

Anais do XX Simpósio de Iniciação Científica FACLEPP – UNOESTE

Resumos com Resultados – Ciências Agrárias

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PEIXES NA DISPERSÃO DE OVOS DE
TOXOCARA SPP. NO MEIO AMBIENTE..... 2

CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO DE FERIDAS INDUZIDAS
EM COELHOS E TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E
ROSUVASTATINA..... 4

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

Pesquisa

UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - UNOESTE

Apresentação em Pannel

Ciências Agrárias
Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PEIXES NA DISPERSÃO DE OVOS DE TOXOCARA SPP. NO MEIO AMBIENTE

EVERTON ANDRE DE OLIVEIRA
YSLLA FERNANDA FITZ BALO MERIGUETI
ISABELLA BRAGHIN FERREIRA
ISABELE SANTOS GARCIA
ROSEMEIRE DE SOUZA SANTOS
ROGERIO GIUFFRIDA
VAMILTON ALVARES SANTARÉM

A piscicultura de água doce é a atividade que vem se mostrando mais promissora na produção de pescado. No Brasil, as condições são favoráveis à piscicultura, pois o país tem abundante potencial hídrico e grandes áreas produtoras de grãos como soja, milho trigo e outros utilizados como ração animal. Neste cenário destaca-se a criação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1757), uma das espécies mais cultivadas mundialmente, em virtude do rápido crescimento, rusticidade, facilidade de manejo, adaptação e o bom aproveitamento da carcaça, além do seu sabor agradável e com poucas espinhas. Juntamente com o crescimento da piscicultura, o hábito de ingestão de carne crua de peixes vem se difundindo mundialmente, inclusive no Brasil. A ingestão de carne crua de peixes, porém, pode representar um fator de risco para a infecção e vários agentes de zoonoses, especialmente aquelas ocasionadas por parasitos, como a giardíase, a anisacuíase e a gnatostomíase. Os animais de estimação próximos aos lagos, rios e tanques de criação de peixes podem excretar fezes em áreas próximas de mananciais promovendo a contaminação dos recursos hídricos por vários agentes, especialmente parasitos. O ciclo de vida desses é mantido quando os cães ingerem vísceras ou carne crua de peixes. Várias outras zoonoses parasitárias podem ser adquiridas pela ingestão de carne crua ou malcozida de hospedeiros intermediários ou paratênicos, mas os estudos sobre o papel do consumo de peixe ainda é escasso na literatura. Um dos exemplos é a toxocaríase (Larva Migrans Visceral/Ocular), uma das zoonoses mais prevalentes no mundo, causada pelos nematódeos do gênero *Toxocara*, especialmente *Toxocara canis*, que infecta os cães. Esses parasitos podem ser transmitidos aos seres humanos pela ingestão de ovos larvados presentes no ambiente ou de vísceras ou carne crua de hospedeiros paratênicos (aves e herbívoros) contendo larvas infectantes. As larvas de *Toxocara* spp. liberadas no intestino do ser humano migram para diversos órgãos, via circulação, podendo ocasionar problemas hepáticos, cardíacos, pulmonares, neurológicos e oculares. Diante deste contexto, o presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar o potencial de peixes como agentes de dispersão de ovos de *T. canis* para o meio aquático, e a migração tecidual do parasito, usando como modelo experimental tilápias-do-Nilo. O objetivo deste estudo foi o de

avaliar o potencial de peixes como agentes de dispersão de ovos de *Toxocara* spp. em ambiente aquático, e verificar a migração tecidual das larvas, através da infecção experimental de Tilápias. Foram utilizadas tilápias como modelo do estudo (n=15), infectadas experimentalmente por gavagem com 300 ovos embrionados de *Toxocara canis*, e mantidos individualmente em caixas plásticas. A avaliação da contaminação da água, realizada pela filtração seriada em tamises (212 e 38 micrometros), e da migração tecidual, pela digestão ácida, foram realizadas 16, 24, 48, 72 e 240 horas pós-infecção. Em cada momento, foram analisados três peixes infectados e um peixe do grupo controle (Grupo controle n= 5). Verificou-se o declínio significativo da dispersão de ovos para o meio aquático (p= 0,001) e da presença de ovos no TGI dos peixes (p=0,007), em função do tempo. Nenhuma larva foi recuperada dos tecidos. Os dados do estudo mostram que os peixes são proficientes em dispersar ovos de *Toxocara* spp. em ambiente aquático, e que embora não haja migração tecidual, os peixes podem manter ovos infectivos de *Toxocara* spp. no trato gastrintestinal. Protocolo CEUA: 4299.

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO DE FERIDAS INDUZIDAS EM COELHOS E TRATADAS COM FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E ROSUVASTATINA

MARIA ROSA SANTOS BREDA
YURI FERREIRA VICENTINI
CECÍLIA LAPOSY SANTARÉM

Nos últimos anos, avanços científicos acerca da cicatrização de feridas de pele vêm sendo alcançados com a utilização de biomateriais como a fibrina rica em plaquetas (FRP), e com o uso de estatinas como a rosuvastatina (RSV). Em uma pele normal, o colágeno tipo I é o tipo mais predominante, conferindo maior resistência à tensão, enquanto o colágeno tipo III se encontra presente em menor quantidade. Em uma ferida em processo de cicatrização, em fases anteriores à fase de remodelação, esta proporção é inversa. Com o decorrer do processo, a proporção de colágeno normaliza com as ações dos fibroblastos e da colagenase (BROUGHTON et al., 2006). Com a utilização da imuno-histoquímica é possível elucidar a distribuição das fibras de colágeno da amostra, sendo possível, a partir de métodos quantitativos, a quantificação desses dois tipos de fibras (FACHINELLI; TRINDADE, 2007). A presente pesquisa se justifica, pois mais estudos são necessários para avaliar os efeitos do uso da FRP e da RSV, separadamente e em conjunto, sobre a produção de colágeno na cicatrização de ferida. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) autóloga, da Rosuvastatina (RSV) e associações sobre o colágeno, através da quantificação de fibras colágenas tipos I e III da cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas no dorso de coelhos. Foram utilizados 8 coelhos machos adultos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia, peso médio $3,0 \pm 1,0$ kg, com idade média de 2 anos, que receberam tratamento com FRP autóloga, RSV e associações. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo (12 horas claro/escuro) controlados. Os coelhos passaram por um período de adaptação de sete dias antes do estudo. Durante todo o experimento foram mantidos em condições padronizadas de dieta e água à vontade. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do uso de animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - Unoeste de Presidente Prudente/SP (protocolo nº 4320). Com os animais anestesiados, foram feitas antisepsia e demarcação da pele em quatro locais com auxílio de caneta pilot® e um punch de 8mm foi utilizado para realização das feridas cirúrgicas. Os fragmentos foram retirados com auxílio de uma pinça anatômica, preservando a musculatura. A ferida considerada controle foi tratada com solução de cloreto de sódio a 0,9%®. A lesão do lado esquerdo inferior recebeu o gel de RSV a 1,2%. A ferida do lado direito superior foi tratada com FRP autóloga e a ferida do lado direito inferior recebeu rosuvastatina gel e FRP autóloga. Em seguida todas as feridas

foram cobertas com ryon estéril e curativo adesivo (Band Aid®). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam cloridrato de Tramadol (0,5mg/Kg, IM, 2 vezes ao dia durante 3 dias consecutivos), a fim de minimizar o desconforto inicial. A primeira troca dos curativos foi feita 3 dias após a indução das feridas e este segundo curativo permaneceu por mais quatro dias. A partir disso, as trocas ocorreram a cada 4 dias, segundo protocolo estabelecido por Vendramin et al. (2010) até completarem 16 dias de experimento. No 17º dia, prosseguiu-se com a realização de biópsia da ferida para avaliação. Para a formulação do gel de rosuvastatina a 1,2% foi utilizado um solvente compatível para diluição da droga, e posteriormente preparado um gel aristoflex com 20% de glicerina. Para preparar o gel utilizou-se banho-maria para aquecimento da solução (50-600C) a fim de homogenizar o polímero com o solvente e a droga, evitando a cristalização do ativo (Grover; Kapoor; Singh, 2016 com modificações). Para o preparo da fibrina rica em plaquetas, foram colhidos após o procedimento anestésico, 2 tubos de 4 mL de sangue venoso proveniente da orelha, utilizando scalp 25G modificado. O material foi acondicionado em tubos sem anticoagulante que passaram por uma única centrifugação em baixa velocidade (200G - centrífuga Excelsa Baby 206R) durante 10 minutos. Amostras de pele foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada com pH 7,0 por 24 a 48 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Após os procedimentos padrão para realização de inclusão dos tecidos em parafina, prosseguiu-se com os cortes na espessura de 4 mm e montagem em lâminas silanizadas. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) na panela de pressão (aproximadamente 100° C) em banho-maria, durante 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e submetidas ao processo de bloqueio da peroxidase endógena com a utilização de uma mistura de PBS e peróxido de hidrogênio, durante 10 minutos, no escuro. Em seguida foi feito novo bloqueio com leite desnatado 5% em PBS. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em BSA 1% para colágeno tipo I ou colágeno tipo III overnight a 4°C (Tabela 1). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS. Os cortes de pele foram incubados com o anticorpo secundário, também diluído com BSA 1%, durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. A reação imuno-histoquímica foi então revelada com o DAB (diaminobenzidina). Devido à presença de bastante colágeno na pele, não foi utilizado controle positivo e, para o controle negativo, um dos cortes não recebeu anticorpo primário (recebeu apenas anticorpo secundário). Em seguida, foram contracolorados com hematoxilina (Souza et al., 2015). Para a captação das imagens, foi utilizado microscópio óptico (Leica DMLB, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a uma câmera (Leica DFC300 FX, São Paulo, SP, Brasil). As imagens observadas no microscópio foram projetadas em um monitor através de um software analisador de imagem (Leica QWin Plus, São Paulo, SP, Brasil). O sistema apresenta, na tela do computador, a imagem original digitalizada a partir da lâmina histológica. As imagens foram obtidas no aumento de 400x, na região abaixo da epiderme. A área imunomarcada, apresentando a coloração acastanhada, foi avaliada a partir da técnica de deconvolução de cores, usando o Plugin "Colour Deconvolution" no software Fiji. Para tanto, a imagem foi separada em 3 cores: verde (fundo da lâmina), azul (hematoxilina) e acastanhada (área imunomarcada), sendo apenas esta última utilizada para a quantificação. Na seção "Imagens", foi selecionado "Threshold" para a seleção das áreas marcadas e posterior quantificação. Para que não fosse detectada pouca marcação em áreas bastante marcadas ou excesso de marcação em áreas pouco marcadas, foi estabelecido um intervalo de 0-180 para os tons de castanho do histograma. Após a aplicação da máscara na área imunomarcada, foi mensurada a porcentagem desta

marcação em relação à área, sendo que uma média foi calculada a partir de 3 imagens obtidas (Andrade et al., 2011). A avaliação do efeito dos tratamentos foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism, versão 5.01. Para validação dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foi realizado teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk) e de homogeneidade (Bartlett) de variância entre os grupos. Para comparar os tratamentos em relação a cada tipo de colágeno (colágenos tipo I e tipo III) foram realizados os testes Kruskal Wallis e Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Quando avaliamos os efeitos da FRP autóloga, da RSV e da associação entre FRP e RSV nas feridas dérmicas induzidas experimentalmente em coelhos, foi possível observar efeitos diferentes sobre o colágeno. No que diz respeito ao percentual de colágeno tipo III, o tratamento com FRP autóloga foi superior ao controle e aos demais tratamentos ($P < 0,05$) (Fig. 1). Em relação ao colágeno tipo I, o tratamento com a RSV apresentou um percentual de colágeno tipo I bastante reduzido quando comparado aos demais tratamentos e ao controle ($P < 0,05$) (Fig. 2). A associação da RSV à FRP autóloga não foi capaz de agir sobre a proliferação de colágenos tipo I e/ou III. Conclui-se que utilização da FRP autóloga induz à maior quantidade de fibras colágenas tipo III. O uso da RSV é capaz de induzir à menor quantidade de fibras colágenas tipo I, sendo uma alternativa viável para minimizar a formação de cicatrizes hipertróficas. Nos últimos anos, avanços científicos acerca do uso de biomateriais como a fibrina rica em plaquetas (FRP), e do uso de estatinas como a rosuvastatina (RSV) vêm sendo alcançados na cicatrização de feridas de pele. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da FRP autóloga, da RSV e associações sobre o colágeno, através da quantificação de fibras colágenas tipos I e III da cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas no dorso de coelhos. Os tratamentos foram feitos nos dias 3, 7, 10 e 14, sendo o tratamento com a FRP autóloga o que produziu maior quantidade de fibras colágenas, tendo a predominância do colágeno tipo III por tratar-se de uma pele ainda em processo de cicatrização. Conclui-se que a FRP autóloga quando usada de forma seriada em feridas é capaz de induzir a uma maior produção de colágeno tipo III e a RSV é capaz de induzir menor produção de colágeno tipo I. Palavras-chave: biomateriais, cicatrização, estatinas, pele. Protocolo CEUA: 4320.

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

