sob agitação de 250 rpm, a 25 + 2 ºC. Em seguida foi feita a adição de borohidreto de sódio 4 mmol .L^{-1}, em volume quatro vezes maior do que as outras duas soluções. Após agitação por um minuto, a dispersão foi armazenada sob refrigeração. A caracterização morfológica das nanoestruturas foi feita em trabalho anterior deste grupo de pesquisa, conforme descrito Bianchi et al. (2023) [11]. O raio hidrodinâmico, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta foram determinados utilizando um Zetasiser nano. Também foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana das nanoestruturas foram realizados de acordo com Orellano et al. (2019) [12]. Culturas de *S. aureus* e *E. coli*, crescidas overnight a 37 °C, foram distribuídas em microplacas de 96 poços juntamente com a nanoestrutura de prata em diferentes concentrações. Em cada poço da placa foram colocados 115,0 μL de caldo nutriente e 10,0 μL

de uma das bactérias, água e nanoestruturas conforme esquema abaixo:

Linha A: 0,0μL de nanoestrutura e 75,0 μL de água destilada;

Linha B: 1,0μL de nanoestrutura e 74,0 μL de água destilada;

Linha C: 2,0μL de nanoestrutura e 73,0 μL de água destilada;

Linha D: 4,0μL de nanoestrutura e 71,0 μL de água destilada;

Linha E: 40,0μL de nanoestrutura e 25,0 μL de água destilada;

Linha F: 60,0μL de nanoestrutura e 15,0 μL de água destilada;

Linha G: 75,0μL de nanoestrutura e 0,0 μL de água destilada.

A absorbância do sistema foi lida a 625,0 nm a 37ºC em leitor de microplacas, de hora em hora, durante 50 h. Os resultados foram analisados usando Excel 2010 e software estatístico OriginPro 2016.

Resultados

Conforme verificado por Bianchi et al. (2023) [11], o tamanho da nanoestrutura obtido foi de 20,08 ± 0,17 nm com PDI de 0,321 ± 0,047 e potencial zeta de -31,3 ± 0,7. A Figura 1 mostra a atividade antimicrobiana das nanoestruturas de prata contra *E. coli* (a) e *S. aureus* (b). Observa-se que menores concentrações foram mais eficazes em inibir o crescimento dos dois microrganismos. Para *S. aureus* houve diminuição do crescimento nas concentrações de 0,075 mg. mL^{-1} e 0,15 $mg.mL^{-1}$. Para *E. coli* a diminuição do crescimento ocorreu nas concentrações 0,15 $mg.mL^{-1}$ e 0,3 $mg.mL^{-1}$.

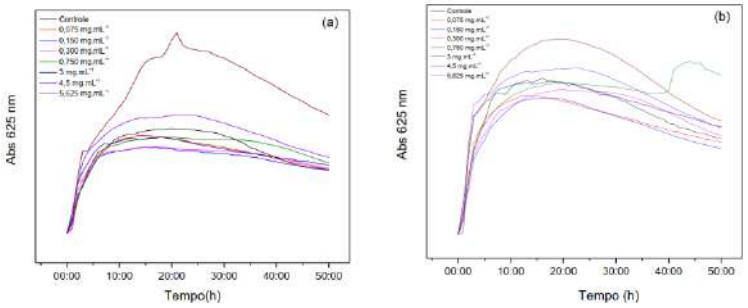


Figura 1. Atividade antimicrobiana das nanopartículas de

prata. Relação entre absorbância (625 nm) × tempo para a bactéria (a) *E. coli* e (b) *S. aureus*

*Concentração de nanopartícula dada em $mg \cdot mL^{-1}$

Discussão

As nanoestruturas apresentam tamanho nanométrico e elevada relação entre área superficial e volume, o que lhes confere propriedades físicas, químicas e/ou biológicas diferentes de quando o material está em dimensão micro ou macroscópica. Desta forma, são mais propensas a entrar nas células do que as partículas maiores, o que pode fazer com que tenham ação mais rápida, específica e possam ser utilizadas em menor quantidade [13]. Entretanto, de acordo com as condições do sistema, pode haver agregação das nanoestruturas, o que dificulta sua entrada na célula. Os resultados obtidos sugerem que isto pode ter ocorrido nas amostras com maiores concentrações de nanoestruturas, sendo que só foi observado inibição do crescimento das bactérias nas amostras em que as nanoestruturas estavam em menor concentração. A inibição do crescimento

microbiano pelas nanoestruturas de prata é atribuída a danos à parede celular e acúmulo da nanoestrutura na membrana [15] além de inativação de enzimas da cadeia respiratória [16]. Os resultados indicam que pequenas quantidades de nanoestruturas são capazes de promover estes efeitos.

Conclusão

As nanoestruturas de prata apresentaram efeito na redução do crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, importantes patógenos relacionados à mastite bovina. Estudos mais aprofundados sobre sua ação e segurança são necessários para que sejam uma possibilidade no tratamento da doença. Além disso, sugere-se estudos futuros sobre a ocorrência de agregação das nanoestruturas para entendimento da mudança de ação com o aumento de concentração.

Palavras -chave: nanotecnologia; atividade antimicrobiana; mastite

Agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Referências bibliográficas

ASHRAF, A.; IMRAN, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical animal health and production,** v. 50, p. 1193-1202, 2018. ISSN 0049-4747.

ORELLANO, M. S. et al. A comparative study of antimicrobial activity of differently-synthesized chitosan nanoparticles against bovine mastitis pathogens. **Soft Matter,** v. 17, n. 3, p. 694-703, 2021.

PRADA E SILVA, L. F. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 37, p. 330-333, 2000. ISSN 1413-9596.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 37, p. 1261-1269, 2017. ISSN 0100-736X.

CATTELL, M. et al. Environmental gram-positive mastitis treatment: in vitro sensitivity and bacteriologic cure. **Journal of dairy science,** v. 84, n. 9, p. 2036-2043, 2001. ISSN 0022-0302.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current microbiology,** v. 72, p. 377-382, 2016. ISSN 0343-8651.

KRÖMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 52, p. 21-29, 2017. ISSN 0936-6768.

KALIŃSKA, A. et al. Silver and copper nanoparticles—an alternative in future mastitis treatment and prevention?

International journal of molecular sciences, v. 20, n. 7, p. 1672, 2019. ISSN 1422-0067.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratioElectronic supplementary information (ESI) available: UV–VIS spectra of silver nanorods. See http://www. rsc. org/suppdata/cc/b1/b100521i. **Chemical Communications**, n. 7, p. 617-618, 2001.

ANTUNES, F. S. et al. Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos. **Estudos Tecnológicos em Engenharia,** v. 9, n. 1, p. 20-6, 2013. ISSN 1808-7310.

DE OLIVEIRA BIANCHI, J. R.; DE SOUZA, S. M.; SANTOS, I. J. B. Post-Harvest Application of Tara Gum Coating Incorporated With Silver Nanoparticles for Preservation of Banana. 2022.

[1]ORELLANO, M. S. et al. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of the native polymer against bovine mastitis pathogens. **Carbohydrate polymers,** v. 213, p. 1-9, 2019. ISSN 0144-8617.

SANKAR, P. New therapeutic strategies to control and treatment of bovine mastitis. **Vet. Med. Open J,** v. 1, n. 2, p. e7-e8, 2016.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and technology of advanced materials**, 2008.

MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. **Research in microbiology,** v. 162, n. 5, p. 542-549, 2011. ISSN 0923-2508.

YUAN, Y.-G.; PENG, Q.-L.; GURUNATHAN, S. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination

therapy for effective cancer treatment. **International journal of nanomedicine**, p. 6487-6502, 2017. ISSN 1176-9114.

Vitanolídeos como inibidores de enzimas alvo para doença de Alzheimer: avaliação *in silico* de propriedades farmacológicas e relação estrutura-atividade

Luana Lucas Dutra[1], Rafael J. Borges[1], Vinícius G. Maltarollo[2], Tiago A. O. Mendes[1], Gustavo C. Bressan[1] & João Paulo V. Leite[1]

[1]Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[2]Departamento de Produtos Farmacêuticos-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Introdução

Vitanolídeos são lactonas esteroidais polioxigenadas encontrados em diversas plantas da família Solanaceae (Chen et al., 2011). Esses produtos naturais formam uma classe estruturalmente diversa responsável por uma gama de atividades biológicas atribuídas a espécies vegetais de interesse medicinal, como a Withania somnifera, planta amplamente usada na medicina tradicional indiana, e outras espécies filogeneticamente próximas a ela (subtribo Withaninae) (Xia et al., 2022). Os vitanolídeos têm a

capacidade de atuar em múltiplos alvos celulares, tornando-os potenciais candidatos para o tratamento de doenças complexas, como a doença de Alzheimer (DA) (Mahrous et al., 2017). A DA é uma patologia associada ao acúmulo de aglomerados insolúveis de beta-amiloide, hiperfosforilação da proteína Tau presente no citoesqueleto, hiperativação de colinesterases e distúrbios nas vias inflamatórias e oxidativas (Du et al., 2018). Extratos de plantas contendo vitanolídeos, bem como esses compostos purificados têm a capacidade de inibir colinesterases, modular o metabolismo de beta-amiloide e também apresentar atividades neuroprotetoras, anti-inflamatórias e antioxidantes (Choudhary et al., 2004; Das et al., 2021; Khan et al., 2016; Kumar et al., 2010; Mahrous et al., 2017; Patil et al., 2010; Sehgal et al., 2012). No entanto, ainda não há aplicação de extratos ricos em vitanolídeos ou mesmo compostos isolados em ensaios clínicos contra a DA. Graças aos avanços tecnológicos no campo da química computacional, é possível estimar propriedades farmacocinéticas relacionadas à absorção, distribuição,

metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), tornando o processo de desenvolvimento de novas drogas mais eficiente e reduzindo as chances de fracasso de uma molécula candidata em etapas avançadas de estudos (Makhoba et al., 2020). No presente estudo, selecionamos 91 vitanolídeos identificados em espécies da subtribo Withaninae e avaliamos suas propriedades relacionadas ao ADMET, a fim de correlacionar as diferentes estruturas com seu potencial farmacocinético. Além disso, investigamos o potencial inibitório dessas moléculas em relação a múltiplos alvos envolvidos na DA por meio de docking e dinâmica molecular. Os resultados reportados neste resumo foram publicados por Dutra et al. (2023).

Material e métodos

Foram selecionados 91 vitanolídeos descritos em espécies vegetais da família Solanaceae, subtribo Withaninae (Almeida et al., 2022; Xia et al., 2022). As moléculas foram divididas em 12 grupos de acordo com a classificação estrutural de vitanolídeos: A: 5β,6β-epóxidos com uma

cadeia lateral em 17β; B: 5-enos com uma cadeia lateral em 17β; C: 5-enos com grupos 16-eno ou 17-eno; D: 6α,7α-epóxidos; E: vitanolídeos intermediários com uma cadeia lateral em 17β; F: vitanolídeos intermediários com uma cadeia lateral em 17α; G: Withaphysalinas; H: Epiacnistinas; I: Withajardinas; J: 14α,20α-epóxidos; K: vitanolídeos 13,17-seco; L: 5β,6β-epóxidos com um grupo em 17(20)-eno e outros tipos. Para a análise de propriedades ADMET, as estruturas dos vitanolídeos selecionados foram submetidas aos servidores online SwissADME (Daina et al., 2017), pkCSM (Pires et al., 2015) e ADMET Lab 2 (Xiong et al., 2021). As propriedades avaliadas por pelo menos dois dos três servidores foram discutidas neste trabalho, com valores consenso, a fim de aumentar a confiabilidade das predições (Pantaleão et al., 2022). Para avaliar a atividade contra a DA, selecionamos os alvos enzimáticos das quatro principais hipóteses que descrevem a causa subjacente da progressão da doença (Ambure et al., 2019): hipótese amiloide (BACE-1; PDB ID 2qp8), hipótese colinérgica (acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterases (BChE);

PDB ID 1eve e 6esj), hipótese da proteína tau (quinase 5 dependente de ciclina (CDK5) e glicogênio sintase 3β (GSK-3β); PDB ID 4au8 e 6hk7) e hipótese do estresse oxidativo (monoamino oxidase B (MAO-B); PDB ID 2v5z). A triagem virtual foi realizada com o software Gold 2021.3 (Liebeschuetz et al., 2012), e a pontuação (score) das poses com melhor classificação de cada complexo foi usada para avaliar o efeito da diversidade estrutural dos vitanolídeos sobre a interação com os alvos. A relação estrutura-propriedades ADMET e os resultados do docking molecular foram analisados por one-way ANOVA, seguida por testes de comparações múltiplas de Tukey (valor-p < 0,05). A estabilidade dos complexos proteína-vitanolídeo gerados na etapa de docking foi avaliada por meio de dinâmica molecular (DM), utilizando o software GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulation) 2020.4 (Abraham et al., 2015) com campos de força CHARMM36 (Huang et al., 2017). Os parâmetros para as simulações foram descritos em detalhes por Dutra et al. (2023). A trajetória gerada foi analisada usando desvios

quadráticos médios (RMSD) usando o C-alfa da proteína (RMSD-proteína) e todos os átomos do ligante (RMSD-ligante) após a sobreposição dos C-alfa da proteína. A afinidade de ligação foi estimada usando o Método de Mecânica Molecular/Superfície Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) (Valdés-Tresanco et al., 2021). As análises mencionadas foram realizadas utilizando funções do GROMACS, e as visualizações foram geradas com o Gnuplot (http://www.gnuplot.info/).

Resultados e discussão

Em geral, os vitanolídeos apresentam propriedades de drug-likeness favoráveis. Cerca de 80% dos vitanolídeos ultrapassam o limite de número de átomos considerado ideal e alguns apresentam peso molecular e polaridade considerados altos. No entanto, quando se tratam de produtos naturais, o parâmetro decisivo para a qualidade como fármaco é a lipofilicidade (logP < 5) (Ganesan, 2008; Zhang & Wilkinson, 2007). O grupo C foi o melhor grupo em relação a parâmetros de drug-likeness, com apenas uma

violação do limite consenso de lipofilicidade (vitanolídeo 52). A maioria dos vitanolídeos foi prevista para ter alta absorção gastro-intestinal (GI), e não houve diferença significativa entre os grupos. Este resultado está em consonância com outros dados publicados in silico e in vitro sobre a absorção GI de vitanolídeos (Baig et al., 2020; Devkar et al., 2015; Khanal et al., 2020). A solubilidade em água diferiu entre os grupos de vitanolídeos e foi considerada moderada-baixa (Figura 1-I). O sistema de liberação transdérmica de medicamentos é uma alternativa à solubilidade em água moderada-baixa, uma vez que todos os grupos apresentaram alta permeabilidade cutânea (log KP < -2,5) (Figura 1-II) (Pires et al., 2015). Quanto aos parâmetros relacionados à distribuição pelo organismo, os grupos apresentaram propriedades semelhantes. A maioria dos vitanolídeos apresentou um valor de VDss baixo a moderado (Figura 1-III), e a fração de concentração de droga não ligada (Fu- do inglês Fraction unbond) dos vitanolídeos de todos os grupos foi ligeiramente diferente entre si, variando entre 0,015-0,362 (Figura 1-IV). Essa

diferença foi maior ao analisar o parâmetro depuração (Figura 1-V), onde o grupo C foi maior do que B, E e H. Com relação à toxicidade, nenhum vitanolídeo foi classificado como potencialmente mutagênico, e apenas três foram previstos como hepatotóxicos (vitanolídeos 12, 13 e 14). Além disso, 68% das moléculas avaliadas foram descritas como improváveis inibidores de canais hERG, e 53% foram classificadas como improváveis de causar sensibilização cutânea. Esses resultados sugerem que os vitanolídeos têm propriedades farmacológicas favoráveis e um perfil de toxicidade promissor que pode orientar trabalhos futuros com base em sua relação estrutural com as propriedades ADMET.

A)

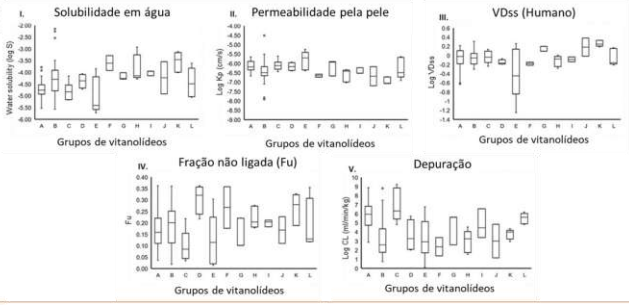


Figura 1: A) Gráficos de *box and whisker* das propriedades relacionadas à ADME de cada grupo de vitanolídeos e B) análise estatística da variação entre os grupos estruturais. A denominação dos grupos de vitanolídeos está detalhada na sessão Materiais e métodos.

B)

Análise ANOVA de propriedades relacionadas a ADME

	Solubilidade em água	Permeabilidade através da pele	VDss	Fu	Clearance
F	2.55	1.89	3.07	2.11	4.69
P value	0.01	0.053	0.0021	0.029	<0.0001
P value resumo	*	-	**	*	****
Diferença sig. entre medias (P <0.05)?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Teste de comparações múltiplas de Tukey	*(AK, EK)	-	*(BE, EG), **(EK)	*(CD)	*(CE, CH), **(AB, BC)

Como observado na Figura 2-A, as colinesterases apresentaram os melhores valores de pontuação com os vitanolídeos. Os valores de pontuação dos vitanolídeos foram inferiores ao ligante original da BACE-1, mas acima de zero, sugerindo que a interação com esse alvo pode ser favorável. Com a CDK5, os grupos H e I tiveram os valores de pontuação mais baixos, mas o ligante experimental foi semelhante aos vitanolídeos. A GSK-3β apresentou menos variação entre os valores de pontuação dos vitanolídeos em comparação com os outros alvos, e dois vitanolídeos (61 e

65) foram melhores do que seu ligante original. Entre os alvos relacionados à DA avaliados, apenas a MAO-B apresentou valores negativos de pontuação, sugerindo ser um alvo potencialmente favorável para a classe de vitanolídeos. O grupo C teve uma das médias de pontuação mais altas entre todos os alvos relacionados à DA (Figura 2-B) e também se destacou como promissor em relação às propriedades relacionadas ao ADMET, o que torna esses vitanolídeos fortes candidatos para medicamentos de múltiplos alvos contra a DA. O vitanolídeo 53 (grupo C) foi escolhido como ligante para as simulações de DM com os alvos mais promissores: AChE, BChE e GSK-3β, que tiveram os valores médios de pontuação de docking mais próximos ao valor de pontuação do ligante experimental. As proteínas permaneceram estáveis durante as simulações, conforme demonstrado por um RMSD abaixo de 3,5 Å (Figura 2-C). Apesar da estabilidade da proteína GSK-3B ter sido mantida ao longo da simulação, a interação com o vitanolídeo 53 não foi mantida, e o ligante saiu do sítio ativo após 200 ns (Figura 2-C-iv). No entanto, o ligante

permaneceu na garganta catalítica das colinesterases, indicando que essas são alvos mais promissores para os vitanolídeos. A afinidade de ligação entre o vitanolídeo 53 e os alvos, medida pelo MM-PBSA, foi favorável e semelhante para ambas as colinesterases. O componente energético que exerceu maior influência na energia total foi a interação van der Waals, especialmente com os resíduos que compõem o triângulo catalítico e o sub-sítio aniônico. Esse modo de interação e o valor de energia de ligação são consistentes com o modelo de previsão de inibição da acetilcolinesterase proposto por Borioni et al. (2020), que estabelece a relação entre o valor previsto de ΔG de ligação por MM-PBSA (ΔGligação) e o valor de IC50 do composto. O vitanolídeo 53 apresentou um valor de IC50 previsto de 1,99 μM (±3,47), sugerindo seu grande potencial como inibidor dessa enzima.

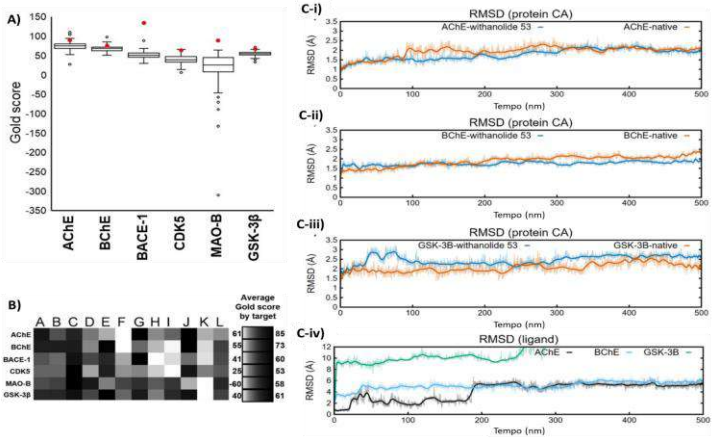


Figura 2- A) Gráfico de box and whisker do score Gold dos vitanolídeos com alvos relacionados à DA. As hastes (whiskers) representam os valores mínimos e máximos do score, e os pontos vermelhos são os valores do score de redocking dos ligantes extraídos do PDB original. B) Heatmap com os valores médios de docking score de cada grupo de vitanolídeos com os seis alvos. C) RMSD do C-alfa das proteínas AChE (C-i), BChE (C-ii) e GSK-3B(C-iii) nativas e ligadas ao vitanolídeo 53; e RMSD do ligante 53 dentro do sítio de interação com cada proteína (C-iv).

Conclusão

Os vitanolídeos apresentam propriedades ADMET favoráveis, com destaque para aqueles do grupo C. Dentre os alvos relacionados à DA, as colinesterases são as mais promissoras para esta classe de produtos naturais. Este estudo fornece uma investigação detalhada sobre as propriedades farmacológicas dos vitanolídeos e suas interações com alvos relacionados à DA e pode guiar futuras pesquisas experimentais.

Palavras-chave: vitanolídeo, doença de Alzheimer, colinesterase

Referências bibliográficas

BORIONI, José L. et al. An activity prediction model for steroidal and triterpenoidal inhibitors of Acetylcholinesterase enzyme. Journal of Computer-Aided Molecular Design, v. 34, p. 1079–1090, 2020.

CHEN, L.-X., HE, H., QIU, F.: Natural withanolides: an overview. Natural product reports, v. 28, n. 4, p. 705–740, 2011.

DAS, R., RAUF, A., AKHTER, S., ISLAM, M.N., EMRAN, T.B., MITRA, S., KHAN, I.N., MUBARAK, M.S.: Role of withaferin a and its derivatives in the management of alzheimer's disease: Recent trends and future perspectives. Molecules, v. 26, n. 12, p. 3696, 2021.

DU, X., WANG, X., GENG, M.: Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. Translational neurodegeneration, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.

DUTRA, Luana L. et al. In silico evaluation of pharmacokinetics properties of withanolides and simulation of their biological activities against Alzheimer's disease. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2023, p. 1-16.

KHAN, A. S., KHAN, S. B., SHAH, Z., M ASIRI, A.: Withanolides: biologically active constituents in the treatment of alzheimer's disease. Medicinal Chemistry, v. 12, n. 3, p. 238–256, 2016.

KUMAR, S., SEAL, C.J., HOWES, M., KITE, G.C., OKELLO, E.J.: In vitro protective effects of withania somnifera (l.) dunal root extract against hydrogen peroxide and β-amyloid (1–42)-induced cytotoxicity in differentiated pc12

cells. Phytotherapy Research, v. 24, n. 10, p. 1567–1574, 2010.

MAHROUS, R., GHAREEB, D.A., FATHY, H.M., EL-KHAIR, R.M.A., OMAR, A.A.: The protective effect of egyptian withania somnifera against alzheimer's. Med. Aromat Plants, v. 6, n. 285, p. 2167–0412, 2017.

PATIL, S.P., MAKI, S., KHEDKAR, S.A., RIGBY, A.C., CHAN, C.: Withanolide a and asiatic acid modulate multiple targets associated with amyloid-β precursor protein processing and amyloid-β protein clearance. Journal of natural products, v. 73, n. 7, p. 1196–1202, 2010.

SEHGAL, N., GUPTA, A., VALLI, R.K., JOSHI, S.D., MILLS, J.T., HAMEL, E., KHANNA, P., JAIN, S.C., THAKUR, S.S., RAVINDRANATH, V.: Withania somnifera reverses alzheimer's disease pathology by enhancing low-density lipoprotein receptor-related protein in liver. Proceedings of

the National Academy of Sciences, v. 109, n. 9, p. 3510–3515, 2012.

XIA, G.-Y., CAO, S.-J., CHEN, L.-X., QIU, F.: Natural withanolides, an update. Natural Product Reports, 2022.

CAPÍTULO 4- RESUMOS EXPANDIDOS EM INGLÊS

A histopathological assessment of gills in fish collected downstream from the Eustáquio and Santo Antônio Dams, in the Municipality of Paracatu, MG.

Filipe Silveira Azevedo[1], Allan Rodrigues Pires[1], Caroline Tomaz Massardi[1], Silvânia Mol Pelinsari[1], Reggiani Vilela Gonçalves[2], Mariella Bontempo Duca de Freitas[2]

[1]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
[2]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Introduction

Due to the use and disposal of various organic and inorganic substances for mining, industrial, and agricultural activities, both humans and wildlife are exposed to several compounds that can compromise the

health of cells and tissues, impairing their functionality. Aquifers, in particular, receive a significant amount of these substances, which accumulate in rivers, lakes, streams, and can affect the health of wild fish populations, as well as the quality of fish for human consumption (Polignano et al., 2020). Various environmental pollutants, such as pesticides and heavy metals, induce an increase in the production of free radicals and reactive oxygen species (ROS), highly reactive molecules that, if not counteracted by the antioxidant defense systems of individuals, can cause irreversible cellular damage. In fish, these pollutants can accumulate in tissues (Lunardelli et al., 2018) and affect their growth and reproduction due to damage to target organs such as gonads, gills, liver, and spleen. These organs are crucial as they are the primary metabolizers of toxic substances in the organism, and an imbalance in these systems can result in irreversible damage to the organisms.

To counteract the damage caused by pathogenic agents present in water bodies, fish have developed various physiological mechanisms that assist them in maintaining

body homeostasis. These mechanisms can be monitored through cellular and tissue markers such as antioxidant enzymes and histopathological changes, which indicate whether there is any environmental impact on the organs and tissues of these animals.

The presence of inflammation in tissues, hemorrhages, ischemia, and degenerative processes can be indicative of moderate injury, which may eventually progress to irreversible changes in cell nuclei, thereby disrupting cellular homeostasis and potentially leading to cell death through apoptosis or necrosis, compromising the function of organs and tissues (Sanjeev et al., 2019). As a consequence, these changes promote the accumulation of substances within cells, in locations that do not normally store them (degenerations), and/or cell death characterized by the presence of pyknotic nuclei (chromatin condensation), nuclear fragmentation (karyorrhexis), and absence of the nucleus (karyolysis), leading to cell death through necrosis or apoptosis. Thus, the analysis of these cellular and tissue alterations can indicate the quality of the

environment in which fish are immersed and, in this way, allow for the assessment of potential environmental impacts (De la Torre et al., 2007).

In this project, our objective is to characterize a baseline regarding the wild fish population present in the watersheds near the two largest dams in Brazil, Eustáquio and Santo Antônio, in the city of Paracatu, MG. This baseline will serve as a reference for future environmental impact assessments in the event of dam breaches. The goal is to depict the environmental situation before a disaster scenario, which will be used as a basis for the qualitative and quantitative evaluation of impacts and to guide mitigation, reversal, and compensation actions for any damage.

Material and methods

Different fish species inhabiting the Paracatu River watershed in the city of Paracatu, Minas Gerais, were collected at 15 different sites near the Eustáquio and Santo Antônio dams. Out of these sites, 5 were grouped as areas

not affected by the dams, referred to as reference areas (AR), and 10 were grouped as areas potentially affected and influenced by the dams (ADA/AI). Each site covered approximately 1 square kilometer. Twenty gill nets, each measuring 10 square meters, with mesh sizes ranging from 15 mm to 80 mm in length, were set up. The gill nets were deployed at sunset and retrieved the following morning at noon. After collection, the specimens were euthanized with Eugenol® at a concentration of 1500 μl/L, identified, weighed, measured biometrically, ventrally incised, and stored intact in Bouin's fixative for histopathological analysis of the gills to ensure proper preservation.

After 24 hours of fixation, the specimens were stored in 70% ethanol. The gills were removed from all animals, separated, and identified according to each locality. The gills were grouped by locality and subjected to progressive dehydration in ethanol (80%, 90%, and 100%) and embedded in glycol methacrylate (Historesin®, Leica) for material inclusion. After embedding, the materials were affixed to wooden blocks for the preparation of semi-serial

sections with a thickness of 3 μm using a rotary microtome (RM2265 – LEICA). To avoid the repeated analysis of tissue constituents, semi-serial sections were performed, taking advantage of every tenth cut. Toluidine Blue staining was performed on the gills, and the following histopathological alterations were assessed: lamellar and interlamellar hyperplasia, deletion of secondary lamellar epithelium, lamellar fusion, epithelial detachment, aneurysms, and central venous sinus dilation. The visualization of the slides and image capture were performed using the BX-60® light microscope (Olympus, São Paulo, Brazil) coupled with a digital camera model QColor-3® (Olympus, São Paulo, Brazil). For each slide, 60 images were obtained randomly per sample group. The images were captured with a resolution of 2048 x 1536 pixels using a 40X objective. Image analysis was performed using a grid of 300 intersections, with pathology counted per intersection, and was assisted by the Image Pro-Plus 4.5 image analysis software (Media Cybernetics®, Silver Spring, USA). Response variables were log-transformed

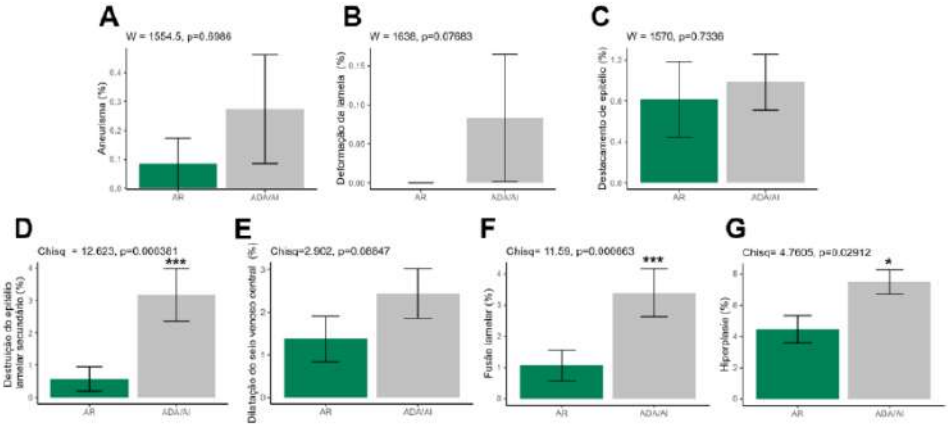
when necessary to reduce residual asymmetry. All statistical models were executed in R (R Core Team, 2022). To evaluate the histopathological data, one-way ANOVAs were fitted using mixed effects when needed, employing the glmmTMB package (Mollie et al., 2017).

Results

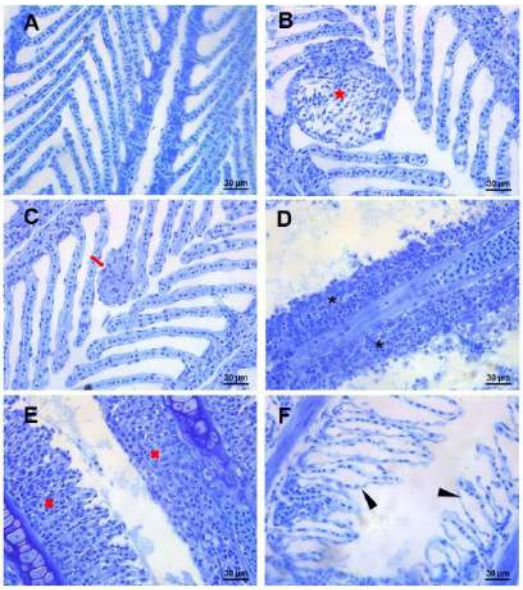
A total of 113 specimens from 6 different species were collected, including Astyanax bimaculatus, *Psalidodon fasciatus, Orthospinus franciscensis, Moenkhausia costae, Tetranonopterus chaulceus, Bryconops affinis,* and *Cyphocharax gilbert*. Of the total individuals collected, 34 individuals are from AR and were collected at 5 different sites, while the remaining 79 were collected at 10 different sites in ADA/AI. The number of individuals collected per region varied according to randomness and capture chance, which explains the differences in the number of individuals (N) at each sampled point.

The most frequently observed histopathologies in the gills of the animals were secondary lamellar detachment (1-3%),

central venous sinus dilation (1-2%), lamellar fusion (1-3%), hyperplasia (4-7%), and destruction of the secondary lamellar epithelium (4-7%). However, in the observed proportions, these alterations are considered transient, and their incidences are expected in wild fish populations. Even considering that all sampled areas (ADA/AI and AR) do not exhibit alterations related to direct impacts from dam breaches, the two areas were compared to assess the health of the animals downstream from the dam and in areas free from any direct influence of the dam on the river course. Thus, there was an increase in the total destruction of the secondary lamellar epithelium, fusion of secondary lamellae, and hyperplasia of secondary lamellae in the AAI/AD areas when compared to the RA areas. No significant differences were found between the areas in relation to aneurysms, epithelial detachment, lamellar deformation, and central venous sinus dilation.



Percentage of histopathologies found in the gills of fish in reference areas (AR) and areas directly affected and influenced (ADA/AI)''. (A) aneurysms; (B) lamellar deformities; (C) epithelial detachment; (D) destroyed secondary lamellar epithelia; (E) dilated central venous sinuses; (F) lamellar fusions; (G) hyperplasias. Graphs generated by predicted values within the GLMM model (histopathological damage) ~(Area)+(1|Site)). Significant effect ($p < 0.05$) represented by * and highly significant effect ($p < 0.001$) represented by ***.



Images taken through the 40x objective representing the histopathologies found in the gills. In (A), normal gills from reference areas (RA) can be observed; (B) Gill aneurysm indicated by the red star; (C) Hyperplasia indicated by the red arrow; (D) Deletion of the secondary lamellar epithelium, indicated by an asterisk; (E) Fusion of secondary lamellae, indicated by the red "X"; (F) Epithelial detachment from the lamellae indicated by the arrowheads in areas directly affected and influenced (ADA/AI).

Discussion

The gills are the first organs to come into contact with pollutants and are highly sensitive to this exposure due to their constant interaction with the external environment. The gill epithelia are easily modified when exposed to contaminants, making them excellent indicators for assessing environmental impacts. This respiratory membrane is related to gas and ion exchange facilitated by the cells of the secondary lamellae during osmoregulation in fish (Alesci et al., 2022). The increased hyperplasia in the gills of fish from the AAI/AI suggests that this area is somehow more affected by pollutants, as the increase in secondary lamellar epithelium is a physiological strategy to prevent contaminants from having easy access to the bloodstream, constituting one of the initial defense mechanisms of this tissue (Mustafa, 2020). Consequently, hyperplasia increases the fusions occurring in the lamellae since they grow in size, leading to their cells becoming adhered and fused, further hindering the passage of contaminants into the rest of the organs. Fish of the species

Astyanax bimaculatus, collected in rivers contaminated with mercury and cadmium in Colombia, also exhibited hyperplasia of their secondary lamellae, resulting in lamellar fusion, as well as aneurysms that led to the destruction of the lamellar epithelium (Corredor-Santamaría et al., 2019). Other fish of the genus *Astyanax*, collected in the Doce River in Mariana, MG, a region contaminated with metals such as lead, cadmium, nickel, and copper, also displayed these histopathological gill alterations (Macêdo et al., 2020). Furthermore, other pollutants can cause these gill alterations since they also appear in the AR and must be considered for the baseline characterization regarding environmental impact markers at the sampled sites.

Conclusion

We conclude that the species collected in the areas downstream from the Eustáquio and Santo Antônio dams in the municipality of Paracatu, MG, did not exhibit severe

contamination that would pose tissue damage threatening the health of the sampled animals.

Keywords: Dam, histopathology, fish

References

Alesci, A., Cicero, N., Fumia, A., Petrarca, C., Mangifesta, R., Nava, V., Lauriano, E. R. Histological and chemical analysis of heavy metals in kidney and gills of boops boops: melanomacrophages centers and rodlet cells as environmental biomarkers. Toxics 10(5): 218, 2022. https://doi.org/10.3390/toxics10050218.

Corredor-Santamaría, W., Torres-Tabares, A., Velasco-Santamaría, Y. M. Biochemical and histological alterations in Aequidens metae (Pisces, Cichlidae) and Astyanax gr. bimaculatus (Pisces, Characidae) as indicators of river pollution. Science of The Total Environment 692: 1234-1241, 2019. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.187

De la Torre, F.R., Salibián, A., Ferrari, L. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of freshwater fish. Chemosphere (68): 1582-1590, 2007. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.033

Lunardelli, B., Cabral, M. T., Vieira, C. E., Oliveira, L. F., Risso, W. E., Meletti, P. C. Martinez, C. *B. Chromium* accumulation and biomarker responses in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* caged in a river under the influence of tannery activities. Ecotoxicology and environmental safety 153: 188-194, 2018.

Macêdo, A. K. S., Dos Santos, K. P. E., Brighenti, L. S., Windmöller, C. C., Barbosa, F. A. R., de Azambuja Ribeiro, R. I. M., Thomé, R. G. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris Lütken*, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. Science of the Total Environment 735: 139505, 2020

Mollie E. Brooks, Kasper Kristensen, Koen J. van Benthem, Arni Magnusson, Casper W. Berg, Anders Nielsen, Hans J. Skaug, Martin Maechler and Benjamin M. Bolker. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. The R Journal 9(2): 378-400, 2017.

Mustafa, S. A. Histopathology and heavy metal bioaccumulation in some tissues of *Luciobarbus xanthopterus* collected from Tigris River of Baghdad, Iraq. The Egyptian Journal of Aquatic Research 46(2): 123-129, 2020. https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.01.004

Polignano, M. V., Lemos, R. S. Rompimento da barragem da Vale em Brumadinho: impactos socioambientais na Bacia do Rio Paraopeba. Ciência e Cultura 72(2): 37-43, 2020. http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602020000200011.

Sanjeev, S., Bidanchi, R. M., Murthy, M. K., Gurusubramanian, G., & Roy, V. K. Influence of ferulic acid consumption in ameliorating the cadmium-induced liver

and renal oxidative damage in rats. Environmental Science and Pollution Research 26(20): 20631-20653, 2019. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05420-7.

Funding organizations: CAPES, CNPQ.

Maclura Tinctoria (l.) modulates the expression of morphological components, accelerating the closure of cutaneous wounds in balb/c mice

Allan Rodrigues Pires[1], Filipe Silveira Azevedo[1], Manoela Maciel dos Santos Dias[2], Silvânia Mol Penlisari[1], Caroline Tomaz Massardi[1], Reggiani Vilela Gonçalves[2]

[1]Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil
[2]Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Introduction

Healing is a tissue repair process that encompasses a series of physiological events [1] stimulating both intra and extracellular mechanisms [2, 3], ultimately replacing damaged structures and restoring the integrity of the injured tissue [3]. This dynamic and complex repair system is divided into three phases that can overlap: inflammation,

proliferation, and remodeling [2]. While there have been significant advancements in the development of new drugs for skin wound treatment, there is an increasing interest in natural products, such as plants and minerals, that may hold therapeutic potential in aiding the healing process [4]. In this context, it is worth noting that *Maclura tinctoria (L.) D. Don ex Steudel*, commonly referred as 'taiúva' or 'moreira,' is a species extensively utilized in folk medicine, particularly for its anti-inflammatory, wound-healing, analgesic, and antirheumatic properties [5]. Preliminary studies using different parts of *Maclura tinctoria* (*M. tinctoria*) have elucidated some of the medicinal properties of this species. Chemical analyses of extracts derived from the bark have revealed the isolation and identification of phenolic compounds, including flavones, flavonols, and isoflavones, some of which possess antifungal, anti-HIV, antioxidant, antimalarial, and antimicrobial activities [6] Therefore, considering the significant findings regarding the investigated biological activities, this study aimed to evaluate the effect of two concentrations of the

dichloromethane leaf extract of *M. tinctoria* on its potential to stimulate the synthesis of collagen fibers during the healing of second-intention wounds in Balb/c mice.

Material and methods

M. tinctoria leaves were harvest from an Atlantic Forest area within the jurisdiction of the Federal University of Viçosa (UFV). Subsequently, the collected samples underwent authentication at the UFV VIC Herbarium, being assigned the VIC 40,269 number. Subsequently, the leaves were dried in a 40°C oven for 48 hours, followed by a maceration process with a dry plant-to-solvent ratio of 1:5 (w/v). The procedure employed for the exhaustive extraction of active substances involved serial percolation and lyophilization. The dry extract was stored at -20°C and protected from light. The solvent used was dichloromethane, resulting in the dichloromethane extract of *M. tinctoria.* To formulate the ointments, concentrations of 2.5% and 5% of *M. tinctoria* extract were used, both using a hydrophilic ointment base

consisting of a blend of polyethylene glycol (Macrogol) and propylene glycol.

For the in vivo experiments, male Balb/c mice (n=56) were obtained from the Central Animal Facility at the Federal University of Viçosa. All procedures received approval from the Ethics Committee for Animal Use at the Federal University of Viçosa (protocol number 15/2021). Initially, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) [4]. Then, the animals were shaved on the dorsal portion, and 70% ethanol was applied for antisepsis. Subsequently, using forceps to lift the skin and prevent damage to the muscle tissue, a surgical excision of approximately 10 mm in diameter was made with the assistance of a scalpel until the dorsal muscular fascia was exposed. Following this, four groups were established: Group S (control): saline solution; Group V (vehicle control): ointment vehicle; Group M1 (treatment): 2.5% *M. tinctoria* extract ointment; and Group M2 (treatment): 5.0% *M. tinctoria* extract ointment. Each group consisted of 14 animals chosen

randomly. The wounds were cleaned with saline solution, and the treatments were applied daily for 15 days. At the end of 8 days of treatment, half of the animals in each group (n=7) had the scar tissue collected and were subsequently euthanized. After 15 days of treatment, scar tissue was removed from the remaining animals (n=7). The skin fragments collected were separated for histological analysis.

To assess wound area and contraction rate, photographs of the wounds on the animals were taken on the days when tissue samples were extracted. Thus, digitized images were analyzed at three different time points: F0 - the moment when the wound was made, F1 - 8 days after the wound, and F2 - 15 days after the wound. To measure the wound area, the Image J software version 1.42q with the computerized planimetry method was used [3]. The wound contraction rate was calculated based on the results obtained from the wound area calculation, using the following formula: $\frac{(A0)-(AI)}{(A0)} \times 100$, with (A0) representing

the initial wound area and (AI) denoting the wound area observed on a specific day [3].

For histological analysis, tissue samples were obtained from all animals in the chronological groups of F0 - intact skin, F1 - tissue 8 days post-wounding, and F2 - tissue 15 days post-wounding. The collected tissue fragments were stored in buffered 10% formalin solution. Later, they underwent dehydration with ethanol, clearing with xylene, and embedding in paraffin. Following this, the paraffin blocks containing tissue fragments were cut into 4 μm sections using a rotary microtome (Leica Multicut 2045®, Reichert-Jung products, Jena, Germany). After slide preparation, the sections were stained using a 0.1% solution of Sirius Red F3BA, in a saturated aqueous picric acid solution, in order to identify and differentiate collagen fibers (Sirius Red F3B, Mobay Chemical Co., Union, NJ, USA). Type I collagen fibers appeared red, while type III collagen fibers appeared green under polarization. After staining, the slides were observed using an optical microscope equipped with a polarizing filter, connected to

a digital camera (Olympus QColor 3®). Ten images were captured from different histological areas on each slide for collagen analysis in the tissue. All photographs were examined using the Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). With a grid containing 300 points overlaid on the images, the counting of points on type I collagen fibers and type III collagen fibers was performed. Thus, it was possible to calculate the volumetric density (Vv) using the formula: $Vv = \frac{PP}{PT} \times 100$, where PP is the number of counted points and PT is the total number of points on the grid [3].

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif., USA). All collected data underwent repeated measures analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. This approach included the use of a 95% confidence interval around the mean, represented through a comparative graph, to identify the treatment group that exhibited notable distinctions from the others.

Results

Animals in the M1 group, treated with 2.5% M. tinctoria extract ointment, demonstrated a smaller wound area on the 8th day compared to the other groups. On the 14th day, this group also exhibited a reduced wound area compared to the control groups (S group and V group). Consequently, the M1 group displayed a higher contraction rate on the 8th day when compared to the other groups, as well as on the 14th day when compared to the control groups. The progression of the wound closure process in each group can be observed in Figure 1.

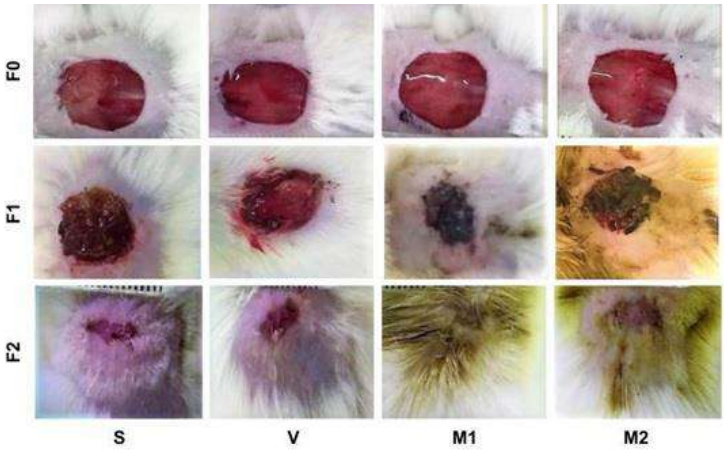


Figure 1 - Representation of second-intention wounds illustrating the development of cutaneous repair over the course of treatment time. S: Saline; V: ointment vehicle; M1: Ointment with 2.5% *M. tinctoria*; M2: Ointment with 5.0%. *M. tinctoria* F0 - moment when the wound was made, F1 and F2 - 8 and 15 days after the wound, respectively.

In the analyses regarding the quantity of collagen fibers, it was noted that on the 8th day, the M1 group exhibited a higher amount of type I collagen compared to the other groups, and the M2 group showed a greater quantity than the V group (Figure 2A). On the 15th day, it was observed that both the M1 and M2 groups had a higher amount of type I collagen when compared to the control groups (S and V) (Figure 2A). As for type III collagen, it was noted that on the 8th day, the quantity was greater in the M1 group compared to the control groups (S and V) (Figure 2B). Representative photographs illustrating the amount of collagen present in the various groups throughout the healing process can be observed in Figure 3.

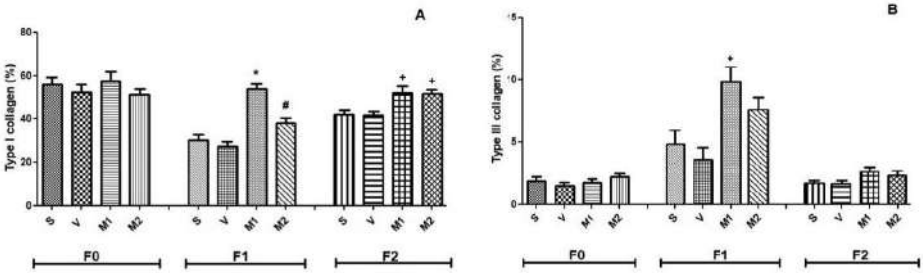


Figure 2 - Volumetric density (Vv) of type I collagen (A) and volumetric density (Vv) of type III collagen (B). S: Saline; V: ointment vehicle; M1: Ointment with 2.5% *M. tinctoria*; M2: Ointment with 5.0% *M. tinctoria*. F0 - intact skin, F1 and F2 - scar tissue 8 and 15 days after the wound, respectively. *, +, # represent the statistical difference between groups ($p \leq 0.05$); * compared to S, V, and M2; + compared to S and V; # compared to V.

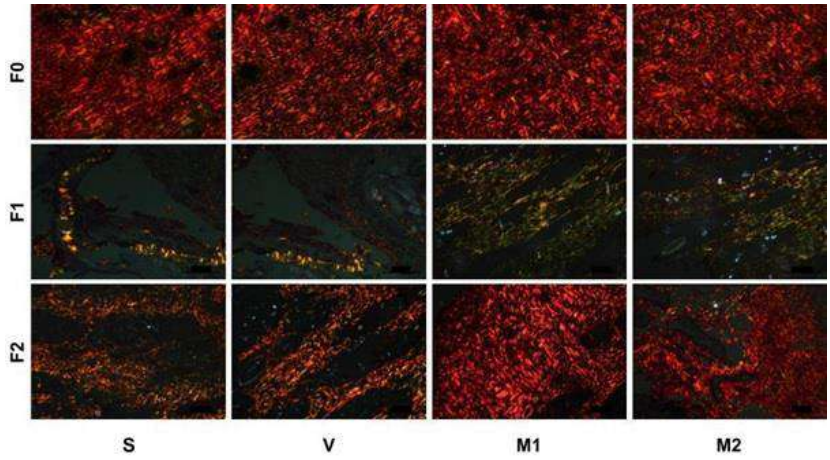


Figure 3 - Representation of volumetric collagen density, illustrating the amount of collagen present in the healing process for each treatment. Red fibers (type I collagen); green fibers (type III collagen). S: Saline; V: ointment vehicle; M1: Ointment with 2.5% *M. tinctoria*; M2: Ointment with 5.0% *M. tinctoria*. F0 - intact skin, F1 and F2 - scar tissue 8 and 15 days after the wound, respectively.

Discussion

In recent years, the demand for natural products for medicinal purposes has grown significantly, not only in Brazil but worldwide. In this regard, our study investigated

the effects of the ointment based on *Maclura tinctoria* extract on the wound healing process in mice.

The ointment formulated with *M. tinctoria* extract demonstrated effectiveness in treating skin wounds in mice, especially at a concentration of 2.5%, resulting in reduced wound area and enhanced wound contraction rate. The increase in the wound contraction rate, which is inversely proportional to the wound area, was reported by Sarandy et al. (2017) in a study using extract from the bark of *Strychnos peseudoquina,* an extract rich in phenolic compounds, including quercetin flavonoids. Furthermore, treatments with *Maclura tinctoria* leaf extract stimulated an increase in the synthesis of type I and type III collagen, which are important components of the extracellular matrix (ECM). Gonçalves et al. (2014) and Sarandy et al. (2015) also similarly used collagen volumetric density as a parameter to assess the efficacy of *Bathysa cuspidata* and *Brassica oleracea* extracts, respectively, in the wound healing process in the skin of rats [2,3].

Conclusion

Our results indicate that the ointment based on dichloromethane extract from *Maclura tinctoria* leaves proved to be effective in promoting rapid cutaneous tissue repair. Thus, our studies have shed light on the significance of this extract in stimulating collagen synthesis, especially at a concentration of 2.5%. Furthermore, further research on the active components present in this plant are needed to fully elucidate its mechanism of action.

Keywords: Maclura tinctoria; Wound healing; Balb/c mice

References

[1] MANDELBAUM, S. H., DI SANTIS, É. P., & MANDELBAUM, M. H. S. (2003). *Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I.* ***Anais Brasileiros de Dermatologia****, 78(4), 393–408.*

[2] SARANDY, M. M., NOVAES, R. D., DA MATTA, S. L. P., MEZENCIO, J. M. DA S., DA SILVA, M. B., ZANUNCIO,

J. C., & GONÇALVES, R. V. (2015). *Ointment of Brassica oleracea var.capitata Matures the Extracellular Matrix in Skin Wounds of Wistar Rats.* ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine****, 2015, 1–9.*

[3] GONÇALVES, R. V., NOVAES, R. D., CUPERTINO, M. C., ARAÚJO, B. M., VILELA, E. F., MACHADO, A. T., … MATTA, S. L. P. (2014). *Bathysa cuspidata Extract Modulates the Morphological Reorganization of the Scar Tissue and Accelerates Skin Wound Healing in Rats: A Time-Dependent Study.* ***Cells Tissues Organs****, 199(4), 266–277.*

[4] MOURA, SANDRA APARECIDA LIMA DE. *Development of experimental model for study of the cicatrization process for second intention of cutaneous wounds in rabbits, using extracts of the green propolis from Minas Gerais-Brazil*. 2004. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças; Epidemiologia e controle de qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

[5] SILVA, A.F.M. et al. *As plantas medicinais mais utilizadas em saúde bucal pela comunidade de Firminópolis - GO.* Universidade Federal de Goiás. 2009. Trabalho de conclusão de curso da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. 2009.

[6] LAMOUNIER, k. C., CUNHA, l. C. S., DE MORAIS, S. A. L., DE AQUINO, F. J. T., CHANG, R., DO NASCIMENTO, E. A., DE SOUZA, M. G. M., MARTINS, C. H. G., CUNHA, W. R. "Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.", ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,** vol. 2012, Article ID 451039, 7 pages, 2012.

The authors thank CAPES and CNPQ for the financial support.

Development of a low-cost platform for production of biotechnological interest glycoproteins using *Leishmania tarentolae*

Renato Lima Senra[1], Luana Maria Pacheco Schittino[1], Andrea de Oliveira Barros Ribon[1], Jacqueline Araújo Fiuza[2], Juliana Lopes Rangel Fietto[1], Tiago Antônio de Oliveira Mendes[1]

[1] Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV, MG, Brasil.

[2] Instituto René Rachou, ou Fiocruz Minas, MG, Brasil

INTRODUCTION

An organism with the potential to express recombinant proteins must efficiently yield substantial quantities of proteins in a cost-effective manner, while also offering scalability to an industrial level and a straightforward product purification process (Gerngross, 2004). Currently, the most promising systems for large-scale cultivation,

providing high product yields within a short production period, are based on bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Pichia pastoris*, now known as *Komagataella phaffii*). However, these systems have limitations when it comes to producing humanized and mammalian glycoproteins. Bacteria lack the ability to perform glycosylation, and yeasts, while possessing components of the glycosylation machinery, produce glycans distinct from those in other eukaryotes, including mammals. This presents an issue because proteins requiring glycosylation or specific post-translational patterns found in mammals tend to exhibit reduced biological activity and stability when produced in these organisms. Additionally, both systems may generate improperly folded proteins with impaired functionality. In contrast, insect and mammalian cells display glycosylation and folding patterns similar to those of human proteins. However, their large-scale cultivation presents challenges because of extended cultivation periods and suboptimal protein productivity (Gräslund et al., 2008; Gerngross, 2004; Rabert et al., 2013; Berger, Kaup and Blanchard, 2012;

Palomares, Estrada-Mondaca and Ramírez, 2004). *Leishmania tarentolae* is a trypanosomatid protozoan that is non-pathogenic to humans and other mammals. It has gained recognition as a novel system for the heterologous expression of various proteins, including viral proteins and glycosylated proteins. The genome of *L. tarentolae* has been fully sequenced (Raymond et al., 2012), and this organism possesses the machinery required for several post-translational protein modifications, exhibiting post-translational modification patterns that closely resemble those found in mammalian cells (Breitling et al., 2002; Raymond et al., 2012). While the glycosylation profile of proteins expressed in *L. tarentolae* is similar to that of mammals, some distinctions exist in the carbohydrate structure at the termini of glycan chains. These distinctions arise from the absence of certain biosynthetic enzymes and the incorporation of sialic acid. As an alternative, the expression of trans-sialidase from Trypanosoma species or glycosyltransferases has been proposed to produce human-like sialylated glycoproteins (Klatt, et al. 2019). Interferon-

beta (IFN-β) is a glycoprotein of significant therapeutic importance, utilized in the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune inflammatory diseases. It possesses various activities, including anti-inflammatory, antiproliferative, antiviral, and immunomodulatory effects (Goldenberg, 2012). In terms of enhancing pharmacokinetic properties, glycosylation leads to an extension of IFN-β's half-life compared to the non-glycosylated form. This is attributed to the increased hydrodynamic volume resulting from the carbohydrate groups attached to the polypeptide chain, which reduces renal elimination (Gerngross, 2004). Consequently, the need for frequent protein administration to patients via injection is diminished, while the stability and duration of the protein's presence in the human body are prolonged. Furthermore, it is suggested that the degree of sialylation serves as an additional mechanism under biological conditions to modulate IFN-β's bioactivity (Mastrangeli, et al. 2019). Justified by the substantial demand, significant production expenses, and the health implications associated with IFNB, we have developed a

cost-effective expression platform utilizing a genetically optimized strain of *L. tarentolae* to achieve humanized glycosylation for large-scale glycoprotein synthesis, including the incorporation of sialic acid. The accurate synthesis facilitated by this improved expression platform holds the potential to yield more efficacious humanized glycoproteins for therapeutic use. This, in turn, can enhance patient well-being by reducing both dosage requirements and adverse effects, while also cutting down production costs.

MATERIAL AND METHODS

Metabolite extraction was performed with samples containing $5x10^8$ parasites using the methanol/chloroform/water method (Teng et al., 2009). The NMR spectra were obtained in a Bruker DRX400 equipment (Bruker, Billerica, USA) of 9.4 T (400.13 MHz for hydrogen frequency), 303 K, and equipped with a 5 mm inverse detection probe. The list of chemical displacement and signal intensity was generated and used as an input file

for the NMR_based Search tool implemented in the *Madison Metabolomics Consortium Database* of metabolites (CUI et al., 2008). This program allows for the identification of the existing metabolites by comparing the chemical displacements present in the sample reading with chemical displacement data of reference compounds deposited in the database. Protein sequences involved in the biosynthesis of *N*-glycans were recovered from KEGG database (Kanehisa, 2002). Sequences were contrasted with the proteins encoded in the *L. taretolae* genome present in the TritrypDB version 35 database (Aslett et al., 2010). Blastp tool was used to compare *H. sapiens* proteins against the predicted proteome of *L. tarentolae*. (Oliveira, et al. 2019). *L. tarentolae* promastigotes (LEXSY host P10, Jena Bioscience) were cultured at 26 ºC, in the dark, using Brain Heart Infusion (LEXSY Broth BHI, 37g/L) medium supplemented with 10 mg/mL Hemin (Sigma), 10000 unit/mL penicillin (Sigma) and 10 mg/mL streptomycin (Sigma). The culture was performed primarily in tissue culture flasks until getting the density of cells and posteriorly incubated in Erlenmeyer

flasks under agitation. Expression plasmids pLEXSY-egfp-SAT2 (Cat. No. EGE-235) and pLEXSY-Neo2 (Cat. No. EGE-233) and antibiotics were purchased from Jena Bioscience (Jena, Germany). Sequence codons of the Human Sialyl Transferase (HST) retrieved from NCBI ID NP_001257388.1 and human IFN-β gene retrieved from NCBI ID AGJ84699.1 were optimized for *Leishmania donovani* using Integrated Data Technologies Codon Optimization Tool (IDT CodonOpt). Both genes were chemically synthetized (IDT, Coralville, USA) and cloned into pGEM-T (Promega, Fitchburg, USA). These vectors were used as templates for cloning into pLEXSY plasmids. HST was cloned into the *Bgl*II/*NotI* site of pLEXSY-egfp-SAT2 and IFN-β was cloned into the *XbaI*/*KpnI* site of pLEXSY-Neo2 with a C-terminal his-tag and an N-terminal signal sequence from the gene for secreted acid phosphatase (LMSAP) of *Leishmania mexicana* to the desired secreted proteins expression. Three recombinant strains were obtained by clonal selection: with the HST gene, IFN-β, and with both genes. The growth rate of transfected cells cultures was measured and compared

to mock controls. Leishmanias were seeded in triplicate at an initial concentration of 10^5 cells/mL and optical density at 600 nm was assessed daily during 8 days. In addition, genomic integration was evaluated by PCR amplifying genomic DNA. Expression of HST e IFN-β in each recombinant cell was confirmed by Fluorescence microscopy, SDS-PAGE and Western blot. For protein expression, *L. tarentolae* strains were grown under agitation in Erlenmeyer flasks containing 100 mL of BHI medium supplemented with hemin. The supernatants were loaded on a 5-mL HisTrap Crude FF column (GE Healthcare, München, Germany) on an ÄKTA-start system (GE Healthcare). Fractions were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing the protein IFN-β at the expected molecular size and evaluated by western blot were pooled. Glycans were conjugated with 2-amino benzamidine (2AB) (36) and analyzed in Ultraflex II MALDI-TOF/TOF-MS (Bruker Daltonics, Alemna) equipment. This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Federal University of Minas

Gerais, Brazil (CEUA/UFMG Protocol 216/2017) and performed according to the guidelines set by the Brazilian Animal Experimental College (COBEA). *In vivo* IFN-β anti-inflamatory activity assay was perfomed using splenocytes and immunomodulatory cytokines were measured after incubation with LPS. The data were analyzed using FlowJo software and a FACS Fortessa flow cytometer (both from Becton Dickinson, San Jose, CA).

RESULTS

Analyzes using the approaches of the genome annotation of proteins involved in glycosylation metabolism and Blastp sequence alignment tool resulted in the identification of a group of proteins present in *N*-glycan metabolism in the predicted *L. tarentolae* proteome corresponding to the same ones found in humans, with the exception of human sialyltransferase (HST). As the last enzyme in the process of formation of *N*-glycosylated proteins, HST has the function of catalyzing the addition of sialic acid at the end of the sugar chain. The function of

some of these *Leishmania* proteins in the *N*-glycosylation process was also double-validated by the recognition of specific protein domains after submission of the sequences to the protein family database, Pfam (Oliveira, et al., 2019). The NMR approach detected metabolites present in *L. tarentolae* and relate them to potential metabolic pathways associated with *N*-glycosylation. After the analysis carried out in the genomics approach, in which we evaluated the genes that encode the enzymes present in the *N*-glycan biosynthesis pathway in humans and whether they were present in *L. tarentolae*, we observed the absence of the HST that adds a sialic acid to the end of the glycidic chain of glycoproteins. For the design of the sequences to the expression of target proteins, used the two different strategies, cytosolic expression for HST and secreted expression for INF-β. Genomic PCR reactions were used to verify the insertion of the expression cassette of the IFN-β gene in the gene locus of cells transfected with linearized constructions. The immunofluorescence result confirmed that the HST protein was intracellularly expressed in *L.*

tarentolae cells. The growth curves indicated that the strains expressing heterologous proteins do not present different growth compared to the control group (Wt with the potential to produce high yields of recombinant protein. Four types of IFN-β were analyzed in SDS-PAGE and Western Blot: IFN-β produced using *E. coli* system, produced in *L. tarentolae* wild and optimized strains and the commercially obtained IFN-β (Avonex©, CHO). The IFN-β produced from *L. tarentolae* cells were purified from the culture supernatant using nickel affinity chromatography on an ÄKTA-start system (GE Healthcare). Fractions were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing the protein IFN-beta at the expected molecular size and evaluated by western blot were pooled and applied again on a comparative gel with other IFN-beta molecules from other expression systems. The IFN-β produced in CHO could not be observed in the Western blot assay, as it was obtained commercially and does not have a histidine tag. The molecular weight difference was attributed to additional glycosylation. The nonglycosylated form (*E. coli*)

had a weight of approximately 20 kDa corresponding only to the protein chain. The upper bands corresponding to glycosylated forms obtained from *L. tarentole* had a weight of approximately 25 kDa. The weight observed in IFN-β produced in CHO suggests intermediary glycosylation. The observed molar masses on the spectrum obtained in LC/MS analysis from glycans extracted from proteins of *L. tarentolae* cells suggest the expected theoretical masses of the glycosylation. The differences in mass of the most abundant ions among the strains of *L. tarentolae Wt* and HST-optimized demonstrate a difference in the pattern of glycosylation of these cells. To assess the potential immunomodulatory effects of INF-β produced in *L. tarentolae* cells, *in vitro* analysis was performed in two incubation times (24h and 48h) comparing these molecules with the proteins control, non-glycosylated (*E. coli*) and glycosylated (Avonex®). Primarily subsets of lymphocytes proliferation were evaluated. The percentages of $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$ splenocytes were determined by FACS. The contents of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes did not

significant difference between the tested IFN-β, which has a direct relationship with the response to inflammation induced by LPS. Intracellular cytokines are important effectors of the inflammatory response. At 24 h of incubation, we evaluated whether LPS induction increases levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN-γ, IFN-β produced by *L. tarentolae* HST-optimized decreases the secretion of these cytokines. In all the cytokines tested (except IL-4), expression levels with a significant difference were observed between the optimized IFN-β and the others molecules tested (with the exception of IL-10 in $CD8^+$ cells, where it differed only with bacterial IFN-β).

DISCUSSION

The main purpose of this work was to establish a glycoprotein expression platform that is more accessible and capable of producing proteins with biochemical and pharmacokinetic properties that resembles the organism of origin by using *L. tarentolae*. This organism has been widely studied as an alternative to other expression systems,

becoming an easier, cheaper, and relatively more efficient means in the production of therapeutic glycoproteins. As the glycosylation process in *L. tarentolae* still presents some doubts (Breitling, et. al, 2002), we chose to use the comparative genomics methodology as an attempt to elucidate points not yet discussed in the process of biosynthesis of glycoproteins in these organisms. Based on our genomic analyses, we developed the first strategy through the heterologous expression of the enzyme HST, for general an optimized lineage capable of performing syalization. There are different methods used for metabolite analyses, including mass spectrometry, chromatographic methods, and nuclear magnetic resonance (NMR). All cloning steps, as well as confirmatory tests, showed satisfactory results demonstrating the efficiency of the LEXSY expression method. We confirmed intracellular HST expression by immunofluorescence and secreted production of IFN-β in *L. tarentolae* strains by SDS-PAGE and Western Blot. Moreover, no negative effects on the growth of recombinant strains were observed. By mass

spectrometry analysis, it was possible to recognize a difference in the pattern of glycosylation in the glycoproteins produced by the optimized system. We show here that human recombinant IFN-β produced in *L. tarentolae* HST-optimized cells is *N*-glycosylated and shows differential anti-inflammatory effect confirmed by FACS analysis and levels cytokine-induced observed in mouse splenocytes. In the presence of a pro-inflammatory stimulus, such as bacterial LPS, IFN-β HST-optimized decreases the secretion of inflammatory cytokines (Bolívar, et. al, 2018). These results are in accordance with the antiviral nature of IFN-β and its pharmacological use (Lazear, et. al, 2018). In addition, the triggered anti-inflammatory profile may be associated with improvements in the prognostics of individuals affected by cancer and multiple sclerosis (Jakimovski, et. al, 2018).

Conclusion

The use of IFN-β in this study is highlighted both for its importance as a drug, as it is used in the treatment of

serious diseases, and for the economic impact generated in public and private health systems due to high demand and high production cost. Optimized *L. tarentolae* presented a viable source of therapeutic glycoprotein production, producing recombinant protein with a higher yield than mammalian cells and with a cultivation method adapted to industrial structures already available for bacteria and yeast. Furthermore, the biological activity is similar to the commercial product produced in mammalian cells and superior to other production technologies frequently used to produce recombinants, including bacteria and yeast.

Keywords: Leishmania tarentolae, glycoproteins, heterologous expression, sialylation.

Acknowledgement: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

REFERENCES

Aslett,M., Aurrecoechea,C., Berriman,M., Brestelli,J., Brunk,B.P., Carrington,M., Depledge,D.P., Fischer,S.,

Gajria,B., Gao,X., *et al*. (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res*, **38**, D457-62.

Baghban Roghayyeh, Farajnia Safar*, Ghasemi Younes, Mortazavi Mojtaba, Zarghami Nosratollah and Samadi Naser (2018) New Developments in Pichia pastoris Expression System, Review and Update, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 19(6).

Barreto-Bergter,E., Beatriz Vermelho,A. (2010) Structures of glycolipids found in trypanosomatids: contribution to parasite functions. *The Open Parasitology Journal*, 4.

Basile,G. and Peticca,M. (2009) Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae. *Mol Biotechnol*, **43**, 273-278.

Berger,M., Kaup,M. and Blanchard,V. (2012) Protein glycosylation and its impact on biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **127**, 165-185.

Bigge,J.C., Patel,T.P., Bruce,J.A., Goulding,P.N., Charles,S.M. and Parekh,R.B. (1995) Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem,* **230**, 229-238.

Bolívar,S., Anfossi,R., Humeres,C., Vivar,R., Boza,P., Muñoz,C., Pardo-Jimenez,V., Olivares-Silva,F. and Díaz-Araya,G. (2018) IFN-β Plays Both Pro- and Anti-inflammatory Roles in the Rat Cardiac Fibroblast Through Differential STAT Protein Activation. *Front Pharmacol,* **9**, 1368.

Bondt,A., Rombouts,Y., Selman,M.H., Hensbergen,P.J., Reiding,K.R., Hazes,J.M., Dolhain,R.J. and Wuhrer,M. (2014) Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics,* **13**, 3029-3039.

Borden,E.C. (2019) Interferons α and β in cancer: therapeutic opportunities from new insights. *Nat Rev Drug Discov*, **18**, 219-234.

Breitling,R., Klingner,S., Callewaert,N., Pietrucha,R., Geyer,A., Ehrlich,G., Hartung,R., Müller,A., Contreras,R., Beverley,S.M., *et al.* (2002) Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif*, **25**, 209-218.

Cui,Q., Lewis,I.A., Hegeman,A.D., Anderson,M.E., Li,J., Schulte,C.F., Westler,W.M., Eghbalnia,H.R., Sussman,M.R. and Markley,J.L. (2008) Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol*, **26**, 162-164.

Dissing-Olesen,L., Thaysen-Andersen,M., Meldgaard,M., Højrup,P. and Finsen,B. (2008) The function of the human interferon-beta 1a glycan determined in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, **326**, 338-347.

Ferguson,M.A. (1997) The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **352**, 1295-1302.

Gerngross,T.U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol,* **22**, 1409-1414.

Goldenberg,M.M. (2012) Multiple sclerosis review. *P T,* **37**, 175-184.

Gräslund,S., Nordlund,P., Weigelt,J., Hallberg,B.M., Bray,J., Gileadi,O., Knapp,S., Oppermann,U., Arrowsmith,C., Hui,R.*, et al.* (2008) Protein production and purification. *Nat Methods,* **5**, 135-146.

Jakimovski,D., Kolb,C., Ramanathan,M., Zivadinov,R. and Weinstock-Guttman,B. (2018) Interferon β for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med,* **8**, a032003.

Kanehisa,M. (2002) The KEGG database. *Novartis Found Symp*, **247**, 91-101; discussion 101-3, 119-28, 244-52.

Klatt S, Simpson L, Maslov DA, Konthur Z (2019) *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **13**(7), e0007424.

Klatt,S. and Konthur,Z. (2012) Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in Leishmania tarentolae. *Microb Cell Fact*, **11**, 97.

Lazear,H.M., Schoggins,J.W. and Diamond,M.S. (2019) Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, **50**, 907-923.

Lewis IA, Schommer SC, Markley JL. (2009)rNMR: open source software for identifying and quantifying metabolites in NMR spectra. *Magn Reson Chem*. **47** Suppl 1(S1):S123-6.

Lim, J. F., Berger, H., & Su, I. H. (2016). Isolation and Activation of Murine Lymphocytes. *Journal of visualized experiments*, **116**, 54596.

Mastrangeli,R., Rossi,M., Mascia,M., Palinsky,W., Datola,A., Terlizzese,M. and Bierau,H. (2015) In vitro biological characterization of IFN-β-1a major glycoforms. *Glycobiology,* **25**, 21-29.

Oliveira, T.A., Silva, W., Torres, N. R., Moraes, J.V.B., Senra, R. L., Mendes, T. A. O., Júnior A. S., Bressan, G.C., Fietto, J. L. R. (2019). Application of the LEXSY Leishmania tarentolae system as a recombinant protein expression platform: A review, *Process Biochemistry*, **87**,164-17

Palomares,L.A., Estrada-Mondaca,S. and Ramírez,O.T. (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol,* **267**, 15-52.

Rabert,C., Weinacker,D., Pessoa,A. and Farías,J.G. (2013) Recombinants proteins for industrial uses: utilization of Pichia pastoris expression system. *Braz J Microbiol,* **44**, 351-356.

Raymond,F., Boisvert,S., Roy,G., Ritt,J.F., Légaré,D., Isnard,A., Stanke,M., Olivier,M., Tremblay,M.J., Papadopoulou,B., *et al.* (2012) Genome sequencing of the lizard parasite Leishmania tarentolae reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res,* **40**, 1131-1147.

Revel,M. (2003) Interferon-beta in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Pharmacol Ther,* **100**, 49-62.

Runkel,L., Meier,W., Pepinsky,R.B., Karpusas,M., Whitty,A., Kimball,K., Brickelmaier,M., Muldowney,C., Jones,W. and Goelz,S.E. (1998) Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated

forms of human interferon-beta (IFN-beta). *Pharm Res,* **15**, 641-649.

Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX. (2010) Apr;6(4) A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol*, 264-6.

Selman,M.H., McDonnell,L.A., Palmblad,M., Ruhaak,L.R., Deelder,A.M. and Wuhrer,M. (2010) Immunoglobulin G glycopeptide profiling by matrix-assisted laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem,* **82**, 1073-1081.

Sunaina Kiran Prabhu, Qiang Yang, Xin Tong, Lai-Xi Wang. (2021) Exploring a combined Escherichia coli-based glycosylation and in vitro transglycosylation approach for expression of glycosylated interferon alpha. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,Volume 33.

Teng,S., Srivastava,A.K. and Wang,L. (2010) Sequence feature-based prediction of protein stability changes upon amino acid substitutions. *BMC Genomics,* **11 Suppl 2**, S5.

Van Karnebeek,C.D., Bonafé,L., Wen,X.Y., Tarailo-Graovac,M., Balzano,S., Royer-Bertrand,B., Ashikov,A., Garavelli,L., Mammi,I., Turolla,L., *et al.* (2016) NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development. *Nat Genet,* **48**, 777-784.

Wiese,M., Ilg,T., Lottspeich,F. and Overath,P. (1995) Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in Leishmania mexicana secreted acid phosphatase. *EMBO J,* **14**, 1067-1074.

Effect of cow's milk and soy drink (transgenic and non-transgenic) on the femur histomorphometry of BALB/c mice

Eduarda Pires Costa[1], Reggiani Vilela Gonçalves[1], Mariáurea Matias Sarandy[1]

[1]Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

[1]Animal Science Departament, NC State University, Raileigh, North Carolina.

Introduction

The change in dietary behavior among the population has raised concerns regarding bone health since a balanced diet is fundamental for the developing and maintaining of bone mass and adequate biomechanical function. Alterations in bone metabolism, microstructure, matrix mineralization, and bone mineral density (BMD) are associated with nutritional factors and dietary components, in which we can highlight different types of milk (Rizzoli, 2014).

Milk, a traditional food product, is recognized as a nutrient-rich food with important minerals for bone health (Bu et al., 2021). It has a high bioavailability of calcium, presence of vitamin D, and proteins like casein that positively regulate bone remodeling, attenuating bone loss (Rizzoli 2022). However, consumption of milk and its derivatives has decreased drastically in the last few years. The consumption of plant-based drinks, such as soy, has significantly increased as a substitute for cow's milk due to the absence of lactose and no cholesterol content. In addition to having an aminoacid composition with a nutritional value equivalent to animal proteins (Dirkes et al.,2018), soy is rich in flavonoids, widely known for their beneficial effects in the treatment of diseases with strong inflammatory and pro-oxidant bases (Garcia et al.,2018).

Although studies have been conducted comparing the effects of cow's milk of soy drink on human health, the results are still controversial and need to provide a conclusive answer. In this context, the present study aims to compare the effects of cow's milk, transgenic and non-

transgenic soy drinks on bone histomorphometric in the femurs of BALB/C mice.

Material and methods

Animals

BALB/c mice, with an average body mass of ±30g, were obtained from the Central Animal House of the Biological and Health Sciences Center of the Federal University of Viçosa. The animals were kept in individual cages and experimental facilities with lighting cycles (12/12-h light/dark) and temperature (21º ±1 C) controlled. Water and food were provided ad libitum. Body mass was recorded weekly. The use of animals in this study was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (registration number 23/2022).

Experimental Model and Experimental Diets

A total of twenty-eight BALB/c mice were randomized into four groups with seven animals per group. The groups were administered water (G1), non-transgenic soy drink

(G2), transgenic soy drink (G3), or cow milk (G4), once a day. All treatments were given via gavage over a 42-day period, with a dosage of 0.7 ml. Twenty-four hours after the last meal, the animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and euthanized by exsanguination via cardiac puncture. Femurs were removed for histomorphological analyses.

Bone Histomorphometric Analysis

The distal epiphyses of the right femurs were decalcified, subsequently were washed in distilled water, dehydrated in an increasing series of ethanol, and clarified in xylene. The anteroposterior thickness of the epiphysis was measured, and the medial portion was sectioned. Both fragments, positioned with the cutting base down, were embedded in paraffin in a vertical orientation relative to the longitudinal axis. Some four-micrometer-thick histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histomorphometric analysis. The slides were viewed using a x20 objective lenses, and histological images were

captured using a light photomicroscope (Olympus BX-60®, Tokyo, Japan) integrated with a digital camera (Olympus QColor-3®, Tokyo, Japan). In order to estimate the volume densities occupied by trabecular bone (Vv[bone], %) and bone marrow (Vv[marrow],%), point counting was used with the formula: Vv[trabeculae/marrow]= ΣPP[trabeculae/marrow] / ΣPT; where ΣPP[trabecula/marrow] represents the number of points that intersect with bone trabeculae or marrow, and ΣPT represents the total number of test points. In this study, 81 test points were used. To estimate the bone area (B.Ar), trabecular width (Tb.Wi), and trabecular separation (Tb.Sp), we randomly selected and digitized ten regions of interest (ROI) for each animal. The marrow was manually deleted, and only trabecular bone was considered. Each ROI was segmented into a black-and-white image, and its trabecular-covered area was automatically calculated (Egan; Brennan; Pignolo, 2012). The same images were used to calculate trabecular separation and width using the sphere-fitting method, which computes the mean diameter

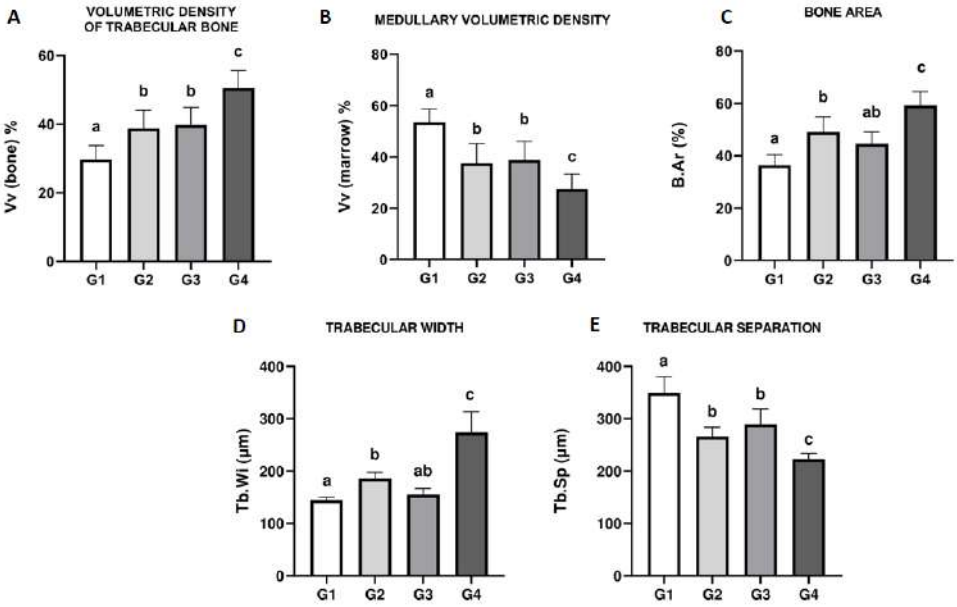
of all spheres that can be fitted within trabeculae (Tb.Wi) and between trabeculae (Tb.Sp). The analyses were performed using the ImageJ software with the BoneJ plugin (Doube et al., 2010).

Results

A significant increase in trabecular volumetric density was observed in all groups evaluated compared to the control group. Groups G2 and G3 did not show significant differences between them, while group G4 obtained the highest values compared to the other groups (Figure 5A). Regarding medullary volumetric density and trabecular separation, all groups presented significantly reduced values compared to the control, with G2 and G3 not differ statistically. In contrast, group G4 presented reduced values compared to the other groups (Figures 5B and 5E). Bone area and trabecular width was similar in the groups G1 and G3, while the other groups showed increased values. G2 and G3 obtained similar values between them,

and group G4 showed a significant increase compared to all other groups (Figures 5C and 5D).

Figure 1. Trabecular bone microarchitecture in mice



untreated and treated with cow's milk, non-transgenic and transgenic soy drink. (A) Trabecular volumetric density (Vv bone); (B) Medullary volumetric density (Vv medulla); (C) Bone area (B.ar); (D) Trabecular width (Tb.Wi); (E) Trabecular separation (Tb.Sp). G1: treated with distilled

water, G2: non-transgenic soy drink (G2). G3: transgenic soy drink, G4: cow's milk. Data are expressed as mean ± standard deviation. [a,b,c] Different letters on the columns indicate statistical differences ($P<0.05$) between the groups. Groups with the same letter do not show statistical differences ($P>0.05$).

Discussion

The groups that received transgenic and non-transgenic soy drink showed beneficial effects on bone health in all trabecular microarchitecture parameters. An explanation for these effects is that isoflavones, compounds present in soy, are structurally similar to estrogen and can bind to beta and alpha estrogen receptors (Boutas et al., 2022), having a higher affinity for the estrogen receptor beta (ER-β) than for the estrogen receptor alpha (ER-α). Trabecular bone has higher ER-β expression compared to cortical bone, which may explain why soy has positive effects on trabecular bone density, but not on cortical bone (Dirkes et al., 2018). In addition, bone remodeling and turnover occur in both

cortical and trabecular bone, but with greater intensity in trabecular bone due to its functions and demands (Clarke, 2008b).

Conclusion

In summary, our findings suggest that soy drink (transgenic and non-transgenic) have comparable effects on trabecular microarchitecture. However, further investigations are needed to elucidate the mechanisms by which specific bioactives present in milk and soy drinks may influence bone metabolism

References

BU, T. et al. Milk proteins and their derived peptides on bone health: Biological functions, mechanisms, and prospects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 2234–2262, 2021. DOI: 10.1111/1541-4337.12707

DIRKES, R. K. et al. Soy protein isolate suppresses bone resorption and improves trabecular microarchitecture in spontaneously hyperphagic, rapidly growing male OLETF rats. **Current Developments in Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1093/cdn/nzy010

DOUBE, M. et al. UKPMC Funders Group BoneJ : free and extensible bone image analysis in ImageJ. **Bone**, v. 47, n. 6, p. 1076–1079, 2010. DOI: 10.1016/j.bone.2010.08.023

Garcia et al. Antioxidant Food Components for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms, and Clinical Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–17, 28 jan. 2021. DOI: 10.1155/2021/6627355

RIZZOLI, R. Nutritional aspects of bone health. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 6, p. 795–808, 2014. DOI: 10.1016/j.beem.2014.08.003 1521-690X

RIZZOLI, R. Dairy products and bone health. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 1, p. 9–24, 2022. DOI: 10.1007/s40520-021-01970-4

Agências de fomento: CAPES.

BIO
EXPERIENCE
2023