Junielson Soares da Silva
Ana Cláudia Rabelo e Silva
Organizadores

PESQUISAS EM CITOLOGIA E GENÉTICA:
ASPECTOS GERAIS

1ª edição



Wissen editora
2023

Junielson Soares da Silva
Ana Cláudia Rabelo e Silva
Organizadores

PESQUISAS EM CITOLOGIA E GENÉTICA:
ASPECTOS GERAIS

1ª edição



Wissen editora
2023

Junielson Soares da Silva
Ana Cláudia Rabelo e Silva
Organizadores

PESQUISAS EM CITOLOGIA E GENÉTICA: ASPECTOS GERAIS

1ª edição

Teresina-PI, 2023

Wissen Editora, 2023 | DOI: 10.52832/wed.66

©2023 *by* Wissen Editora
Copyright © Wissen Editora
Copyright do texto © 2023 Os autores
Copyright da edição © Wissen Editora
Todos os direitos reservados

Direitos para esta edição cedidos pelos autores à Wissen Editora.

Todo o conteúdo desta obra, inclusive correção ortográfica e gramatical, é de responsabilidade do(s) autor(es). A obra de acesso aberto (Open Access) está protegida por Lei, sob Licença Creative Commons Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações 4.0 Internacional, sendo permitido seu *download* e compartilhamento, desde que atribuído o crédito aos autores, sem alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Editores Chefe: Dra. Adriana de Sousa Lima
Me. Junielson Soares da Silva
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

Projeto Gráfico e Diagramação: Emilli Juliane de Azevedo Neves
Isaquiel de Moura Ribeiro

Imagem da Capa: Canva

Edição de Arte: Junielson Soares da Silva

Revisão: Os autores e Organizadores

Informações sobre a Editora
Wissen Editora
Homepage: www.editorawissen.com.br
Teresina – Piauí, Brasil
E-mails: contato@wisseneditora.com.br
wisseneditora@gmail.com

Siga nossas redes sociais:
@wisseneditora

PESQUISAS EM CITOLOGIA E GENÉTICA: ASPECTOS GERAIS
1ª edição

https://www.doi.org/10.52832/wed.66

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

Pesquisas em citologia e genética [livro eletrônico]: aspectos gerais / organizadores Junielson Soares da Silva, Ana Cláudia Rabelo e Silva. -- 1. ed. -- Teresina, PI: Wissen Editora, 2023.
PDF

Vários autores.
Bibliografia.
ISBN: 978-65-85923-04-0
DOI: 10.52832/wed.66

1. Biologia 2. Biologia - Pesquisa 3. Citologia 4. Genética I. Silva, Junielson Soares da. II. Silva, Ana Cláudia Rabelo e.

24-191329 CDD-571.5

Índices para catálogo sistemático:

1. Citologia : Ciências biológicas 571.5
Tábata Alves da Silva - Bibliotecária - CRB-8/9253

Informações sobre da Wissen Editora
Homepage: www.wissenditora.com.br
Teresina - Piauí, Brasil
E-mails: contato@wisseneditora.com.br
wisseneditora@gmail.com

Como citar ABNT: SILVA, J. S; SILVA, A. C. R. **Pesquisas em citologia e genética: aspectos gerais,** Teresina-PI: Wissen Editora, 2023. 68 p.

Wissen editora
2023

EQUIPE EDITORIAL

Editores-chefes
Me. Junielson Soares da Silva
Dra. Adriana de Sousa Lima
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

Equipe de arte e editoração
Emilli Juliane de Azevedo Neves
Isaquiel de Moura Ribeiro

CONSELHO EDITORIAL
Ciências Agrárias e Multidisciplinar
Dr. Felipe Górski - Secretaria de Educação do Paraná (SEED/PR)
Dra. Patrícia Pato dos Santos - Universidade Anhanguera (Uniderp)
Dr. Jose Carlos Guimaraes Junior - Governo do Distrito Federal (DF)

Ciências Biológicas e da Saúde
Dra. Francijara Araújo da Silva - Centro Universitário do Norte (Uninorte)
Dra. Rita di Cássia de Oliveira Angelo - Universidade de Pernambuco (UPE)
Dra. Ana Isabelle de Gois Queiroz - Centro Universitário Ateneu (UniAteneu)

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias
Dr. Allan Douglas Bento da Costa - Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)
Dra. Vania Ribeiro Ferreira - Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)
Dr. Agmar José de Jesus Silva – Secretaria de Educação do Amazonas (Seduc/AM)

Linguística, Letras e Artes
Dra. Conceição Maria Alves de A. Guisardi - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas
Dr. Isael de Jesus Sena - Culture, Education, Formation, Travail (CIRCEFT)
Dra. Mareli Eliane Graupe - Universidade do Planalto Catarinense (Uniplac)
Dr. Rodrigo Avila Colla - Rede Municipal de Ensino de Esteio, RS
Dr. Erika Giacometti Rocha Berribili - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Dr. Douglas Manoel Antonio De Abreu P. Dos Santos - Universidade de São Paulo (USP)
Dra. Aline Luiza de Carvalho - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)
Dr. José Luiz Esteves - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR)
Dr. Claudemir Ramos - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC/SP)
Dr. Daniela Conegatti Batista – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Dr. Wilson de Lima Brito Filho - Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Dr. Cleonice Pereira do Nascimento Bittencourt- Universidade de Brasília (UnB)
Dr. Jonata Ferreira de Moura - Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Dra. Renata dos Santos - Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI)

Wissen Editora, 2023 | DOI: 10.52832/wed.66

Conselho Técnico Científico

Me. Anderson de Souza Gallo - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ
Ma. Antônia Alikaene de Sá - Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Ma. Talita Benedcta Santos Künast - Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Ma. Irene Suelen de Araújo Gomes – Secretaria de Educação do Ceará (Seduc /CE)
Ma. Tamires Oliveira Gomes - Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)
Ma. Aline Rocha Rodrigues - União Das Instituições De Serviços, Ensino E Pesquisa LTDA (UNISEPE)
Me. Mauricio Pavone Rodrigues - Universidade Cidade de São Paulo (Unicid)
Ma. Regina Katiuska Bezerra da Silva - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Esp. Rubens Barbosa Rezende – Faculdade UniFB
Me. Luciano Cabral Rios – Secretaria de Educação do Piauí (Seduc/PI)
Me. Jhenys Maiker Santos - Universidade Federal do Piauí (UFPI0
Me. Francisco de Paula S. de Araujo Junior - Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Ma. Anna Karla Barros da Trindade - Instituto Federal do Piauí (IFPI)
Ma. Elaine Fernanda dos Santos - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Ma. Lilian Regina Araújo dos Santos - Universidade do Grande Rio (Unigranrio)
Ma. Luziane Said Cometti Lélis - Universidade Federal do Pará (UFPA)
Ma. Márcia Antônia Dias Catunda - Devry Brasil
Ma. Marcia Rebeca de Oliveira - Instituto Federal da Bahia (IFBA)
Ma. Mariana Morais Azevedo - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Ma. Marlova Giuliani Garcia - Instituto Federal Farroupilha (IFFar)
Ma. Rosana Maria dos Santos - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
Ma. Rosana Wichineski de Lara de Souza - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Ma. Simone Ferreira Angelo - Escola Família Agrícola de Belo Monte - MG
Ma. Suzel Lima da Silva - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Ma. Tatiana Seixas Machado Carpenter - Escola Parque
Me. Cássio Joaquim Gomes - Instituto Federal de Nova Andradina / Escola E. Manuel Romão
Me. Daniel Ordane da Costa Vale - Secretaria Municipal de Educação de Contagem
Me. Diego dos Santos Verri - Secretária da Educação do Rio Grande do Sul
Me. Fernando Gagno Júnior - SEMED - Guarapari/ES
Me. Grégory Alves Dionor - Universidade do Estado da Bahia (UNEB)/ Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Me. Lucas Pereira Gandra - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); UNOPAR, Pólo Coxim/MS
Me. Lucas Peres Guimarães – Secretaria Municipal de Educação de Barra Mansa - RJ
Me. Luiz Otavio Rodrigues Mendes - Universidade Estadual de Maringá (UEM)
Me. Mateus de Souza Duarte - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Me. Milton Carvalho de Sousa Junior - Instituto Federal do Amazonas (IFAM)
Me. Sebastião Rodrigues Moura - Instituto Federal de Educação do Pará (IFPA)
Me. Wanderson Diogo A. da Silva - Universidade Regional do Cariri (URCA)
Ma. Heloisa Fernanda Francisco Batista - Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Ma. Telma Regina Stroparo - Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro)

Me. Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

SOBRE OS ORGANIZADORES

Junielson Soares da Silva



Mestre e doutorando em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv), pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí - UFPI. Especialista em Saúde Pública, e em Educação Ambiental pelo Instituto Superior de Educação São Judas Tadeu-ISESJT. Desenvolve pesquisas voltadas ao controle populacional de mosquitos vetores de arboviroses (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), com o uso de compostos químicos sintéticos, naturais e semissintéticos derivados de plantas. Tem experiência em Ensino de Ciências da Natureza, Formação de Professores e BNCC. Editor-chefe do *Journal of Education, Science and Health* e da Wissen Editora. E-mail: junielsonbio10@gmail.com.

Ana Cláudia Rabelo e Silva



Mestra e doutoranda em Ciências, pelo programa de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Licenciada em Ciências Biológicas (UNIFOR-MG). Especialista em Análises Clínicas (FASF-MG) e em Ensino de Ciências por Investigação – Ciência é 10 (UFTM-MG). Desenvolve pesquisas voltadas à investigação da influência de infecções durante a gravidez sobre a ação de transportadores de fármacos presentes na membrana celular. Tem experiência em Ensino de Ciências da Natureza e Produção de conteúdo educacional (textos, avaliações e videoaulas gravadas e ao vivo). Atua nas áreas de docência, hematologia, imunologia, infectologia e farmacocinética. E-mail: anarabelo@usp.br.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO **12**
CAPÍTULO 1 ..... **14**
ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO: DESAFIOS NA METABOLIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS E PROCESSAMENTO DO ÁLCOOL **14**
Livia Prado Bichir Haber 14
Lorrana Aparecida Monteiro de J 14
Pedro Henrique Camargo Frassan 14
Rafael Felipe Moro 14
Fábio de Assis Pinto 14
DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.404 14
CAPÍTULO 2 ..... **21**
ANÁLISE DA EFICÁCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE FOLATO E DE 5-METILTETRAHIDROFOLATO EM INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM INFERTILIDADE E PORTADORES DE POLIMORFISMO NO GENE MTHFR **21**
Victor Vincent Morais de Lima 21
Isabelle Rocha Oliveira 21
Camila Costa de Sousa 21
Alana Oliveira da Silva 21
Gabrielly Rossi Monteiro 21
Ana Cecília Pereira Dantas 21
Levi Magalhães Gurgel Macêdo 21
Gabriel Martins de Araújo Sousa 21
Júlia Ellen Sousa Granja 21
Keciany Alves de Oliveira 21
DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.405 21
CAPÍTULO 3 ..... **31**
ATIVIDADE DAS ECTOENZIMAS E-NTPDASE E E-ADA DE LINFÓCITOS ISOLADOS DE ÓRGÃOS LINFOIDES PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS COMO MARCADORES IMUNOLÓGICOS NO DANO HEPÁTICO AGUDO **31**
Pedro Henrique Doleski 31
Douglas Gonçalves Friedrichs 31
DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.406 31
CAPÍTULO 4 ..... **40**

MAPEANDO AS BASES GENÉTICAS DA MICROCEFALIA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA PÓS EPIDEMIA DE ZIKA VÍRUS 40

Julia Ribeiro Guimarães Araújo 40

Fábio de Assis Pinto 40

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.407 40

CAPÍTULO 5 51

DIAGNÓSTICO E RASTREIO DE CARCINOMAS DE SUPERFÍCIE OCULAR POR MEIO DO MÉTODO DE CITOLOGIA DE IMPRESSÃO 51

João Marcos Oliveira da Silva 51

Luiz Henrique Cecanecchi Fernandes 51

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.408 51

CAPÍTULO 6 59

INIBIÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 6 (HDAC6) E INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM GLIOBLASTOMA 59

Laís Bernardo Lopes 59

João Marcos Oliveira-Silva 59

Leilane Sales Oliveira 59

Angel Mauricio Castro-Gamero 59

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.409 59

APRESENTAÇÃO

A citologia e a genética estão entre as áreas biológicas básicas que mais despertam interesse, tanto por sua imensidão de incríveis subtemas quanto por seu fascinante conjunto de descobertas que surgem em ritmo cada vez mais acelerado.

Descrever a citologia como sendo o "estudo das células" pode traduzir a ideia de que essa ciência aborda um tema simplista... No entanto, muito pelo contrário, o âmbito da biologia celular (como essa área também é conhecida) engloba uma vastidão de conteúdos sobre cada aspecto não apenas do interior da célula (como sua estrutura, morfologia, composição e funcionamento) quanto também no que se refere à sua relação e à sua comunicação com o meio extracelular. A assimilação meticulosa e detalhada dos conhecimentos citológicos é o alicerce para o entendimento de qualquer outra estrutura viva!

Assim como a citologia, a genética também fundamenta a compreensão dos mecanismos que regem o funcionamento dos seres vivos. Baseando-se no estudo dos genes, essa ciência visa descrever os processos relacionados com a transmissão hereditária do material genético, a fim de desvendar suas inúmeras implicações, como por exemplo: mapear e tratar doenças determinadas ou influenciadas geneticamente; entender as particularidades da evolução; propiciar o melhoramento genético de espécies de interesse; identificar, diferenciar e relacionar os seres vivos; além de uma infinidade de propósitos!

Diante desse contexto, esta obra – intitulada "*Pesquisas em Citologia e Genética: aspectos gerais*" – reúne trabalhos notáveis e relevantes dentro dessas duas temáticas, distribuídos em seis capítulos:

O Capítulo 1 – *Estresse do retículo endoplasmático: desafios na metabolização de medicamentos e processamento do álcool* – descreve um trabalho que investigou os efeitos do estresse no retículo endoplasmático e da autofagia na lesão hepática causada por estresse oxidativo devido a medicamentos e etanol.

No Capítulo 2 – *Análise da eficácia da suplementação de folato e de 5-metiltetrahidrofolato em indivíduos diagnosticados com infertilidade e portadores de polimorfismo no gene MTHFR* – observam-se os desfechos de uma pesquisa que avaliou se a suplementação de folato ou de seu metabólito metiltetrahidrofolato (5-MTHF) é eficaz para melhorar o quadro de infertilidade em indivíduos com polimorfismos no gene MTHFR.

O Capítulo 3 – *Atividade das ectoenzimas E-NTPDase e E-ADA de linfócitos isolados de órgãos linfoides primários e secundários como marcadores imunológicos no dano hepático agudo* – relata a investigação dos efeitos do dano hepático agudo induzido por tetracloreto de carbono (CCl4) na atividade de algumas ectoenzimas em linfócitos isolados de diferentes órgãos imunes, além da análise da influência do extrato de silimarina, conhecido por sua atuação hepatoprotetora.

O Capítulo 4 – *Mapeando as bases genéticas da microcefalia: uma revisão sistemática pós epidemia de zika vírus* – refere-se a um estudo que analisou o percurso das publicações sobre as bases genéticas dos casos de microcefalia congênita humana, prevalentes em relação aos casos oriundos de consequências da infecção materna por zika vírus após 2017 (pós-pandemia).

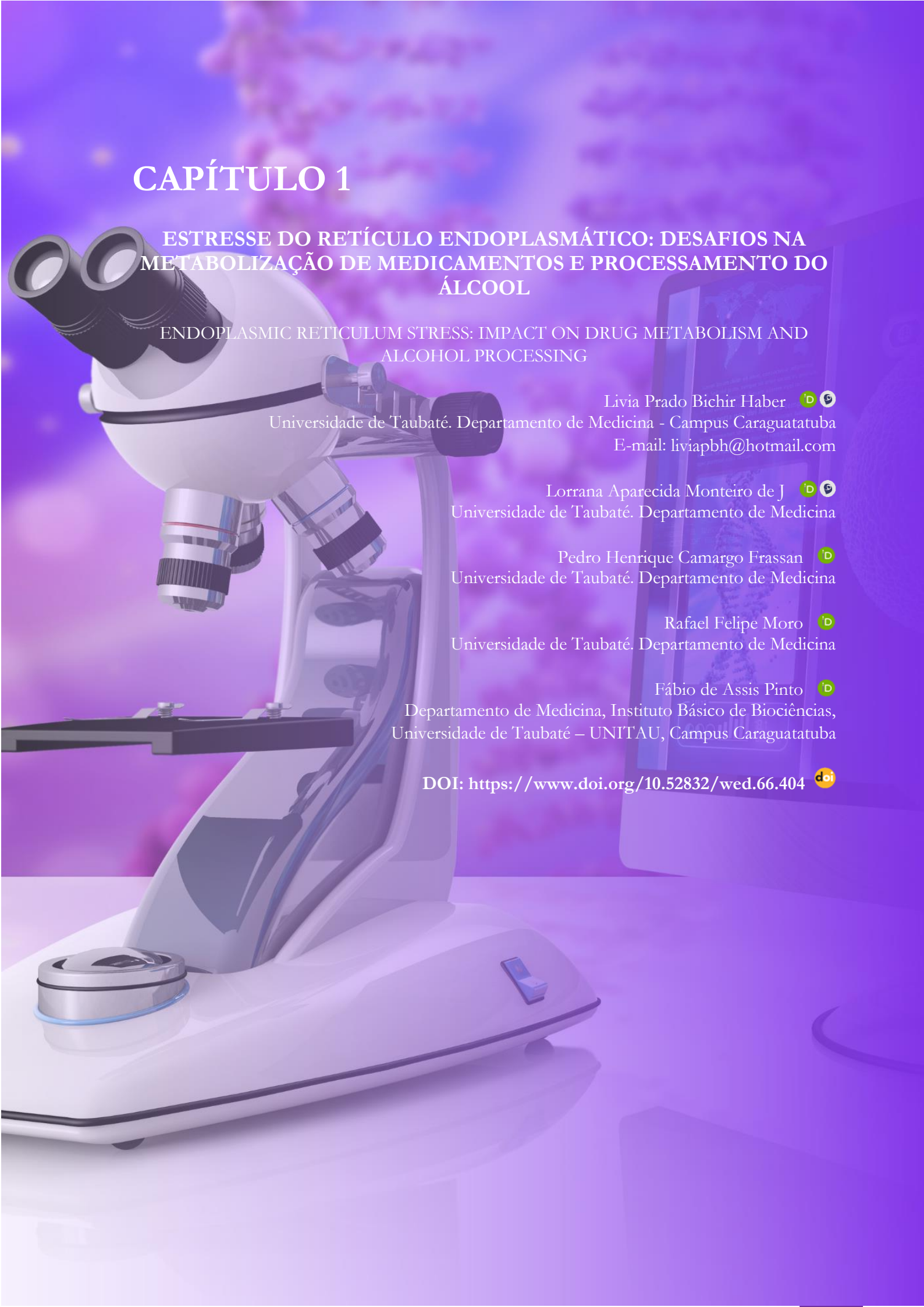
No Capítulo 5 – *Diagnóstico e rastreio de carcinomas de superfície ocular por meio do método de citologia de impressão* – são descritos os resultados de uma revisão bibliográfica que objetivou analisar as publicações mais relevantes e fundamentais no campo da citologia de impressão da superfície ocular, descrevendo suas vantagens e limitações.

O Capítulo 6 – *Inibição da histona desacetilase 6 HDAC6 e instabilidade cromossômica em glioblastoma* – reporta um estudo que investigou como a inibição da histona desacetilase 6 (HDAC6) afeta a instabilidade cromossômica em células de glioblastoma humano, T98G, visando proporcionar melhor entendimento das bases biológicas das neoplasias.

Esta obra é dedicada a estudantes, professores e demais profissionais atuantes na área ou que desejam manter-se atualizados sobre tópicos proeminentes da citologia e da genética, através de uma abordagem didática e funcional, visando a divulgação e a socialização de saberes.

Desejamos que a leitura seja agradável e que instigue ainda mais o fascínio pela citologia e pela genética!

Ana Cláudia Rabelo e Silva
Junielson Soares da Silva



CAPÍTULO 1

ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO: DESAFIOS NA METABOLIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS E PROCESSAMENTO DO ÁLCOOL

ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS: IMPACT ON DRUG METABOLISM AND ALCOHOL PROCESSING

Livia Prado Bichir Haber
Universidade de Taubaté. Departamento de Medicina - Campus Caraguatatuba
E-mail: liviapbh@hotmail.com

Lorrana Aparecida Monteiro de J
Universidade de Taubaté. Departamento de Medicina

Pedro Henrique Camargo Frassan
Universidade de Taubaté. Departamento de Medicina

Rafael Felipe Moro
Universidade de Taubaté. Departamento de Medicina

Fábio de Assis Pinto
Departamento de Medicina, Instituto Básico de Biociências,
Universidade de Taubaté – UNITAU, Campus Caraguatatuba

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.404

RESUMO

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela crucial nas células eucarióticas, composta por uma rede de túbulos interconectados e por uma membrana que separa o lúmen do RE do citosol. Suas funções abrangem síntese e modificação de proteínas, desintoxicação celular, regulação do cálcio e metabolismo lipídico. No entanto, o estresse do RE (ERS) pode ocorrer devido a fatores como estresse oxidativo e mutações, desencadeando o *Unfolded Protein Response* (UPR). Deste modo, este estudo visa investigar os efeitos do ERS e da autofagia na lesão hepática causada por estresse oxidativo devido a medicamentos e etanol. Observou-se que a lesão hepática induzida por medicamentos (DILI) está associada ao ERS e é uma preocupação global, resultando em hepatite grave, cirrose e câncer hepático. Além disso, a lesão hepática alcoólica aguda é provocada pelo consumo excessivo de álcool, podendo levar a diversas condições, como esteatose, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Em resumo, o RE desempenha um papel fundamental nas células eucarióticas, mas distúrbios como o ERS podem levar a sérias consequências hepáticas, incluindo DILI e lesão hepática alcoólica. Este estudo investigou os efeitos do ERS e da autofagia nessas condições.

Palavras-chave: Retículo Endoplasmático. Estresse. Medicamentos. Metabolização.

ABSTRACT

The endoplasmic reticulum (ER) is a crucial organelle in eukaryotic cells, composed of a network of interconnected tubes and a membrane that separates the ER lumen from the cytosol. Its functions include protein synthesis and modification, cellular detoxification, calcium regulation, and lipid metabolism. However, ER stress (ERS) can occur due to factors such as oxidative stress and mutations, triggering the Unfolded Protein Response (UPR). Thereby, this study aims to investigate the effects of ERS and autophagy on liver injury caused by oxidative stress due to drugs and ethanol. It was noticed that drug-induced liver injury (DILI) is associated with ERS and is a global concern, resulting in severe hepatitis, cirrhosis, and liver cancer. In addition, acute alcoholic liver injury is caused by excessive alcohol consumption, which can lead to various conditions such as steatosis, fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. In summary, the ER plays a fundamental role in eukaryotic cells, but disorders such as ERS can lead to serious hepatic consequences, including DILI and alcoholic liver injury. This study investigated the effects of ERS and autophagy in these conditions.

Keywords: Endoplasmic Reticulum. Stress. Medications. Metabolism.

1 INTRODUÇÃO

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela vital para as células eucarióticas, envolvido na síntese, dobramento, modificação e enovelamento de proteínas, homeostase do cálcio e metabolismo de lipídios. Variações no nível de cálcio, acúmulo de proteína mal dobrada ou mutante, inibição da glicosilação, estresse oxidativo, entre outros, podem levar o RE a uma condição de estresse, a qual dispara vias de sinalização específicas incluindo a *Unfolded Protein Response* (UPR) (ANDRADE *et al.*, 2019).

Existem três sensores transmembranares presentes no ER que detectam a presença de proteínas não dobradas: IRE alfa, PERK e ATF6. A ativação da resposta a UPR leva inicialmente

à atenuação da síntese e translocação das proteínas para o RE, evitando o desdobramento da proteína, seguido por um aumento na capacidade de dobragem. A UPR promove aumento na expressão de chaperonas BiP, presentes no lúmen do RE, inibe a tradução de novas proteínas e aumenta a degradação de proteínas mal enoveladas. Em condições de estresse, há um aumento dessas proteínas desenoveladas no lúmen do RE, levando ao desligamento desta chaperona dos três componentes da via UPR, que estariam livres para serem ativadas. Logo, quando o estresse é severo, a UPR induz mecanismos de morte celular, principalmente por apoptose (BOWEN QING *et al.*, 2023).

O presente estudo teve como objetivo avaliar como os mecanismos reguladores do estresse do retículo endoplasmático (ERS) reagem perante a metabolização de medicamentos e álcool. No entanto, o mecanismo da transição da sobrevivência para a morte sob o ERS ainda é desconhecido. O desafio futuro é aplicar os resultados da investigação existente para desenvolver medicamentos que possam ser utilizados com segurança na prática clínica. Para determinar as doenças humanas que podem ser tratadas de forma mais eficaz com estes medicamentos, deve-se estudar a complexidade do ERS e suas interações com várias vias celulares para lançar nova luz sobre futuras estratégias diagnósticas, preventivas e terapêuticas para doenças.

2 METODOLOGIA

Este trabalho trata-se de uma revisão de literatura sobre o efeito do ERS na metabolização de medicamentos e álcool. As buscas das referências bibliográficas foram realizadas nas bases de dados Pubmed, ScienceDirect, SciELO, BASE e BVS, utilizando os seguintes descritores: retículo endoplasmático, estresse, medicamentos e álcool, como também seus correspondentes em inglês: *endoplasmic reticulum, stress, drugs, alcohol*. Foram consideradas publicações que datam entre o período de 2015 a 2023, nos idiomas português e inglês. Foram descartados os artigos que fugiam da temática principal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Mecanismo de ERS

A capacidade de resposta de uma célula diante de estímulos e eventuais estresses é essencial para a manutenção de sua homeostase. As causas de estresse celular são muitas e bastante variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, e incluem, por exemplo, danos químicos, mutações gênicas, insuficiência de nutrientes, diferenciação celular e infecções por diferentes patógenos. Diante dessas situações, o processo de dobramento de proteínas é bastante afetado, e, por isso, os compartimentos celulares responsáveis por esta função possuem mecanismos que permitem a detecção de proteínas desenoveladas e a sua correção (MORI *et al.*, 2009).

O retículo endoplasmático é a organela celular responsável pela síntese, dobramento e modificação de peptídeos e proteínas (FAGONE; JACKOWSKI, 2009). Quando perturbações mínimas na estrutura das proteínas nascentes são detectadas, a UPR (uma via de sinalização intracelular) é ativada. A UPR é uma resposta bastante eficiente que permite à célula não somente identificar o aumento de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático, bem como incrementar a capacidade celular de redobrá-las de maneira correta ou induzir sua degradação. Não sendo esse esforço eficiente na eliminação do excesso de proteínas desenoveladas, a UPR pode ainda induzir a célula à autofagia e apoptose (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020).

Além disso, uma ampla gama de distúrbios celulares, como hipóxia, deficiência de nutrientes e inflamação, podem afetar a eficiência do enovelamento de proteínas no RE e levar ao acúmulo de proteínas mal dobradas nesta organela. Quando a capacidade de dobramento da proteína E é sobrecarregada, o ERS é então acionado. O mecanismo do ERS depende principalmente da duração e gravidade da estimulação, ou seja, restauração da homeostase ou apoptose e necrose.

Quando ocorre ERS leve a moderado (mas persistente), as células induzem alterações transcricionais e translacionais através da UPR homeostática (hUPR), que promove a adaptação celular e melhora a sobrevivência celular. No entanto, quando o ERS progride até o ponto em que o hUPR é insuficiente para restaurar a homeostase, o UPR na célula torna-se dominado pelo UPR terminal. Este processo inicia ativamente a apoptose e previne danos celulares sustentados (NIE *et al.*, 2021).

Existem três proteínas residentes no retículo endoplasmático que são os principais pontos de regulação da ativação da via UPR: a quinase e endonuclease IRE1, a quinase PERK e o fator de transcrição com zíper de leucina ATF6. Estas proteínas encontram-se associadas à chaperona GRP78 quando o RE se encontra em homeostasia. No entanto, em situações de estresse, estas proteínas são ativadas através do desligamento de GRP78, que é recrutada para auxiliar no enovelamento proteico. De maneira geral, uma vez ativadas, estas proteínas induzem vias que levam à diminuição global da tradução proteica, aumento da expressão de proteínas responsáveis pelo enovelamento proteico e de proteínas envolvidas no processo de degradação proteossomal de proteínas mal enoveladas, mecanismo denominado ERAD (do inglês: *ER-associated protein degradation*). Uma vez liberada da inibição mediada pela interação com GRP78, PERK se dimeriza e se autofosforila, ativando a sua função de quinase. PERK ativado fosforila e inibe o fator 2 de início de tradução proteica, eIF2α (do inglês*: eukaryotic initiation factor 2α*), consequentemente, inibindo a síntese global de proteínas. No entanto, PERK permite a tradução seletiva de ATF4, fator de transcrição responsável pela regulação de genes envolvidos em vias de sobrevivência

celular e de GADD153 (do inglês: *Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153*), responsável pela indução de morte celular em resposta ao estresse de RE. IRE1α também se dimeriza e se autofosforila após se desligar de GRP78, o que ativa sua função de endonuclease para processamento de mRNA. O principal alvo de IRE1α é o mRNA que codifica *XBP-1* (do inglês: *X-box binding protein 1*) e, através de splicing alternativo, resulta no fator de transcrição XBP-1, o qual regula a expressão de genes envolvidos no enovelamento proteico, controle de qualidade do enovelamento e no processo de ERAD. O desligamento de GRP78 de ATF6 permite que este último seja translocado para o Golgi, onde é clivado e atua como fator de transcrição para aumentar a transcrição de XBP1 e proteínas associadas ao ERAD. Nos últimos anos, foram alcançados progressos consideráveis no campo dos ERS, e os investigadores revelaram o seu papel fundamental no processo fisiopatológico das doenças. A UPR é uma via de sinalização relacionada ao ERS que é essencial para determinar o destino celular (morte ou sobrevivência celular) em resposta ao estresse do ER. Se o número de proteínas mal dobradas for reduzido com sucesso, a UPR será enfraquecida e a célula sobreviverá. No entanto, se o estresse for grave e durar muito tempo e a homeostase não puder ser reconstruída, a UPR persistirá, e a hiperativação do PERK (proteína quinase) e a inibição da tradução a longo prazo pode levar à morte celular (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

Enquanto o ERS agudo leva a apoptose, o ERS subletal crônico causa adaptação celular e resistência à apoptose. Sendo assim, em sua intensidade e duração, o SRE pode afetar profundamente a homeostase celular.

3.2 Medicamentos e seus efeitos no fígado

Foi constatado como exemplo o amiodarona, que é um medicamento antiarrítmico usado para tratar arritmias cardíacas, mas está associado a efeitos colaterais prejudiciais, incluindo toxicidade hepática. A toxicidade hepática causada por amiodarona pode ser aguda (após infusão intravenosa) ou crônica (após uso oral a longo prazo). Isso resulta em danos ao fígado, incluindo esteatose (acúmulo de gordura) e inflamação hepática. A causa exata da esteatose hepática induzida por amiodarona não é completamente compreendida, mas envolve disfunção mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e alterações nos genes relacionados ao metabolismo lipídico. O ERS e a resposta não resolvida a esse estresse podem levar a danos hepáticos. A ativação do ER e da resposta desencadeada por ele afeta o equilíbrio proteico nas células e pode resultar em adaptação celular ou morte celular, dependendo da intensidade e da duração do estresse (EREZ *et al.*, 2017).

Foi investigado o papel do ERS na regulação da esteatose hepática induzida por amiodarona. Descobriu-se que a redução do estresse do ER resultou em melhorias na esteatose hepática induzida por amiodarona. Isso sugere uma nova compreensão do mecanismo subjacente e possíveis estratégias de tratamento para lesões hepáticas causadas por amiodarona. Diversos tipos de medicamentos estão associados a diferentes tipos de danos ao fígado. Outro exemplo seria o tratamento com metformina, que inibiu a ativação de proteínas envolvidas na via de UPR (GRP8, ATF6, PERK e XBP-1), protegendo hepatócitos da morte induzida pelo excesso de ácidos graxos.

3.3 Metabolização do álcool e interferência no ER

O consumo de álcool pode acarretar respostas negativas durante sua metabolização. Primeiramente, tanto o ERS quanto o estresse mitocondrial são mediados pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela cadeia respiratória mitocondrial em situações de estresse. Sendo assim, uma das vias utilizadas para a metabolização do álcool nos hepatócitos é o sistema de enzimas microssomais oxidativas (MEOS), na qual o etanol é transformado em acetaldeído no RE liso, fazendo com que ocorra a produção de ROS a partir da conversão de NADPH em NADP. Além disso, um estudo feito pela Universidade Sun Yat-Sen, na China, relata que a CHOP, proteína que pode induzir a apoptose, é ativada nas células após o consumo de álcool, indicando morte celular durante o ERS (TIEN *et al.*, 2023). Portanto, entende-se que a metabolização do álcool pode prejudicar a funcionalidade do RE, ocasionando o seu estresse pela diminuição da sua capacidade antioxidante devido ao aumento na produção de ROS, juntamente com a ativação de CHOP e indução de atividade da UPR.

4 CONCLUSÃO

A capacidade de resposta das células diante de estímulos e estresse é essencial para a homeostase. O RE desempenha um papel crucial na síntese e dobra de proteínas, e o ERS desencadeia a UPR, que pode levar à morte celular, adaptação ou apoptose, dependendo da intensidade e duração do estresse. Em resumo, a resposta do RE desempenha um papel crucial em doenças humanas comuns, e a UPR é ativada como um mecanismo adaptativo em situações de ERS. No entanto, sob estresse crônico do RE, a UPR pode promover inflamação e morte celular, contribuindo para condições como diabetes, neurodegeneração, acidente vascular cerebral, doenças hepáticas e câncer. A pesquisa destaca que interferir nas vias metabólicas pode não ser a melhor estratégia para induzir o ERS, devido à robustez dessas vias na sobrevivência celular. Portanto, é essencial explorar alternativas para abordar as doenças associadas ao ERS e buscar novas estratégias terapêuticas com base na compreensão aprimorada da transição da sinalização de sobrevivência para morte nesse contexto.

O estudo também investigou como o ERS está relacionado à metabolização de medicamentos, como a amiodarona, e ao consumo de álcool. A amiodarona, por exemplo, pode causar esteatose hepática, envolvendo disfunção mitocondrial e ativação do ER, enquanto o álcool pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio, desencadeando o ERS e ativando a UPR.

Essas descobertas fornecem *insights* importantes sobre os mecanismos subjacentes a danos hepáticos induzidos por medicamentos e álcool, oferecendo possíveis estratégias de tratamento. Compreender como o ERS afeta a metabolização de medicamentos e álcool é fundamental para a prevenção e tratamento de lesões hepáticas e outras condições relacionadas ao ERS.

REFERÊNCIAS

EREZ, N. *et al.* Hepatic amiodarone lipotoxicity is ameliorated by Genetic and Pharmacological inhibition of endoplasmatic reticulum stress. **Toxicol. Sci.**, v. 159, n. 2, p. 402-412, 2017. DOI 10.1093/toxsci/kfx143.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**., v. 21, n. 8, p. 421-438, 2020. DOI 10.1038/s41580-020-0250-z

NIE Z. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and tumor microenvironment in bladder cancer: The missing link. **Front. Cell Dev. Biol**., v. 9, 683940, 2021. DOI 10.3389/fcell.2021.683940

TIEN S. *et al.* PTTG1 alleviates acute alcoholic liver injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte pyroptosis. **Liver Int**., v. 43, n. 4, p. 840-854, 2023. DOI 10.1111/liv.15535.



CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA EFICÁCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE FOLATO E DE 5-METILTETRAHIDROFOLATO EM INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM INFERTILIDADE E PORTADORES DE POLIMORFISMO NO GENE MTHFR

ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF FOLATE AND 5-METHYLTETRAHYDROFOLATE SUPPLEMENTATION IN INDIVIDUALS DIAGNOSED WITH INFERTILITY AND CARRIERS OF POLYMORPHISM IN THE MTHFR GENE

Victor Vincent Morais de Lima
Universidade Estadual do Ceará
E-mail: victornutri1@gmail.com

Isabelle Rocha Oliveira
Universidade Estadual do Ceará

Camila Costa de Sousa
Universidade Estadual do Ceará

Alana Oliveira da Silva
Universidade Estadual do Ceará

Gabrielly Rossi Monteiro
Universidade Estadual do Ceará

Ana Cecília Pereira Dantas
Universidade Estadual do Ceará

Levi Magalhães Gurgel Macêdo
Universidade Estadual do Ceará

Gabriel Martins de Araújo Sousa
Universidade Estadual do Ceará

Júlia Ellen Sousa Granja
Universidade Estadual do Ceará

Keciany Alves de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.405

RESUMO
O folato é essencial para a regulação de diversas funções do organismo humano e deve ser obtido por meio da alimentação. Para exercer suas funções, deve ser convertido a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), processo regulado pela enzima MTHFR; no entanto, polimorfismos do gene MTHFR diminuem a eficácia dessa enzima. Estudos indicam que a infertilidade pode estar associada a esses polimorfismos e, então, à metabolização do folato. O objetivo deste trabalho é avaliar se a suplementação de folato ou de 5-MTHF é eficaz para melhorar o quadro de infertilidade em indivíduos com polimorfismos no gene MTHFR. O trabalho consiste em uma revisão integrativa com ensaios clínicos e estudos de caso publicados entre 2015 e 2023. Os trabalhos com suplementação de folato não foram eficazes na melhora dos parâmetros seminais de homens com polimorfismos no gene MTHFR, exceto para os homozigotos para C677T. Por outro lado, os estudos com 5-MTHF apresentaram resultados positivos quanto à melhora no quadro de infertilidade. A suplementação de 5-MTHF mostrou-se mais promissora na melhora do quadro de infertilidade nesses indivíduos. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar dúvidas sobre a interação do folato com a infertilidade e os polimorfismos MTHFR.

Palavras-chave: Nutrição. Polimorfismo. Vitamina B9.

ABSTRACT
Folate is essential for the regulation of various functions of the human body and must be obtained through food. To perform its functions, it must be converted to 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), a process regulated by the MTHFR enzyme; however, polymorphisms in the MTHFR gene reduce the effectiveness of this enzyme. Studies indicate that infertility may be associated with these polymorphisms and, therefore, with folate metabolism. The objective of this manuscript is to evaluate whether folate or 5-MTHF supplementation is effective in improving infertility in individuals with polymorphisms in the MTHFR gene. The manuscript consists of an integrative review with clinical trials and case studies published between 2015 and 2023. Studies with folate supplementation were not effective in improving the seminal parameters of men with polymorphisms in the MTHFR gene, except for homozygous for C677T. Otherwise, studies with 5-MTHF showed positive results regarding the improvement in infertility. 5-MTHF supplementation showed more promise in improving infertility in these individuals. However, more studies are needed to clarify doubts about the interaction of folate with infertility and MTHFR polymorphisms.

Keywords: Nutrition. Polymorphism. Vitamin B9.

1 INTRODUÇÃO

O folato, também conhecido como vitamina B9, é uma molécula essencial para o funcionamento do organismo e tem como principais funções: contribuir com o fechamento do tubo neural em fetos humanos; evitar a anemia macrocítica; auxiliar a síntese e reparação de ácidos nucléicos; contribuir com o fornecimento de grupamentos metil para reações de metilação; favorecer o crescimento e desenvolvimento celular; diminuir o risco de doenças cardiovasculares; e atuar como agente antioxidante. Não é possível a produção de folato pelas células humanas, sendo, portanto, necessário adquiri-lo por meio da alimentação. As principais fontes de folato são: fígado, vegetais verdes, pães, cereais e grãos enriquecidos (HUANG *et al.*, 2020; GROPPER; SMITH; CARR, 2020; SHULPEKOVA *et al.*, 2021).

Para que o folato exerça suas funções é necessário que este seja reduzido, subsequentemente, em dihidrofolato e, então, em tetrahidrofolato (THF). Este é convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato, em uma reação dependente de piridoxina, e, então, transformado em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), a qual é a forma biologicamente ativa do folato, pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). 5-MTHF é uma molécula necessária para a remetilação da homocisteína em metionina, por meio da metionina sintase em uma reação dependente de cobalamina, regenerando, também, THF (CLARE *et al*., 2019; GROPPER; SMITH & CARR, 2020; LYON *et al*., 2020).

A doação de grupamento metil pelo 5-MTHF não é dependente apenas da ingestão dietética adequada de folato, mas, também, da eficiência enzimática da MTHFR na conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-MTHF. A atividade dessa enzima depende da variação do gene MTHFR, que codifica a enzima que possui a mesma sigla. Essas variações são denominadas polimorfismos, que são definidas como a troca de um nucleotídeo por outro em uma posição específica do ácido desoxirribonucleico (DNA). Cada polimorfismo possui uma sigla que consiste em identificar as trocas de nucleotídeos, a posição onde ocorre essa troca e um código denominado *register number* (rs). Este código é um número de identificação registrado no site SNPedia, que identifica todos os polimorfismos conhecidos do genoma humano. Os mais comuns polimorfismos referentes ao gene MTHFR são o C677T e o A1298C, os quais estão relacionados a algumas disfunções fisiológicas, como a infertilidade (FABOZZI *et al*., 2022; WU *et al*., 2023).

A infertilidade é definida como a falha em conseguir engravidar depois de 12 meses de intercurso sexual sem métodos contraceptivos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 17,5% da população mundial tem problemas com infertilidade. Estudos têm relacionado esse fenômeno a um prejuízo no fornecimento de grupamentos metil, hiperhomocisteinemia, devido aos polimorfismos no gene MTHFR. Dessa forma, surgiram pesquisas avaliando se a suplementação de folato ou de 5-MTHF pode melhorar o quadro de infertilidade (ANTONIN, 2023; CARSON; KALLEN, 2021; FABOZZI *et al*., 2022; STARC *et al*., 2019).

O objetivo deste trabalho é avaliar se a suplementação de folato ou de 5-MTHF é eficaz para melhorar o quadro de infertilidade em indivíduos com polimorfismos no gene MTHFR.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho consiste em uma revisão integrativa. A pergunta que norteou a pesquisa foi: "A suplementação de folato ou de 5-MTHF melhoram o quadro de infertilidade em indivíduos com polimorfismos no gene MTHFR?".

As bases de dados utilizadas para a pesquisa dos artigos foram SciELO e Medline (PubMed) e foram utilizados os seguintes descritores: *infertility*; *folate*; mthfr; *nutrition*; *nutrigenomics*. O descritor *infertility* foi cruzado com os outros descritores citados utilizando o operador booleano "and". Os critérios de inclusão foram: ensaios clínicos publicados há menos de 8 anos; trabalhos publicados no idioma inglês ou português; estudos do tipo revisão de literatura ou ensaio clínico.

Os critérios de exclusão foram: trabalhos de conclusão de curso ou de especialização; artigos publicados em jornais, revistas e *blogs*; artigos de revisão; trabalhos com intervenções que não sejam com a suplementação de folato ou algum composto derivado do folato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo feito por Huang *et al.* (2019), foi realizado um ensaio clínico com indivíduos com oligozoospermia e, ao mesmo tempo, com polimorfismos MTHFR, para determinar os efeitos do ácido fólico nos parâmetros seminais, sendo eles: dosagem de malondialdeído (MDA) seminal, fragmentação de DNA e taxa de nascidos vivos.

Foram reunidos 923 homens, com idades entre 21 e 47 anos, que sofrem de oligozoospermia - definida como baixa quantidade de espermatozoides no sêmen. Para confirmar esse diagnóstico, foram coletadas amostras de pelo menos 3 sêmens com contagem de espermatozoides abaixo de 15 milhões por mL de sêmen em um período de 6 meses. As esposas possuíam idades entre 23 e 36 anos e receberam uma avaliação completa quanto a infertilidade, para descartar fatores femininos associados. Então, foi realizada a determinação de polimorfismos dos genótipos MTHFR: C677T; A1298C; G1793A.

Após isso, os pacientes foram divididos pelo polimorfismo aleatoriamente em dois grupos: um de tratamento com ácido fólico e outro placebo. No período de 3 meses, o grupo que recebeu tratamento com ácido fólico recebeu a dosagem de 0,8 mg/dia e o grupo placebo recebeu cápsulas com amido. Para análise de sêmen foram seguidas as diretrizes da OMS (2010) e também foram analisados os níveis de malondialdeído (MDA) no sêmen e a fragmentação do DNA do esperma.

Na análise dos parâmetros seminais foi demonstrado que a concentração espermática, a contagem de espermatozoides, a motilidade progressiva e a proporção de espermatozoides com morfologia normal em pacientes homozigotos para o gene MTHFR C677T mostraram valores significativamente melhores em relação ao grupo placebo. Contudo, não houve diferenças significativas dos parâmetros em pacientes heterozigotos para o gene MTHFR C677T, homozigotos e heterozigotos para A1298C e G1793A e, ainda, em indivíduos com genótipo combinado C677T e A1298C antes e após o tratamento com o ácido fólico.

Em relação a concentração de MDA e DNA fragmentado no sêmen, em homozigotos para C677T, os números foram menores em comparação com o grupo placebo, mas não houve alterações consideráveis desses dois parâmetros, antes e após a suplementação de ácido fólico, em pacientes com outros polimorfismos. A diferença estatística nesses grupos não foi considerável.

Além disso, a chance de gravidez espontânea e a taxa de nascidos vivos tenderam a ser maiores no grupo homozigoto para C677T. Não houve diferenças significativas na taxa de gravidez espontânea e na taxa de nascidos vivos em casais nos quais os parceiros possuíam outro genótipo para o MTHFR, como heterozigose para C677T, homozigose e heterozigose para A1298C e G1793A ou, ainda, genótipo combinado C677T/A1298C, antes e depois da suplementação de ácido fólico.

Ledowsky *et al.* (2023) conduziram um compilado de estudos de caso referente às variações nas prescrições de folato para pacientes com polimorfismos genéticos MTHFR C677T e/ou A1298C, que consistiu em oferecer diferentes doses de 5-MTHF para pacientes que apresentavam tanto infertilidade quanto o diagnóstico de algum dos dois polimorfismos citados. A seleção dos profissionais que realizaram a prescrição foi por meio de formulário online. Eles enviaram informações e históricos de pacientes do sexo feminino para realizar a intervenção de cada caso. Os critérios de seleção para os pacientes envolvidos na pesquisa foram: possuir idade entre 20 e 49 anos, infertilidade comprovada por diagnóstico e apresentar algum dos polimorfismos genéticos para o gene MTHFR C677T ou A1298C.

Os dados foram coletados da pesquisa inicial através de um formulário de relato de caso para os profissionais participantes, na modalidade on-line, através de uma plataforma de pesquisa denominada Qualtrics. O formulário abordava as informações do paciente, histórico de fertilidade, polimorfismo e as prescrições anteriormente realizadas.

Ao todo foram analisados 12 casos. As participantes tinham idade entre 26 e 49 anos, onde apenas 16,67% não apresentaram histórico de aborto espontâneo, 58,33% não apresentaram falha na fertilização in vitro ou injeção intracitoplasmática de esperma e 66,67% não apresentaram infertilidade inexplicável. Além disso, mulheres heterozigotas para o gene MTHFR C677T foram mais predominantes na amostra, correspondendo a 41,67%, e, em seguida, indivíduos heterozigotos tanto para C677T quanto para A1298C, representando 33,33% da amostra, e, então, 16,67% eram heterozigotas apenas para A1298C. Apenas 8,33% da amostra eram homozigótica para C677T.

Na consulta inicial, algumas mulheres já realizavam o uso de suplementos com folato e apenas duas pacientes faziam uso do 5-MTHF. A orientação dos profissionais para a amostra foi evitar o consumo de alimentos enriquecidos com ácido fólico para que o efeito da suplementação

fosse apenas do 5-MTHF. Dessa forma, todos os profissionais prescreveram 5-MTHF com dose mínima de 500µg, máxima de 3.800µg. A prescrição de 5-MTHF variou para cada indivíduo. Algumas ainda receberam a suplementação de ácido folínico - que é uma forma derivada do 5-formil-THF, que posteriormente se transforma em 5-MTHF - junto com uma dose de 5-MTHF. Isso ocorreu em cinco pacientes, e a prescrição de ácido folínico foi entre a dose mínima de 450µg e 800µg de dose máxima.

Como resultado, foi relatado que 11 pacientes conseguiram engravidar durante o tratamento. No entanto, houve uma paciente que não apresentou histórico de gravidez e não concebeu durante o tratamento, e outra paciente conseguiu engravidar duas vezes, mas sofreu aborto durante o tratamento. Todas as pacientes que conseguiram engravidar conceberam dentro do prazo de dois a quatro meses após a prescrição. Além disso, a prescrição de 5-MTHF teve uma boa adesão e tolerabilidade. Nesse estudo, a suplementação de folato foi descontinuada e substituída por 5-MTHF ou uma combinação de 5-MTHF e ácido folínico, o que mostrou resultados positivos.

No estudo realizado por Aarabi *et al.* (2015), foi analisado o potencial da alta suplementação de ácido fólico - 5mg/dia - no tratamento da infertilidade idiopática masculina. O objetivo do estudo foi analisar como altas doses de folato podem alterar o epigenoma do esperma. Isso inclui observar como as altas doses de folato influenciariam a metilação do DNA espermático e, consequentemente, a expressão de proteínas importantes para a espermatogênese.

Para a realização desse estudo foi utilizado um grupo de 30 homens normozoospérmicos com polimorfismos no gene MTHFR C677T. Estes receberam diariamente doses altas de ácido fólico durante 6 meses. Foram coletadas amostras de sangue e de esperma dos indivíduos participantes na primeira semana de experimento e seis meses depois, no final do tratamento.

Após o período de tratamento, observou-se um aumento na concentração sanguínea de folato, sem alterações nos padrões bioquímicos analisados. Mesmo com o aumento na concentração, não houve nenhum efeito detectado relacionado ao genótipo MTHFR C677T. A alta suplementação causou melhora nos níveis de folato, mas não causou alterações significativas nos parâmetros espermáticos.

Outro resultado obtido foi a respeito da metilação de *loci* impressos no esperma, visto que permaneceu normal antes e após a suplementação de ácido fólico. Além disso, o estudo também traz resultados a respeito da perda global de metilação por meio do metiloma do esperma, sendo observado que ela é exacerbada em indivíduos homozigotos para C677T. A hipótese levantada no início do estudo era de que o fornecimento dessas altas doses de ácido fólico geraria aumento na disponibilidade de grupos metil, o que causaria aumento na metilação genômica. Porém, o

sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS) mostrou que houve uma pequena, porém significativa, diminuição na metilação de todos os azulejos analisados. Essa perda de metilação se mostrou significativa apenas em regiões intergênicas.

O estudo também trouxe resultados sobre CpGs - regiões do DNA onde um nucleotídeo citosina é seguido por um nucleotídeo guanina - individuais em regiões intergênicas serem mais suscetíveis a sofrerem alteração na metilação após a alta suplementação de ácido fólico. Viu-se que regiões genômicas específicas foram notadas como mais suscetíveis à suplementação realizada quando houve maior concentração de DMTs (azulejos diferentemente metilados). A maioria dessas alterações na metilação ocorreu em áreas repetidas do DNA espermático em seus elementos transponíveis, aproximadamente 70% dos DMTs se encontraram concentrados nessas regiões mencionadas. Ao final do estudo, observaram-se evidências de que a alta suplementação de folato promove alterações na metilação genômica em todo o DNA do esperma.

No ensaio clínico realizado por Clément *et al.* (2019) foi avaliado se o efeito da suplementação de 5-MTHF diminuía os níveis de homocisteína em indivíduos com infertilidade. Assim, quem possuía polimorfismos no gene MTHFR não sofreria com a diminuição da metilação do DNA por menor eficiência da MTHFR.

Indivíduos com infertilidade por 3 anos ou mais ou com 3 ou mais abortos espontâneos e com o polimorfismo C677T para o gene MTHFR foram selecionados. A intervenção consistiu em doses diárias de 600µg de 5-MTHF por 3 meses. Ainda, a homocisteína sérica foi avaliada antes e depois da intervenção. O grupo controle foi proposto apenas para homens homozigotos para o polimorfismo C677T que tinham suas parceiras homozigotas ou heterozigotas para o polimorfismo citado.

A amostra consistiu em 89 casais, sendo 50 heterozigotos (21 homens e 29 mulheres), 39 homozigotos (11 homens e 28 mulheres) e 72 indivíduos do tipo selvagem. Na amostra de casais analisada, observou-se que 24% das mulheres com polimorfismo MTHFR C677T eram homozigóticas, o que é maior que a média geral de 11,4% registrada por análises prévias do laboratório.

A concentração média de homocisteína, antes do tratamento, foi significativamente maior em pacientes homozigóticos (18,4 mmol/L) do que em heterozigotos (12,2 mmol/L). Esses números são ainda maiores do que os observados em pacientes do tipo selvagem (7,9 mmol/L). Após o tratamento, os níveis de homocisteína caíram de 12,2 mmol/L para 9,8 mmol/L em indivíduos heterozigotos e de 18,4 mmol/L para 10,5 mmol/L em homozigotos, sendo essa queda a mais expressiva ao representar uma redução de 42,7%. Ainda, observou-se que, ao fim do

tratamento, não houve diferença significativa na concentração média de homocisteína nos indivíduos homozigotos (10,5 mmol/L) e heterozigotos (9,8 mmol/L).

Assim, o estudo concluiu que casais com histórico persistente de infertilidade devem ser analisados para o diagnóstico de polimorfismos MTHFR associados à disfunção na concentração de homocisteína e, em caso necessário, devem ser tratados com doses adequadas de 5-MTHF em vez de altas doses de ácido fólico, as quais podem estar relacionadas a alta concentração de folato não metabolizado no sangue.

De acordo com os resultados observados nos estudos, a suplementação de folato não foi eficaz em melhorar os parâmetros seminais de indivíduos com polimorfismo no gene MTHFR, exceto naqueles com o polimorfismo MTHFR C677T em homozigose. Esse genótipo em homozigose possui menor eficiência enzimática para o MTHFR, tendo diminuição de sua eficácia em até 60% (CLEMENT *et al.*, 2019)

Acredita-se que apenas homozigotos para esse genótipo tiveram os parâmetros seminais melhorados devido à função antioxidante que o ácido fólico pode exercer, apesar do seu excesso no sangue produzir outros efeitos negativos. Salas-Huetos *et al.* (2017) mostram que a suplementação de antioxidantes melhora os parâmetros seminais em homens inférteis. Dessa forma, o folato protege a integridade do DNA espermático e impede o aumento do MDA nesses indivíduos (AARABI *et al.*, 2015; FABOZZI *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2019).

No entanto, apesar da melhora dos parâmetros seminais, a metilação do DNA espermático mostrou-se menor no metiloma espermático. Acredita-se que isso seja devido à ação da S-metil-adenosina inibindo a ação do MTHFR na formação de 5-MTHF e, consequentemente, diminuindo a metilação do DNA. São necessários mais estudos para entender como a suplementação de folato impacta no epigenoma do esperma (AARABI *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2019).

Por outro lado, os estudos demonstraram que a suplementação com 5-MTHF foi eficaz em melhorar os parâmetros relacionados à infertilidade. Isso ocorreu nos estudos de Clement *et al.* (2019) e Ledowsky *et al.* (2023), com a diminuição dos níveis de homocisteína em indivíduos com polimorfismo C677T após a suplementação e a melhora dos parâmetros de fertilidade em mulheres com histórico de falhas na concepção e de aborto espontâneo, respectivamente.

Acredita-se que os resultados positivos demonstrados com a suplementação de 5-MTHF se deve ao fato de que não seria mais necessário depender da eficiência enzimática da MTHFR para produzir a forma biologicamente ativa do folato. Além disso, a suplementação de 5-MTHF também resolve um problema que pode ser causado por altas doses de folato, que é o folato não metabolizado no sangue. Isso se deve ao fato da enzima MTHFR ser saturável para a quantidade de folato disponível e, dessa forma, o folato não convertido em THF permanecer no sangue e agir

como antagonista do MTHFR, pois há a inibição na síntese de purinas e competição com o 5-MTHF pelos receptores e transportadores de folato. No entanto, há poucos ensaios clínicos com a suplementação de 5-MTHF com o objetivo de melhorar parâmetros de infertilidade (CLEMENT *et al.*, 2019; FABOZZI *et al.*, 2022; LEDOWSKY *et al.*, 2023).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o exposto, é perceptível que a suplementação de folato não foi eficaz para a melhora do quadro de infertilidade associada à maioria dos polimorfismos MTHFR, excetuando-se a homozigose para C677T. Em contrapartida, a suplementação direta de 5-MTHF, forma biologicamente ativa do folato, mostrou-se promissora ao melhorar os parâmetros associados à infertilidade nos estudos apresentados. Essa combinação de dados dos estudos analisados sugere que a escolha do tipo de folato a ser suplementado e a quantidade pode ser crucial para os resultados obtidos nos casos específicos de infertilidade relacionados à nutrigenética.

Também se observou que há poucos estudos na literatura sobre a complexa interação entre o folato, os polimorfismos genéticos e a infertilidade, sendo necessárias mais pesquisas para compreender por que a suplementação de folato não foi eficaz nos outros polimorfismos e para identificar os fatores específicos que influenciam a resposta individual à suplementação.

REFERÊNCIAS

AARABI, M.; SAN GABRIEL, M. C.; CHAN, D.; BEHAN, N. A.; CARON, M.; PASTINEN. T.; BOURQUE, G.; MACFARLANE, A. J.; ZINI, A.; TRASLER, J. High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism. **Hum Mol Genet.**, v. 24, n. 22, p. 6301-6313, nov. 2015. DOI 10.1093/hmg/ddv338

ANTONIN, J. 1 in 6 people globally affected by infertility: **World Health Organization (WHO)**, 2023. Disponível em: https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility. Acesso em: 08 out. 2023.

CARSON, S. A.; KALLEN, A. N. Diagnosis and management of infertility: a review. **JAMA.**, v. 326, n. 1, p. 65-76, jul. 2021. DOI 10.1001/jama.2021.4788.

CLARE, C. E.; BRASSINGTON, A. H.; KWONG, W. Y.; SINCLAIR, K. D. One-carbon metabolism: linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. **Annu Rev Anim Biosci.**, v. 15, n. 7, p. 263-287, fev. 2019. DOI 10.1146/annurev-animal-020518-115206

CLÉMENT A.; MENEZO, Y.; COHEN, M.; CORNET, D.; CLÉMENT, P. 5-Methyltetrahydrofolate reduces blood homocysteine level significantly in C677T methyltetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphism carriers consulting for infertility. **J Gynecol Obstet Hum Reprod.**, v. 49, n. 1, p. 101622, jan. 2020. DOI 10.1016/j.jogoh.2019.08.005

FABOZZI, G.; VERDONE, G.; ALLORI, M.; CIMADOMO, D.; TATONE, C.; STUPPIA, L.; FRANZAGO, M.; UBALDI, N.; VAIARELLI, A.; UBALDI, F. M.; RIENZI, L.; GENNARELLI, G. Personalized nutrition in the management of female infertility: new insights on chronic low-grade inflammation. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1918, mai. 2022. DOI 10.3390/nu14091918.

GROPPER, S. S.; SMITH, J. L.; CARR, P. T. Advanced nutrition and human metabolism. 8. ed. Boston: Cengage. 2020. 634 p.

HUANG, W. J.; LU, X. L.; LI, J. T.; ZHANG, J. M. Effects of folic acid on oligozoospermia with MTHFR polymorphisms in term of seminal parameters, DNA fragmentation, and live birth rate: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Andrology**, v. 8, n. 1, jan. 2020. DOI 10.1111/andr.12652.

LEDOWSKY, C. J.; SCHLOSS, J.; STEEL, A. Variations in folate prescriptions for patients with the MTHFR genetic polymorphisms: A case series study. **Explor Res Clin Soc Pharm**, v. 10, p. 100277, mai. 2023. DOI 10.1016/j.rcsop.2023.100277.

LYON, P.; STRIPPOLI, V.; FANG, B.; CIMMINO, L. B vitamins and one-carbon metabolism: implications in human health and disease. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2867, set. 2020. DOI 10.3390/nu12092867.

SALA-HUETOS, A.; BULLO, M.; SALAS-SALVADO, J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 38, p. 371-379, jul. 2017. DOI 10.1093/humupd/dmx006.

SHULPEKOVA, Y.; NECHAEV, V.; KARDASHEVA, S.; SEDOVA, A.; KURBATOVA, A.; BUEVEROVA, E.; KOPYLOV, A.; MALSAGOVA, K.; DLAMINI, J. C.; IVASHKIN, V. The concept of folic acid in health and disease. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3731, jun. 2021. DOI 10.3390/molecules26123731

STARC, A.; TRAMPUS, M.; JUKIC, D. P.; ROTIM, C.; JUKIC, T.; MIVSEK A, P. Infertility and Sexual Dysfunctions: A Systematic Literature Review. **Acta Clin Croat.**, v. 58, n. 3, p. 508-515, set. 2019. DOI 10.20471/acc.2019.58.03.15.

WU, K.; KONG, F.; ZHANG, J.; TANG, Y.; CHEN, Y.; CHAO, L.; NIE, L.; HUANG, Z. Recent progress in single-nucleotide polymorphism biosensors. **Biosensors (Basel)**, v. 13, n. 9, p. 864, set. 2023. DOI 10.3390/bios13090864



CAPÍTULO 3

ATIVIDADE DAS ECTOENZIMAS E-NTPDASE E E-ADA DE LINFÓCITOS ISOLADOS DE ÓRGÃOS LINFOIDES PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS COMO MARCADORES IMUNOLÓGICOS NO DANO HEPÁTICO AGUDO

ACTIVITY OF ECTOENZYMES E-NTPDASE AND E-ADA FROM LYMPHOCYTES ISOLATED FROM PRIMARY AND SECONDARY LYMPHOID ORGANS AS IMMUNE MARKERS IN ACUTE LIVER DAMAGE

Pedro Henrique Doleski
Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia
E-mail: pedro.doleski@acad.ufsm.br

Douglas Gonçalves Friedrichs
Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.406

RESUMO

Investigamos os efeitos do dano hepático agudo induzido por tetracloreto de carbono (CCl4) na atividade de ectoenzimas (E-NTPDase e E-ADA) em linfócitos isolados de diferentes órgãos imunes, como também o efeito do extrato de silimarina, conhecido hepatoprotetor. O fígado dos animais induzidos com CCl4 apresentou processo inflamatório, já os animais previamente tratados com silimarina (CCl4+SIL) apresentaram redução significativa do processo inflamatório. O baço do grupo CCl4 demonstrou redução de peso, porém sem alterações histomorfológicas. No entanto, o grupo CCl4+SIL manteve o peso do baço a valores basais. A atividade E-NTPDase demonstrou elevação apenas nos linfócitos esplênicos do grupo CCl4. Na atividade E-ADA, observamos elevação em linfócitos medulares, sanguíneos e esplênicos. Não observamos modulações nos linfócitos mesentéricos. No grupo CCl4+SIL observamos uma redução da elevada atividade E-NTPDase e E-ADA causadas pela indução. Em suma, o dano hepático pode elevar a atividade de ectoenzimas em linfócitos, porém afetando diferentemente a atividade dos linfócitos isolados de cada órgão imune. Já o pré-tratamento com silimarina demonstrou potencial para proteger e restaurar essas funções. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão da patogênese do dano hepático, como também do potencial uso das ectoenzimas como alvos terapêuticos ou marcadores clínicos/imunológicos.

Palavras-chave: Ectoenzimas. Linfogênese. Lesão hepática. Linfócito. *Silybum marianum*.

ABSTRACT

We investigated the effects of acute liver damage induced by carbon tetrachloride (CCl4) on the activity of ectoenzymes (E-NTPDase and E-ADA) in lymphocytes isolated from different immune organs, as well as the effect of silymarin extract, a known hepatoprotector. The liver of animals induced with CCl4 showed an inflammatory process, whereas the group of animals previously treated with silymarin (CCl4+SIL) showed a significant reduction in the inflammatory process. The spleen of the CCl4 group demonstrated weight reduction, but without histomorphological changes. However, the CCl4+SIL group maintained spleen weight at baseline values. E-NTPDase activity demonstrated an increase only in splenic lymphocytes from the CCl4 group. In E-ADA activity, we observed an increase in medullary, blood and splenic lymphocytes. We did not observe modulations in mesenteric lymphocytes. In the CCl4+SIL group we observed a reduction in the high E-NTPDase and E-ADA activity caused by induction. In short, liver damage can increase the activity of ectoenzymes in lymphocytes, but it affects the activity of lymphocytes isolated from each immune organ differently. Pretreatment with silymarin demonstrated the potential to protect and restore these functions. These findings contribute to a better understanding of the pathogenesis of liver damage, as well as the potential use of ectoenzymes as therapeutic targets or clinical/immunological markers.

Keywords: Ectoenzymes. Lymphogenesis. Liver damage. Lymphocyte. *Silybum marianum*.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é composto por complexos mecanismos que atuam para proteger o organismo. Uma parte vital desse sistema é o uso de células imunológicas, que reconhecem patógenos, migram e apresentam antígenos. Entre os leucócitos, os linfócitos são capazes de modular a resposta imunológica através da secreção de citocinas. Além disso, são capazes de produzir anticorpos contra patógenos ou apresentar citotoxicidade a células infectadas ou alteradas (PISHESHA *et al.*, 2022). O processo de formação dos linfócitos começa com as células-tronco

hematopoiéticas, que se diferenciam em células progenitoras linfoides e, por fim, em diversas populações linfocitárias. Uma vez produzidas, são enviadas para órgãos imunes, como o baço e os linfonodos, ou para órgãos não imunes, como o fígado. Nestes tecidos, os linfócitos aguardam por possíveis infecções ou insultos teciduais (LUCAS, 2019). Desse modo, é de interesse avaliar os mecanismos relacionados à função dos linfócitos para seu uso como marcadores imunes mais eficientes na patogênese das doenças inflamatórias (TAKEDA *et al.*, 2017).

Entre os mecanismos capazes de modular a ação dos linfócitos, estão as purinas extracelulares (ATP e adenosina) que interagem com receptores específicos nos linfócitos. A alta sinalização desenvolvida pelo ATP estimula processos pró-inflamatórios, enquanto a sinalização adenosinérgica estimula efeitos anti-inflamatórios (DWYER, KISHORE; ROBSON, 2020). Assim, alterações na sinalização extracelular de purinas podem determinar os resultados do processo inflamatório. As ectonucleotidases são enzimas ancoradas à membrana celular com atividade catalítica voltada ao meio extracelular. Entre elas, em linfócitos temos a ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) que hidrolisa ATP extracelular, e a ecto-adenosina desaminase (E-ADA), que medeia a desaminação da adenosina extracelular (ALLARD *et al.*, 2017).

Os produtos naturais e os seus análogos estruturais têm, historicamente, dado uma contribuição para a farmacoterapia (ATANASOV *et al.,* 2021) O extrato de Silimarina é feito a partir da planta *Silybum marianum* L. Gaernt, e tem sido usado na medicina tradicional para tratar hepatites agudas, virais e induzidas por drogas e álcool. Esse extrato é composto por flavolignanas e flavonoides, sendo a silibinina o componente principal responsável pelos efeitos hepatoprotetores (BIJAK, 2017). Sendo assim, este estudo teve como objetivo principal avaliar a atividade das ectoenzimas presentes em linfócitos em diferentes locais do organismo, como os linfócitos do sangue, baço, medula óssea e linfonodos mesentéricos a fim de avaliar a participação dos linfócitos no dano hepático agudo induzido por tetracloreto de carbono (CCl4) .

2 METODOLOGIA

2.1 Experimento In Vivo

Realizamos um experimento in vivo com 50 animais (sob protocolo: 8413040618-CEUA UFSM), divididos em três grupos: o grupo de controle (n = 6), o grupo com dano hepático induzido por tetracloreto de carbono (CCl4) (n = 6), e o grupo pré-tratado com extrato de Silimarina e induzido (CCl4+SIL) (n = 6). O grupo CCl4+SIL recebeu tratamento intragástrico com extrato de Silimarina (50 mg/kg) por 30 dias. No 31º dia, todos os animais dos grupos CCl4 e CCl4+SIL foram submetidos a um modelo experimental de dano hepático agudo através da administração intraperitoneal de tetracloreto de carbono (CCl4) (0,5 ml/Kg). Após 12 horas, os animais foram

eutanasiados utilizando isoflurano para aprofundamento cardiorrespiratório. Foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca e também coleta do fígado, baço, medula óssea e linfonodos mesentéricos para o isolamento dos linfócitos teciduais.

2.2 Protocolo para isolamento de linfócitos

Os linfócitos foram isolados por método de centrifugação e gradiente de densidade conforme descrito por Doleski *et al.*, (2021) para linfócitos mesentéricos, medulares e esplênicos. Para o isolamento de linfócitos sanguíneos conforme método descrito por Böyum (1968).

.

2.3 Determinação da atividade enzimática da E-NTPDase e E-ADA

A atividade enzimática da E-NTPDase nos linfócitos isolados foi realizada por ensaio colorimétrico, através da quantificação do fosfato inorgânico liberado na reação de hidrólise dos nucleotídeos (E-NTPDase) e desaminação de adenosina (E-ADA). A metodologia para linfócitos sanguíneos foi realizada segundo Leal *et al.* (2005), enquanto a metodologia para as outras células, conforme metodologia descrita por Doleski *et al.* (2021).

2.4 Análise histomorfológica do fígado e baço

Fragmentos de fígado, baço e linfonodos mesentéricos foram dissecados e fixados em formalina neutra tamponada a 10%. Após a fixação, as amostras foram cortadas, processadas rotineiramente e incluídas na parafina. Secções de tecido (3-5 μm) foram preparadas e coradas rotineiramente com hematoxilina e eosina (H&E). As secções histológicas foram observadas sob um microscópio de luz (Olympus BX31). Cada caso foi classificado em um grau específico de acordo com o grau das lesões observadas (Tabela 1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os valores da relação entre o peso dos órgãos (baço e linfonodo mesentérico) e o peso corporal de cada animal. Os dados mostram uma menor razão entre o peso do baço e o peso corporal dos ratos.

Tabela 1 – Razão baço (g) e linfonodos (g)/ peso corporal (g)

Órgão	CTRL	CCl4	CCl4+SIL
Linfonodos (g) / Peso Corporal (g)	2,337 +- 0,106	2,128 +- 0,136	2,370 +- 0,205
Baço (g) / Peso Corporal (g)	3,214 +- 0,143	2,881 +- 0,218*	3,046 +- 0,140

A tabela apresenta dados que demonstram a relação entre o peso do baço (g), o peso dos linfonodos (g) e o peso corporal (g) em diferentes grupos de animais experimentais (CTRL, CCl4, CCl4+SIL). Não foi observado uma alteração significativa no tamanho relativo do baço e dos linfonodos em relação ao peso corporal entre os grupos.

O baço é um órgão imune conectado à corrente sanguínea, e seu aumento de tamanho pode ser indicativo de uma ativação imunológica sistêmica. Sabe-se que, em condições inflamatórias hepáticas, as células imunes do fígado provêm diretamente do baço, e não da medula óssea, como em geral acontece para outros órgãos (MANDAL *et al.*, 2016). Esse elo fígado-baço está relacionado à conexão circulatória destes dois órgãos e à habilidade do baço a responder a fatores imunes derivados do fígado. Sendo assim, é possível que a redução no peso do baço seja devido ao processo migratório de células imunes para o tecido hepático. É importante ressaltar que não encontramos nenhuma alteração histológica no baço de nenhum grupo analisado. Notavelmente, os ratos pré-tratados com silimarina apresentam níveis basais da relação baço/peso corporal, demonstrando que o tratamento é capaz de atenuar a redução esplênica. Tal efeito está possivelmente relacionado à capacidade da silimarina em reduzir o dano hepático, e, consequentemente, as alterações no tecido esplênico. Em relação aos linfonodos mesentéricos, não se observou diferença significativa entre os grupos analisados. Este resultado está possivelmente relacionado à anatomia dos linfonodos mesentéricos, os quais não estão conectados ou são sensíveis aos estímulos produzidos pelo dano hepático.

A tabela 2 fornece dados histomorfológicos do fígado dos três grupos experimentais, dividida em quatro parâmetros (lesão, degeneração, inflamação e necrose tecidual). O grupo CCl4 teve um aumento significativo, quando comparado com o grupo controle, em todos os parâmetros analisados e isso pode ser explicado pelo efeito hepatotóxico do CCl4, o qual já é conhecido na literatura.

Tabela 2 – Análise histomorfológica do fígado.

Escore	CTRL	CCl4	CCl4+SIL
Grau de lesão	0 +- 0,0	3,000 +- 0,894a	1,500 +- 0,547b
Degeneração	0 +- 0,0	2,667 +- 0,516a	1,500 +- 0,547b
Inflamação	0 +- 0,0	1,667 +- 0,516a	0,666 +- 0,516b
Necrose	0 +- 0,0	2,167 +- 0,983a	0,833 +- 0,752b

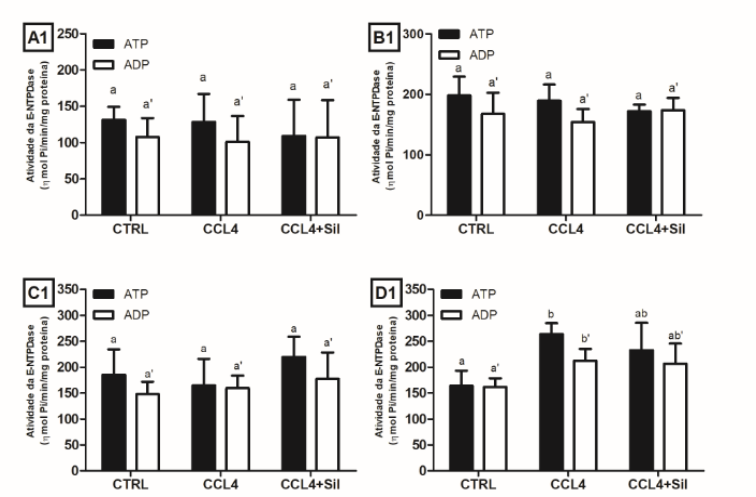
Os valores representam a média ± desvio padrão para os escores histopatológicos do Grau de lesão, degeneração, inflamação e necrose. Diferentes letras nos gráficos denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0.05$) por ANOVA de 1 via seguida de teste Bonferroni post-hoc. Média ± Desvio Padrão. (n = 6)

Em contrapartida, o grupo induzido e tratado com o extrato de silimarina apresentou uma diminuição de todos os escores, quando comparado ao grupo apenas induzido, o que pode ser compreendido pelo efeito de desintoxicação hepática do extrato, uma vez que os flavonoides presentes podem reduzir a inflamação, além de apresentarem efeitos antioxidantes e como um

estimulante à regeneração das células do fígado. A histomorfologia do baço e dos linfonodos mesentéricos não foram alteradas, porque o CCl4 é metabolizado no fígado.

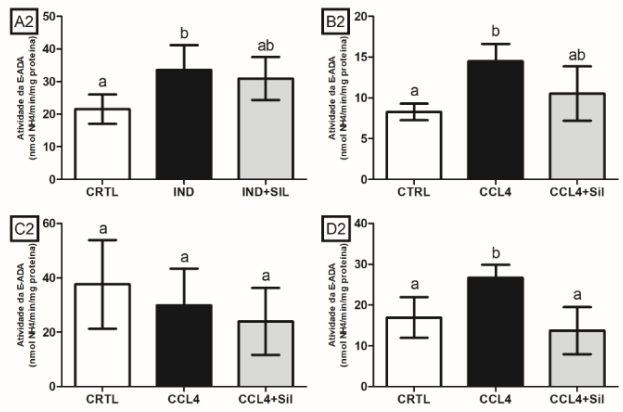
Os resultados apresentados indicam diferenças notáveis na atividade de enzimas relacionadas à hidrólise de nucleotídeos e na desaminação de adenosina em diferentes grupos de linfócitos em resposta ao dano hepático, bem como à administração prévia ao dano com extrato de silimarina (Figura 1 e Figura 2).

Figura 1: Atividade da E-NTPDase em linfócitos isolados de sangue (A1), medula óssea (B1), linfonodos mesentéricos (C1) e baço (D1).



Diferentes letras (a e b) nos gráficos denotam diferença estatística entre os grupos, ab não demonstra diferença estatística entre a ou b ($P < 0.05$). Diferenças significativas entre os grupos para hidrólise de ATP são denominados com letras sem linhas (a, b e ab). e para hidrólise de ADP com letras com linhas (a', b' e ab'). ANOVA de 1 via seguida de teste Bonferroni post-hoc. Média ± Desvio Padrão. (n = 6)

Figura 2: Atividade da E-ADA em linfócitos isolados de sangue (A2), medula óssea (B2), linfonodos mesentéricos (C2) e baço (D2).



Diferentes letras (a e b) nos gráficos denotam diferença estatística entre os grupos, ab não demonstra diferença estatística entre a ou b ($P < 0.05$). ANOVA de 1 via seguida de teste Bonferroni post-hoc. Média ± Desvio Padrão. (n = 6)

A atividade da E-NTPDase (Figura 1 - gráfico A1) nos linfócitos sanguíneos não demonstrou diferença significativa entre os grupos analisados, sugerindo que a sinalização

desenvolvida pelo ATP não foi afetada pelo dano hepático ou pelo tratamento com extrato de silimarina na corrente sanguínea. Já em relação à atividade da E-ADA (Figura 2 - gráfico A2), nos linfócitos sanguíneos houve um aumento significativo na desaminação da adenosina entre o grupo controle e o grupo CCl4. Sendo assim, os linfócitos sanguíneos elevam a degradação de adenosina em sua superfície e, consequentemente, reduzindo seus efeitos anti-inflamatórios nestas células. A E-NTPDase inalterada mantém o sinal pró-inflamatório (ATP) enquanto a elevada atividade da E-ADA reduz o sinal anti-inflamatório (Adenosina). Interessantemente, uma pequena redução na atividade da E-ADA nos animais induzidos e tratados com silimarina foi observada, possivelmente devido à redução no dano hepático e suas consequentes modulações na corrente sanguínea.

Também não foi observada diferença significativa na hidrólise de ATP e ADP pela E-NTPDase nos linfócitos medulares entre os grupos analisados (Figura 1 - gráfico B1), mas uma elevação significativa na atividade da E-ADA no grupo CCl4 quando comparado com o grupo controle (Figura 2 - gráfico B2). Além disso, novamente encontramos uma pequena redução na atividade da E-ADA nos linfócitos medulares do grupo tratado com silimarina. Este perfil de atividade, com E-NTPDase inalterada e aumento na E-ADA, sugere que a sinalização adenosinérgica está reduzida na medula óssea em resposta ao dano hepático, resultando em elevação no marcador linfocitário.

Os linfócitos mesentéricos também não apresentaram alterações na hidrólise de ATP e ADP pela E-NTPDase entre os grupos, indicando estabilidade na atividade enzimática. Além disso, também não apresentaram diferença significativa na desaminação da adenosina pela E-ADA, sugerindo que essa função permaneceu inalterada. Logo, os resultados demonstram que os linfonodos mesentéricos não são modulados e, consequentemente, não participam da patogênese do dano hepático agudo.

Os linfócitos esplênicos apresentaram alterações na atividade das duas ectoenzimas avaliadas. A hidrólise de ATP e ADP pela E-NTPDase (Figura 1 - gráfico D1) no grupo induzido com CCl4 apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o dano hepático elevou a capacidade dos linfócitos esplênicos de hidrolisar estes nucleotídeos. A desaminação pela E-ADA, expressa no gráfico D2, no grupo induzido com CCl4 também apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo controle, indicando que a sinalização adenosinérgica foi alterada. A elevação na atividade da E-NTPDase e E-ADA, modulada pelo dano hepático, sinaliza linfócitos com uma elevada habilidade de remover o sinal pró-inflamatório (ATP) e do sinal anti-inflamatório (adenosina). Este efeito dual possivelmente está relacionado à proximidade do baço com o tecido hepático danificado, o qual libera inúmeros fatores imunes, incluindo ATP. A fim de evitar uma ação exacerbada, os linfócitos esplênicos

elevam a atividade da E-NTPDase e regulam os níveis de ATP enviados pelo fígado. Notavelmente, o tratamento com extrato de silimarina no grupo induzido ao dano hepático com CCl4 e tratado com o extrato de silimarina se comportou de maneira semelhante ao grupo controle em relação à hidrólise de ATP e ADP e à desaminação da adenosina. Isso sugere que o extrato de silimarina pode ter atenuado os efeitos adversos do dano hepático nos linfócitos esplênicos.

4 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo fornece evidências de que o dano hepático agudo induzido por CCl4 pode afetar a atividade de ectoenzimas em linfócitos isolados de diferentes órgãos imunes. Tais modulações podem resultar em alterações na sinalização celular e efeitos *in situ* destas células em cada tecido. Logo, o dano hepático agudo é capaz de induzir efeito esplênico (órgão anexo) e efeitos sistêmicos (medula óssea e sangue) na resposta imunológica. O pré-tratamento com extrato de silimarina, que apresentou importantes efeitos hepatoprotetores, foi capaz de reverter a atividade das ectoenzimas a valores basais, demonstrando que as ectoenzimas de linfócitos podem ser de grande valia como marcadores da modulação imunológica em processos patológicos. Essas descobertas contribuem para uma compreensão mais aprofundada dos efeitos do dano hepático nas funções imunológicas dos linfócitos residentes de diferentes locais do organismo. Futuros estudos podem ser necessários para explorar os mecanismos subjacentes a essas alterações e a eficácia de intervenções terapêuticas, como a silimarina, em contextos clínicos mais amplos.

REFERÊNCIAS

ALLARD, B. *et al.* The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological Reviews**, v. 276, n. 1, p. 121–144, mar. 2017. DOI 10.1111/imr.12528.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, mar. 2021. DOI 10.1038/s41573-020-00114-z.

BIJAK, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (Silybum marianum L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1942, 10 nov. 2017. DOI 10.3390/molecules22111942.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77–89, 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>

DOLESKI, P. H. *et al.* Distinct kinetics for nucleotide hydrolysis in lymphocytes isolated from blood, spleen and cervical lymph nodes: Characterization of ectonucleotidase activity. **Cell Biochemistry and Function**, v. 39, n. 4, p. 511–520, 29 mar. 2021. DOI 10.1002/cbf.3616.

DWYER, K. M.; KISHORE, B. K.; ROBSON, S. C. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 9, p. 509–524, 8 jul. 2020. DOI 10.1038/s41581-020-0304-7.

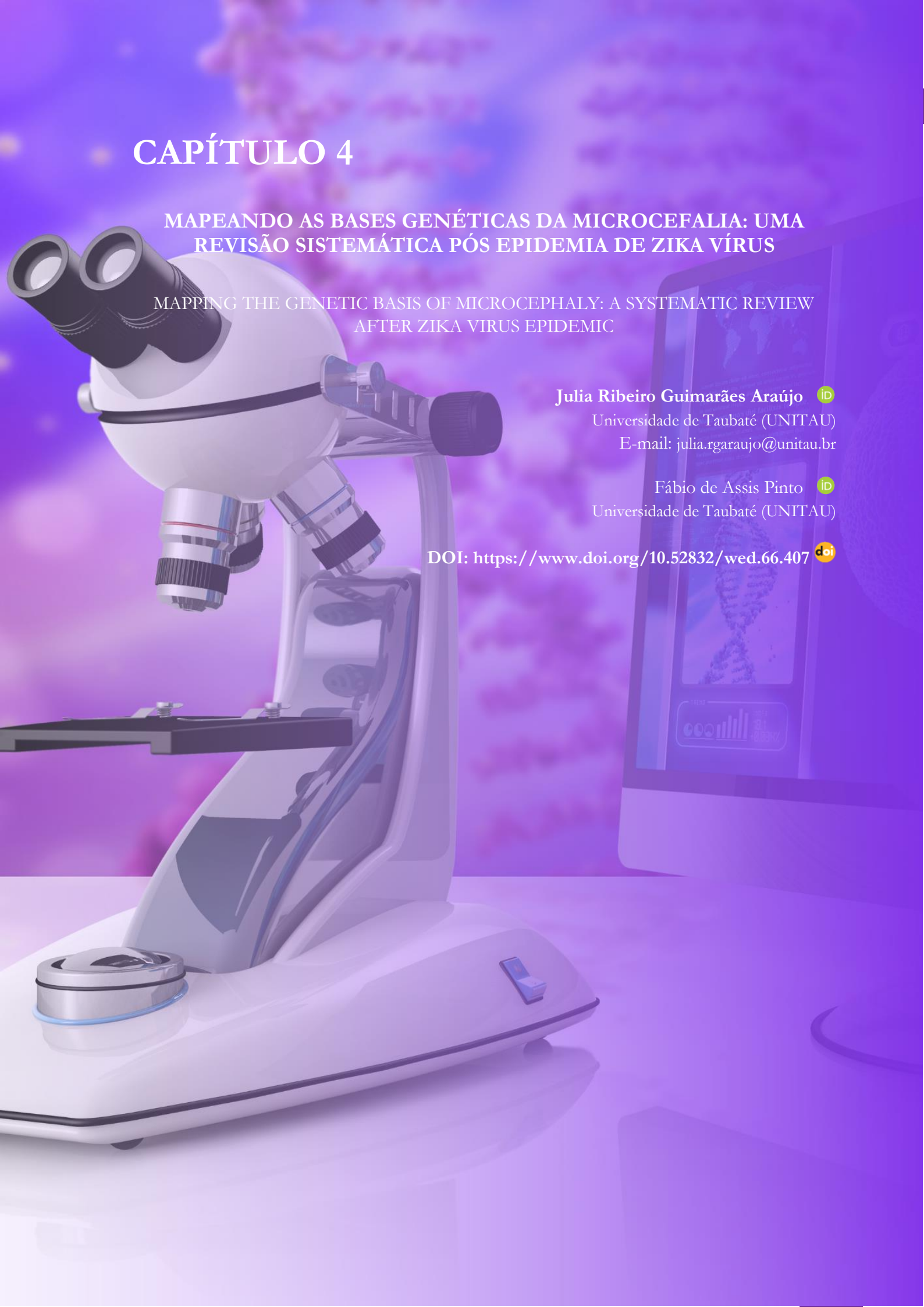
LEAL, D. B. R., *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 9-15, 2005 DOI 10.1016/j.bbagen.2004.09.006.

LUCAS, D. Leukocyte Trafficking and Regulation of Murine Hematopoietic Stem Cells and Their Niches. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 5 mar. 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.00387.

MANDAL, M. *et al.* The spleen as an extramedullary source of inflammatory cells responding to acetaminophen-induced liver injury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 304, p. 110–120, ago. 2016. DOI 10.1016/j.taap.2016.04.019.

PISHESHA, N.; HARMAND, T. J.; PLOEGH, H. L. A guide to antigen processing and presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, p. 1–14, 13 abr. 2022. DOI 10.1038/s41577-022-00707-2.

TAKEDA, A., SASAKI, N., MIYASAKA, M. The molecular cues regulating immune cell trafficking. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, v. 93, p.183-195, 2017. DOI 10.2183/pjab.93.012.



CAPÍTULO 4

MAPEANDO AS BASES GENÉTICAS DA MICROCEFALIA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA PÓS EPIDEMIA DE ZIKA VÍRUS

MAPPING THE GENETIC BASIS OF MICROCEPHALY: A SYSTEMATIC REVIEW AFTER ZIKA VIRUS EPIDEMIC

Julia Ribeiro Guimarães Araújo
Universidade de Taubaté (UNITAU)
E-mail: julia.rgaraujo@unitau.br

Fábio de Assis Pinto
Universidade de Taubaté (UNITAU)

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.407

RESUMO
A microcefalia gera graves consequências neurológicas e possui herança multifatorial. Com base na permanência do registro de novos casos, fora do contexto da epidemia de zika vírus, o objetivo deste trabalho é identificar o cenário das publicações sobre bases genéticas dessa condição, do aumento à atualidade. A seleção de bancos de artigos no CAPES CafE precedeu a aplicação de PRISMA, sem metanálise, no material disponível. Adicionais refinamentos de busca contam com palavras-chave, no período de 2015 a 2023, desconsiderando trabalhos incompatíveis com o objetivo, seja pelo resumo ou pelo texto completo, até à escolha final de artigos para revisão sistemática. Após a epidemia, fatores genéticos justificam o aparecimento de novos casos de microcefalia. Das variáveis quantias de artigos por plataformas, 240 trabalhos resultantes do método aplicado na amostra (2683), sendo as publicações sobre microcefalia secundária homozigota as mais frequentes (33,33%). Dentre os 200 genes retratados, os mais recorrentes são WDR62 e ASPM (13 artigos cada) e CASK em 9: reconhecidos pela microcefalia primária homozigota. Artigos sobre o tema caminham em direção ao registro de novas mutações e ao maior conhecimento sobre genes relacionados à microcefalia e colaboram com novas descobertas.

Palavras-chave: Herança multifatorial. Malformações congênitas. MCPH.

ABSTRACT
Caused by multifactorial inheritance, Microcephaly leads to substantial neurological consequences. As new cases are continuously recorded - aside from the Zika virus epidemic context - this work aims to identify the scenario of publications on the genetic basis for this condition, from its increase to present days. The selection of article databases at CAPES CafE preceded the application of PRISMA - without meta-analysis - on the available material. Additional search refinements include keywords, in the period of 2015 to 2023 for reading search, disregard incompatible articles - either abstract or full text not related to this article's goal - and final choice of articles for systematic review. After the epidemic, genetic factors justify the appearance of new cases of microcephaly. From the variable amounts of articles per platform - 240 works resulted after the application of the method in the sample (2683) - publications on homozygous secondary microcephaly are the most frequent (33.33%). Among the 200 genes portrayed, the most recurrent are WDR62 and ASPM (13 articles each) and CASK in 9: recognised by homozygous primary microcephaly. Articles on the topic move towards the registration of new mutations and greater knowledge about genes related to microcephaly, contributing to new discoveries.

Keywords: Multifactorial inheritance. Congenital abnormalities. MCPH.

1 INTRODUÇÃO

A microcefalia (q02 no CID, Classificação Estatística Internacional de Doenças), caracterizada pelo desenvolvimento comprometido da massa encefálica, pode ser identificada através da medição do perímetro craniano, logo no primeiro trimestre, através de ultrassons intra-uterinos, quando se obtém valores abaixo das médias referentes ao período de desenvolvimento do nascituro (TRIGO, 2017).

Diante de bases genéticas de herança multifatorial ou de quadros infecciosos, essa condição congênita, primária ou secundária, desencadeia complicações neurológicas que permanecem por toda a vida do indivíduo acometido. Independentemente da causa, a microcefalia é um diagnóstico

que se relaciona com a redução da qualidade de vida ao recém-nascido e com sua longevidade (OLIVEIRA *et al.* 2019).

Durante o período gestacional, sabe-se que tal malformação pode, ou não, correlacionar-se a outras deformidades no feto, o que caracteriza, respectivamente, a microcefalia secundária e primária, doença cujas origens, também, podem estar associadas aos complexos efeitos do vírus de zika (PLATT; MINER, 2017).

Aspectos psicológicos, sociais e demográficos que se dialogam sob a perspectiva comum do recém nascido que necessitará de atendimento especializado e de demais condições especiais para sua sobrevida representam um grupo de artigos não abordados por este trabalho. Porém, são salientados pela importância no meio acadêmico e no meio social da comunidade impactada pelos casos de microcefalia congênita.

Sabe-se que as infecções por Zika vírus (ZIKAV), assim como suas consequências, estabeleceram no passado uma condição temporal para se encontrar análises produzidas, uma vez que houve um incentivo pelo conteúdo científico-acadêmico diante das necessidades da população acometida e dos órgãos ligados à saúde.

Principalmente entre 2015 a 2017, o período epidêmico da patogenia representa quando o aumento do número de nascidos vivos com a condição foi observado. Todavia, antes mesmo de 2015 e no período de 2018 até o ano de 2021, esse último delimitado em relação à disponibilidade dos dados públicos do DataSUS para consultas, anualmente, observa-se a existência de novos casos e a consequente permanência da busca pela compreensão dos outros fatores, além do viral, no contexto de desenvolvimento fetal.

Por sua vez, a investigação das bases genéticas dessa herança multifatorial é assunto de milhares de artigos e é tópico central deste trabalho, que aborda resultados de um subgrupo de trabalhos extraídos a partir do extenso conjunto. Inclusive, demonstra-se a existência de critérios a serem detalhados na porção da metodologia deste artigo.

Evidencia-se aqui o foco nas condições de malformação do sistema nervoso em geral, o que pode ser denominado de microcefalia sindrômica ou secundária e que difere de alterações neurometabólicas cujas consequências incluem a redução da massa encefálica (KEMPÍNSKA *et al.*, 2022) e, principalmente, de síndromes genéticas (com deformidades em demais sistemas do organismo, por exemplo, circulatório ou urogenital) com aparecimento de microcefalia, e nos casos relatados, que exemplificam a correlação sintomática com as alterações no genoma dos respectivos indivíduos (ELMAS; YILDIRIM, 2020).

Do genótipo ao fenótipo, os dados no OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, em Português, Herança Mendeliana no Homem Online) direcionam-se a essa relação, como descrito no próprio *website* (OMIM, 2023).

Continuamente retomado pela literatura, o trabalho do Dr. Victor A. McKusick é mantido atualizado, diariamente, por conjunto de recursos literários. Mas, apesar do catálogo genético acompanhar a produção científica, cabe ao pesquisador salientar a importância e a relevância daquilo contido no portal e, principalmente, produzir conteúdo que ora colabore com enriquecimento do compêndio, ora forneça interpretações plausíveis sobre a correlação inicial da base genética à suas expressões no organismo.

Dessa forma, a serem obtidas a partir, por exemplo, de métodos revisão sistemática, as informações que extrapolam os propósitos do OMIM podem, até mesmo, implicar no direcionamento de pesquisas, assim como a escolha que considere artigos sobre casos clínicos e demais informações abstraídas pela literatura, aqui feito com detalhes, posteriormente, nos métodos.

Nessa parte, como descrita adiante, a execução de análise, com identificação das formas primárias e secundárias, do aparecimento da microcefalia (e demais sintomas e sinais) nos casos (ASIF *et al.*, 2023), assim como de condições ligadas ao neurodesenvolvimento, ao neurometabolismo e à malformações, que contam com suas base genéticas correlacionadas a ela (JAMUAR; WALSH, 2015), pretende analisar aquilo que ainda não se considera por parte do OMIM.

Nesse contexto, com a aplicação da metodologia PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses, em Português, itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises) no conteúdo obtido, estabelece-se o objetivo deste trabalho: analisar o percurso das publicações sobre as bases genéticas dos casos de microcefalia congênita humana, prevalentes em relação aos casos oriundos de consequências da infecção materna por zika vírus após 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

2 METODOLOGIA

Inicialmente, as informações contidas no DataSUS representaram auxílio, com dados disponíveis, para delimitação do período das publicações a serem consideradas.

O acesso ao portal de periódicos CAPES CafE deu-se como forma de obter, numericamente, os registros da literatura dentre as mais acessadas bibliotecas digitais. Desse modo, pode-se verificar que as plataformas PubMed (e PubMed Central), Web of Science, DOAJ

(Directory of Open Access Journals), Ovid, Wiley e ScienceDirect (Elsevier) concentravam a maior parte do conteúdo.

A obtenção das quantias surgiu a partir do uso dos operadores lógicos (E, NÃO e OU), juntamente com a restrição para seleção somente de artigos (dentre opções de materiais), com a determinação do período de 2015 a 2023 com os seguintes descritores em Português: microcefalia, genética, zika e pós-natal.

Todavia, o processo foi reaplicado nas respectivas bibliotecas supracitadas, diante do maior sucesso com a quantia de artigos disponíveis a partir do uso das *keywords* (palavras-chave em Inglês): *microcephaly*, *genetics, zika* e *postnatal.* Esses itens foram acompanhados pelos mesmos operadores lógicos na outra língua: AND, NOT e OR.

A diferença da quantia de trabalhos com a busca em Português e em Inglês desencadeou na adesão aos termos em língua estrangeira, no aprofundamento da busca e na adição das palavras-chave *diabetes*, *zebrafish,* e *mouse* para melhores refinamentos diante dos artigos desejados e, sobretudo, diante do objetivo da pesquisa. Esses novos termos, ainda, foram submetidos às limitações das plataformas com o número máximo de indicadores possíveis para serem utilizados simultaneamente (7 palavras-chave com 7 operadores lógicos).

Conforme o método PRISMA, todo o material captado, então, foi submetido a uma sequência de requisitos para o rastreamento, outra para a decisão de leitura do texto em sua forma completa e uma última para contemplação do conteúdo na íntegra, precedente da formação doo grupo final.

Em relação ao primeiro passo, os registros definidos resultaram exclusões pela inelegibilidade, segundo ferramentas de automação intrínsecas aos bancos de artigos. Já conforme a decisão de leitura, os *abstracts* (em Português, resumo) permitiram a desconsideração de itens diante da incompatibilidade temática abordada por este trabalho. A partir dos artigos observados em sua forma de texto completo, exclusões resultaram no grupo final incluso na revisão sistemática subsequentes.

Detalhadamente, a segunda etapa levou em consideração mais palavras-chave. Identificadas logo no resumo, representaram a adequação final do material consultado à temática do trabalho, especialmente em consideração ao limite imposto pelas plataformas de banco de artigos em relação ao número de *keywords* na pesquisa à fonte (e seus respectivos operadores lógicos).

Esses termos podem ser exemplificados com *dysmorphic features*, *shark* e *virus*, respectivamente, como elementos característicos de malformações generalizadas e, portanto, distantes do contexto de mal desenvolvimento encefálico procurado na literatura; descritores de outras espécies centrais às publicações e não relacionados à espécie humana, o que foge ao escopo

deste próprio, e marcadores presentes em outras origens da microcefalia congênita, divergentes das considerações genéticas adotadas.

Além das palavras-chave, pela leitura dos resumos, a identificação de abordagem de assunto que distancia do objetivo deste trabalho, como considerações a nível molecular (explicações sobre enzimas, proteínas, cromossomos, mutações, entre outros), experimental (principalmente, *in vitro*) ou restrito às análises fenotípicas e causais (como de grupos familiares e suas consanguinidades e de regiões geográficas) foram igualmente agrupados à exclusão.

Ainda, as especificações da terceira parte englobam aquelas obras que, diferentemente dos *abstracts* acima, foram eliminadas por divergirem do desejado, assim que lidas na íntegra. A não contemplação incluiu considerações semelhantes às supracitadas, apenas sem a observação desse conteúdo no que estava contido em sua forma reduzida, e do uso exclusivo de modelos experimentais ou não humanos ao decorrer das demais seções, que compõem o todo.

O grupo final, relativo àquilo que foi lido por completo, conta com a observação de seu material em relação às necessidades específicas da revisão sistemática frente aos objetivos gerais. Dessa forma, resultados qualitativos e quantitativos dos autores permitiram a obtenção da próxima seção.

Nessa parte, descrita adiante, foi executada análise que contou com a identificação das formas primárias e secundárias do aparecimento da microcefalia (e demais sintomas e sinais) nos casos, assim como pela apresentação de evolução progressiva da piora do quadro encefálico e sua correlação com base genética.

Em seguida, o detalhamento dos genes relacionados com os citados tipos de microcefalia e a forma como se expressam, genotípica e fenotipicamente, puderam averiguar a incidência de trabalhos com os relatos de casos e as relações práticas da gravidade dos sintomas a depender dessas classes técnicas delimitadas nos próprios artigos, sem a consideração individualizada dessa sintomática, a distanciar de análises clínicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento do número de nascidos vivos com microcefalia pode ser observado, principalmente, entre 2015 e 2017, período epidêmico do ZIKAV (Tabela 1). Esses dados públicos do DataSUS delimitam o período mais antigo (anterior a 2015) e o segundo, de 2018 aos dias atuais, e apesar dos limites de 2021 quanto à consulta justificam, diante da existência de novos casos, a consequente permanência da busca pela compreensão dos outros fatores, além do viral, existentes no contexto de desenvolvimento fetal.

Com o período e demais itens delimitados (como constam na metodologia), a consulta às

plataformas gerou os valores de suas respectivas publicações (incluso repetições), contidos em diferentes proporções absolutas e relativas, como mostra a Tabela 2. Esses números justificam a escolha por considerarem 80% (total de 2683 sem repetições) das publicações disponíveis diante do total de 3332 obtido quando somados demais bancos de artigos.

Tabela 1 – Distribuição dos casos de microcefalia por ano

Ano	Número de registros
2014	163
2015	1758
2016	2276
2017	561
2018	453
2019	366
2020	335
2021	300
Total	**6212**

Fonte: Adaptado de DataSUS (2023).

Tabela 2 – Artigos por plataformas segundo Capes CafE (repetições inclusas).

PLATAFORMAS	VALORES ABSOLUTOS	VALORES RELATIVOS
PubMed	2425	35%
Web of Science	1339	19%
DOAJ	1087	16%
Ovid	922	13%
Wiley	643	9%
ScienceDirect	505	7%
	6921	**100%**

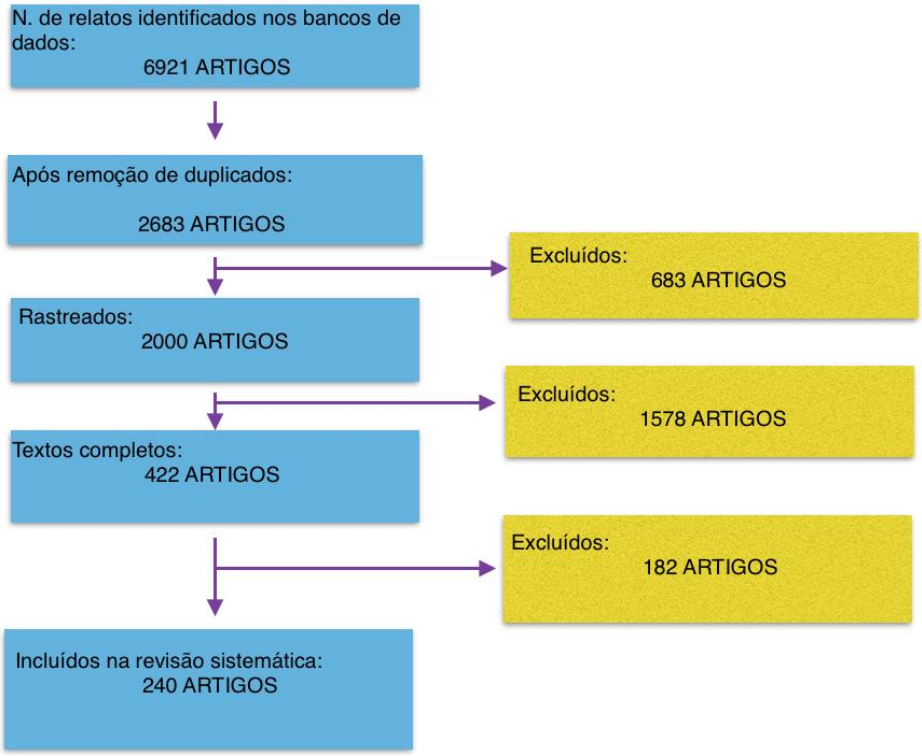
Fonte: Adaptado de CAPES CafE (2023

A expressiva diferença entre 75 e 7043 artigos com repetições, respectivamente, obtidos nas buscas com palavras-chave e *keywords* justificam a escolha da língua inglesa adotada para investigação, assim como, esses novos termos, somados às limitações das plataformas com a quantia de indicadores possíveis para serem utilizados simultaneamente (7 palavras-chave no máximo com seus 7 operadores lógicos), resultaram nos 6921 artigos com repetições.

Já a execução da metodologia PRISMA gerou resultados que podem ser representados pelo fluxograma característico (Figura 1). Especificamente, com os valores de artigos incluídos e excluídos em cada parte, processos definidos e registrados pela metodologia, obtém-se uma

visualização geral do processo.

Figura 1 – Fluxograma com etapas PRISMA e números de artigos



Fonte: Autora (2023).

Além dos registros definidos pela inelegibilidade, que resultaram em 683 exclusões, os abstract permitiram a desconsideração de 1578 itens, pelas palavras-chave e, igualmente, pelo assunto, caso divergentes do propósito deste trabalho.

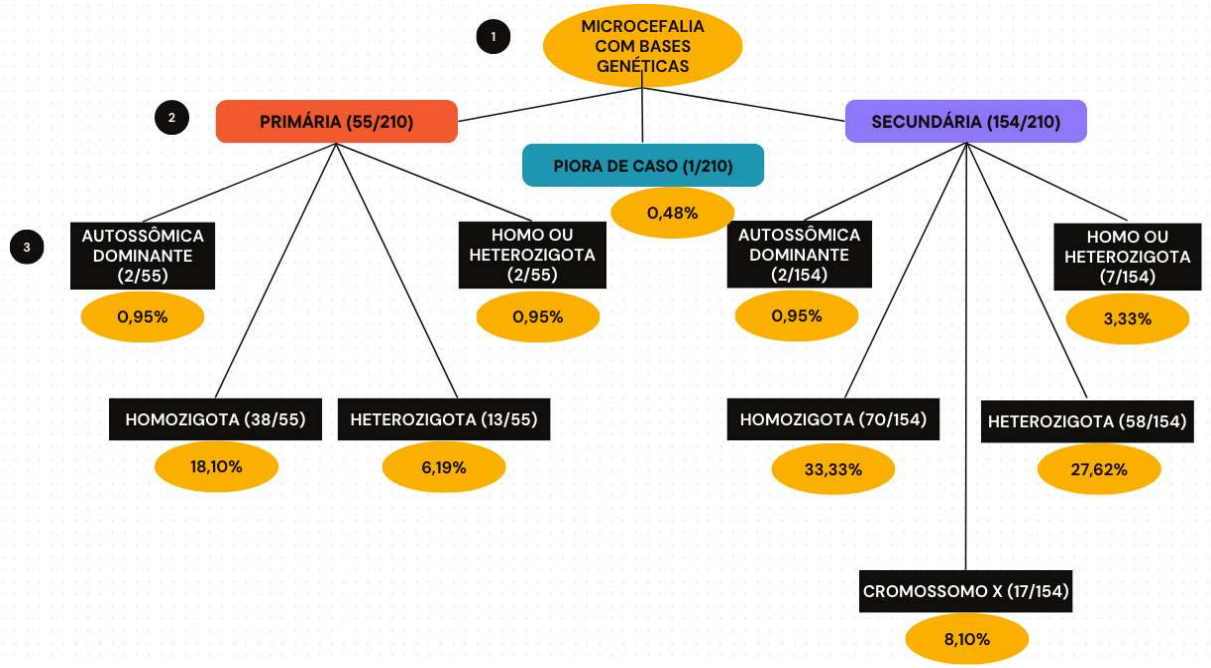
No caso da etapa da leitura dos resumos, as principais *keywords* foram 32: *drosophila*, *dwarfism*, *heart*, *facial*, *dysmorphic features*, *stature*, *anemia*, *anaemia*, *shark*, *viral*, *rubella*, *cytomegalovirus*, *virus*, Fallot, *genital*, *gonadal*, *growth*, *lymphocytic*, *lymphoma*, *lymphoedema*, *lymphoblastoid*, *lymphatic*, *lymphadenitis*, *dental*, *cardio*, *renal*, *liver*, *thyroid*, Lupus, Crohn, *dysmorphism* e *gastric*. Em conjunto, eliminaram 1105 do total de 1578 (aproximadamente 70%).

Os 422 artigos observados em sua forma de texto completo somam-se a partir dos 182 excluídos pelos motivos presentes na seção de metodologia, e dos 240 artigos da revisão sistemática, incluso um artigo que se destacou pela abordagem da microcefalia em uma terceira forma: com piora progressiva do caso.

Incluem dentre últimas informações obtidas a possibilidade da organização dos artigos por tipo de microcefalia e de consequentes bases genéticas envolvidas, o número de genes diferentes identificados e relacionados com o aparecimento da condição, independentemente da associação com sintomas (tipos) e das bases citadas e a frequência de aparecimento do genes. Enfaticamente,

além dos dados representados pela árvore de decisão abaixo (Figura 2), os 200 genes diferentes são destacados pela presença do WDR62 em 13 artigos, ASPM em 13 e CASK em 9: os três reconhecidos pelo aparecimento de microcefalia primária homozigota (autossômica recessiva).

Figura 2 – Árvore de decisão com porcentagens dos artigos por tipo de microcefalia e de base genética.



Fonte: Autora (2023).

A grande variedade de genes e de fenótipos, identificada por Dawidziuk *et al.* (2021), estabelece um exemplo de que, além de informações puramente literárias, os autores colaboraram com a realidade prática da forma como tudo irá se apresentar para a comunidade, direta ou indiretamente impactada.

Assim, observou-se o surgimento das formas autossômica dominante (presença de compatibilidade com a vida nos pares de alelos iguais, mas com formas diferentes da expressão no indivíduo a depender da homo ou heterozigose); homozigota (autossômica recessiva); heterozigota (quando apenas essa combinação alélica de expressões autossômica dominantes eram compatíveis com a vida), e homo ou heterozigota (quando as duas expressões do par de alelos eram identificadas pelos pesquisadores para um mesmo gene, sem alterações drásticas no aparecimento da condição).

O conteúdo acima, abordado por Parrini *et al.* (2016) e por Wang *et al.* (2023), em relação ao compêndio e a esta produção, surge como outro exemplo daquilo que ultrapassa o conteúdo teórico e solidifica-se por meio da classificação de trabalhos nessa maneira.

Estabelecidos os resultados, há o necessário diálogo com a literatura que, além de introduzir esta produção, afirma-os positivamente.

O trabalho de Parrini *et al.* (2016) apresenta 31,3% de herança homozigótica para a microcefalia secundária, valores próximos dos obtidos e, portanto, favoráveis às interpretações geradas, justificando o maior aparecimento de publicações sobre a condição apresentada dessa forma.

Enquanto isso, WDR62, ASPM e CASK são reafirmados pelas maiores recorrências, pois mesmo que somem aparentes baixas incidências (6,5; 6,5 e 4,5%) quando "diluídos" entre 200 genes encontrados nos 422 trabalhos analisados, o conjunto de trabalhos de reafirmam a realidade na teoria, como fizeram Asif *et al.* (2023), assim como, Jamuar e Walsh (2015) e na prática, como fizeram Wang *et al.* (2023).

Além disso, há últimos aspectos positivos pelos trabalhos de Dawidziuk *et al.* (2021) e de Elmas e Yildirim (2020) que, pelo todo, reafirmam o valor positivo de um trabalho na área temática deste.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do aumento de casos por infecção de zika virus em 2015 à atualidade, as publicações sobre bases genéticas da microcefalia são marcadas pelo registro dos genes e suas mutações e pelo crescimento das informações sobre as origens não virais da microcefalia.

Do genótipo ao fenótipo, a publicação de casos, especialmente dos sintomas e sinais nos pacientes e das alterações (mutações ou não) nos seus materiais genéticos, pode colaborar para novas descobertas não somente relativas aos tipos de microcefalia, como também, para outras condições neurometabólicas, sobre neurodesenvolvimento e sobre malformações.

Nesse caso, estudos genéticos para a identificação de mutações associadas a essa malformação, como a ação do ZIKAV como agente disruptor e possíveis outros efeitos epigenéticos associados. Em outras palavras, a ausência de nutrientes e o consumo de drogas somam-se as mutações e questionam o direcionamento e a necessidade de mais investigações.

Em suma, é por meio da interpretação de dados existentes que se possibilita concluir (ou pelo menos, contribuir) com a comunidade científica, principalmente enquanto essa se aprofunda em mais análises e descobertas.

REFERÊNCIAS

ASIF, M. *et al.* Congenital microcephaly: a debate on diagnostic challenges and etiological paradigm of the shift from isolated/non-syndromic to syndromic microcephaly. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 642–642, 16 fev. 2023. DOI 10.3390/cells12040642

DAWIDZIUK, M. *et al.* Exome sequencing reveals novel variants and expands the genetic landscape for congenital microcephaly. **Genes**, v. 12, n. 12, p. 2014, 18 dez. 2021. DOI 0.3390/genes12122014

ELMAS, M.; YILDIRIM, U. C. Genetic and clinical approach to microcephaly: a 5-year single center experience. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 11, n. 2, p. 110-116, jun. 2022. DOI 10.1055/s-0040-1721138

OMIM - HUMAN GENETICS KNOWLEDGE FOR THE WORLD -. Disponível em: <https://www.omim.org/about>. Acesso em: 20 out. 2023.

JAMUAR, S. S.; WALSH, C. A. Genomic variants and variations in malformations of cortical development. **Pediatric clinics of North America**, v. 62, n. 3, p. 571–585, 1 jun. 2015. DOI 10.1016/j.pcl.2015.03.002

KEMPIŃSKA, W. *et al.* Microcephaly in neurometabolic diseases. **Children**, v. 9, n. 1, p. 97, 11 jan. 2022. DOI 10.3390/children9010097.

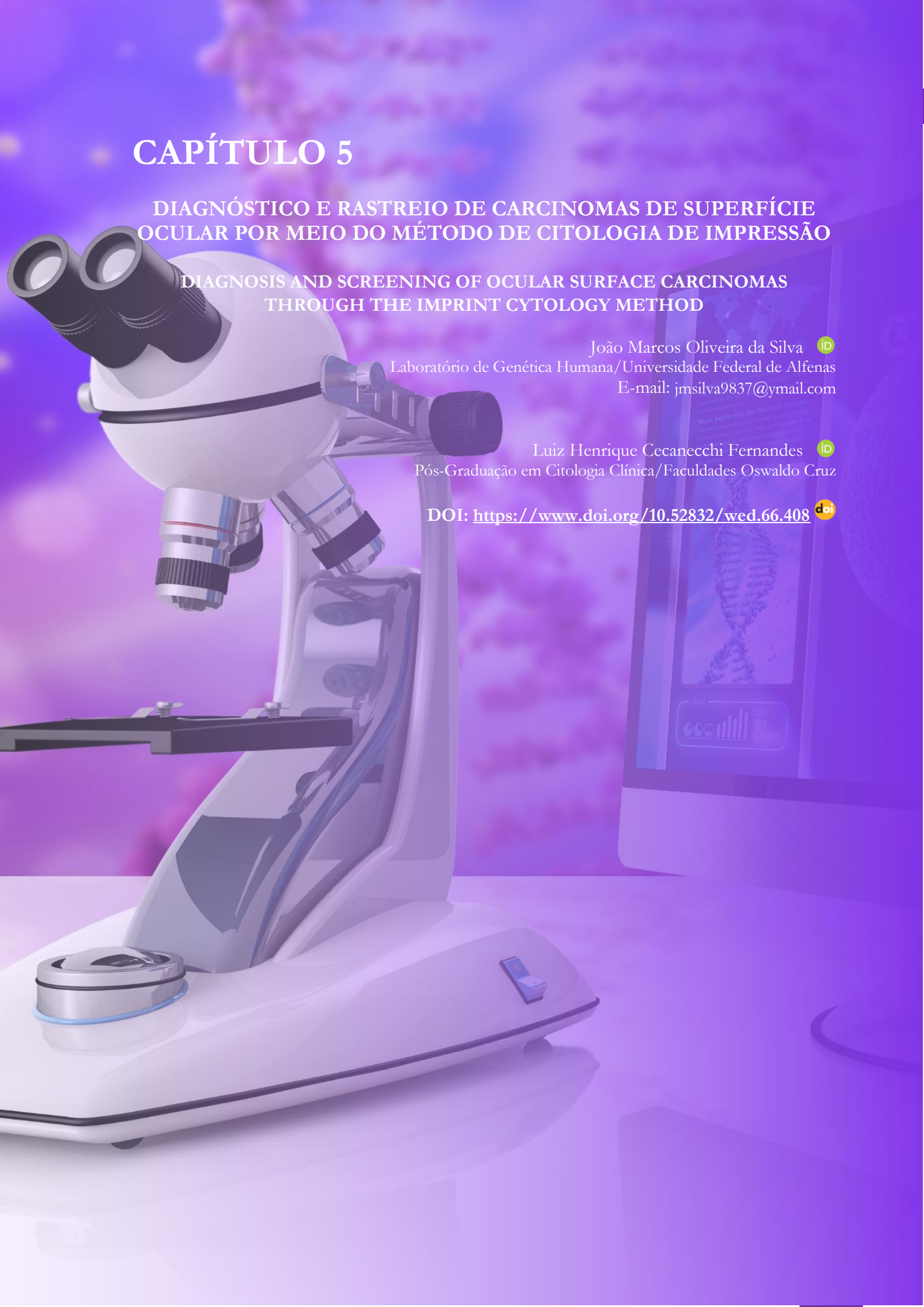
OLIVEIRA, P. S. *et al.* Experiências de pais de crianças nascidas com microcefalia, no contexto da epidemia de Zika, a partir da comunicação do diagnóstico. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 12, 2019. DOI 10.1590/0102-311X00226618

PARRINI, E. *et al.* Genetic basis of brain malformations. **Molecular Syndromology**, v. 7, n. 4, p. 220–233, 2016. DOI 10.1159/000448639

PLATT, D. J.; MINER, J. J. Consequences of congenital Zika virus infection. **Current Opinion in Virology**, v. 27, p. 1–7, dez. 2017. DOI 10.1016/j.coviro.2017.09.005

TRIGO, L. A. M. C. **Diagnóstico de microcefalia pelo ultrassom**: comparação de três intervalos de referência e diagnóstico pós-natal. 2017. 75 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP. DOI 10.47749/T/UNICAMP.2017.988910

WANG, Y *et al.* Genetic diagnosis of fetal microcephaly at a single tertiary center in China. **Frontiers in Genetics**, v. 14, 9 maio 2023. DOI 10.3389/fgene.2023.1112153.



CAPÍTULO 5

DIAGNÓSTICO E RASTREIO DE CARCINOMAS DE SUPERFÍCIE OCULAR POR MEIO DO MÉTODO DE CITOLOGIA DE IMPRESSÃO

DIAGNOSIS AND SCREENING OF OCULAR SURFACE CARCINOMAS THROUGH THE IMPRINT CYTOLOGY METHOD

João Marcos Oliveira da Silva
Laboratório de Genética Humana/Universidade Federal de Alfenas
E-mail: jmsilva9837@ymail.com

Luiz Henrique Cecanecchi Fernandes
Pós-Graduação em Citologia Clínica/Faculdades Oswaldo Cruz

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.408

RESUMO

O olho humano é o órgão responsável pela fotossensibilidade e captação dos espectros de ondas de luz, a transformando, por meio de um complexo nervosos, em imagem, fornecendo assim a visão. Esta função é permitida pela atuação de tecidos. O tecido chamado epitélio corneano é o mais externo do globo ocular e apresenta uma significativa parcela do número total de neoplasias do olho humano. As neoplasias desse epitélio podem ser resultado de fatores gênicos, com ou sem a atividade viral envolvida, radiação ou por consequência de atividades ocupacionais. Por meio de uma vasta revisão bibliográfica, foi observado que uma das metodologias para estudo e rastreio das neoplasias de superfície ocular é a impressão, que consiste em um método representativo das células camadas superficiais do epitélio corneano, por meio da compressão de um papel filtro de acetato de celulose na superfície ocular. As células colhidas nesse método, após coradas e analisadas, permitem um rastreio e um acompanhamento das neoplasias de superfície ocular. O estudo deste método é justificado pelo fato deste apresentar como características: possuir baixo custo, uma excelente qualidade em acuidade e uma fácil colheita de amostragem, resultando em método de baixo custo, baixa invasibilidade para o paciente.

Palavras-chave: Epitélio corneano. Neoplasia. Citologia ocular.

ABSTRACT

The human eye is the organ responsible for photosensitivity and capturing spectra of light waves, transforms them into images through a complex nervous system, providing vision. This function is facilitated by the action of tissues. The corneal epithelium, the outermost tissue of the eyeball, accounts for a significant portion of the total number of neoplasms in the human eye. Neoplasms in this epithelium can result from genetic factors, with or without viral activity, radiation, or occupational activities. Through an extensive literature review, it was observed that one of the methodologies for the study and screening of ocular surface neoplasms is imprint cytology. This method represents the cells of the superficial layers of the corneal epithelium by compressing a cellulose acetate filter paper onto the ocular surface. The cells collected using this method, after staining and analysis, allow for screening and monitoring of ocular surface neoplasms. The study of this method is justified by its low cost, excellent accuracy, and easy sampling, resulting in a low-cost, minimally invasive method for the patient.

Keywords: Corneal epithelium. Neoplasia. Ocular cytology.

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias escamosas da superfície ocular abrangem uma gama de tumores epiteliais que afetam a córnea e a conjuntiva. Isso inclui displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasor (carcinoma de células escamosas), que podem ou não envolver extensão orbital ou intraocular (MOSHTAGHION *et al.*, 2021)

A displasia epitelial, que pode evoluir para carcinoma *in situ*, refere-se a lesões intraepiteliais na córnea ou conjuntiva. Ela é caracterizada por seu desenvolvimento estritamente intraepitelial, não ultrapassando a membrana basal profunda. Por outro lado, o carcinoma *in situ* apresenta uma grande quantidade de atipias em grau elevado e intensidade, estendendo-se por toda a espessura do

epitélio. Quando o carcinoma invade a membrana basal, é denominado carcinoma invasivo de células escamosas (ATIA *et al.*, 2018).

Distúrbios benignos da superfície ocular, como o pterígio, também podem ocorrer. O pterígio é caracterizado pelo crescimento centrípeto de células epiteliais limbares alteradas, acompanhado por um corpo de epitélio metaplásico escamoso, hiperplasia de células caliciformes, neovascularização e remodelação da matriz extracelular (MENDOZA *et al.*, 2018).

Tumores da superfície ocular englobam uma variedade de condições benignas e malignas, originando-se de diversos tipos de células. Entre os tumores malignos, as neoplasias escamosas da superfície ocular são as mais comuns, com o melanoma da conjuntiva sendo o mais frequente. Esses tumores muitas vezes têm origem em lesões pré-malignas (NANJI *et al.*, 2017).

Fatores de risco conhecidos incluem exposição à radiação ultravioleta e infecção pelo HIV. Em pacientes HIV positivos, neoplasias malignas, como o sarcoma de Kaposi e linfoma não-Hodgkin, são notavelmente mais comuns, ocorrendo em 4% a 8% desses pacientes (RATHI; KAPOOR; KALIKI, 2018).

O diagnóstico continua a depender de exames histológicos (ATIA *et al.*, 2018). Com o intuito de apresentar o método de rastreio de lesões neoplásicas da superfície ocular, de modo menos invasivo ao paciente e financeiramente mais viável, elaboramos esta revisão bibliográfica.

2 METODOLOGIA

Este presente trabalho emprega a metodologia de revisão de literatura, que, de acordo com Andrade (2021), "é desenvolvida com base em material já elaborado, constituído principalmente de livros e artigos científicos". A pesquisa se concentrou na seleção criteriosa de artigos científicos relevantes, sendo realizada por meio das respeitadas plataformas PubMed e SciELO. Os descritores-chave utilizados para conduzir as pesquisas foram *"ocular surface neoplasia," "impression cytology,"* e *"impression cytology in diagnosis of ocular surface neoplasia."*

Para garantir a qualidade e relevância dos estudos selecionados, foram estabelecidos critérios rigorosos de exclusão. Foram excluídos os seguintes tipos de estudos: literatura cinza (não indexado e não publicado em jornais científicos), estudos secundários (como monografias, trabalhos de conclusão de curso, dissertações, jornais, capítulos de livro, comentários e cartas ao editor), artigos que não estavam disponíveis na íntegra e trabalhos que não se relacionavam com a temática específica deste trabalho.

No decorrer desse processo de triagem minuciosa, foi identificado um número significativo de artigos, aproximadamente 2.430 no total. No entanto, uma etapa subsequente de refinamento foi realizada. Dentre os artigos encontrados, foram selecionados aqueles que apresentavam os

descritores-chave utilizados na busca, seja no título ou no resumo. Essa seleção mais restrita resultou em 215 artigos.

Após a leitura exploratória desses 215 artigos, 65 deles se destacaram e foram escolhidos para a construção deste trabalho. Essa seleção foi baseada na robustez das citações de trabalhos que abordam a citologia de impressão da superfície ocular e que definem quais foram os alvos críticos para o desenvolvimento e aperfeiçoamento dessa técnica.

Dessa forma, a revisão de literatura realizada neste trabalho teve como objetivo assegurar a inclusão dos estudos mais relevantes e fundamentais no campo da citologia de impressão da superfície ocular, fornecendo uma base sólida para a análise e discussão subsequente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A neoplasia escamosa da superfície ocular representa o tipo mais comum de tumor maligno que afeta o epitélio conjuntival. A importância do diagnóstico precoce e do tratamento oportuno não pode ser subestimada, pois desempenham um papel fundamental na melhoria do prognóstico e dos resultados clínicos. Atualmente a citologia de impressão é uma das técnicas de diagnóstico não invasivas mais relevantes para esta condição (YADAV *et al*., 2020).

A citologia de impressão é um método simples, econômico e rápido de coletar amostras das camadas superficiais do epitélio corneano e conjuntival. Além de avaliar os sinais e sintomas clínicos, esse procedimento fornece uma análise citológica que pode ser usada para diagnosticar uma ampla variedade de distúrbios da superfície ocular. Estudos relatam que a citologia de impressão tem uma boa correlação com diagnósticos histopatológicos e é considerada o padrão ouro para confirmar condições como a conjuntivalização da córnea e a deficiência de células-tronco límbicas (MOSHTAGHION *et al.,* 2021).

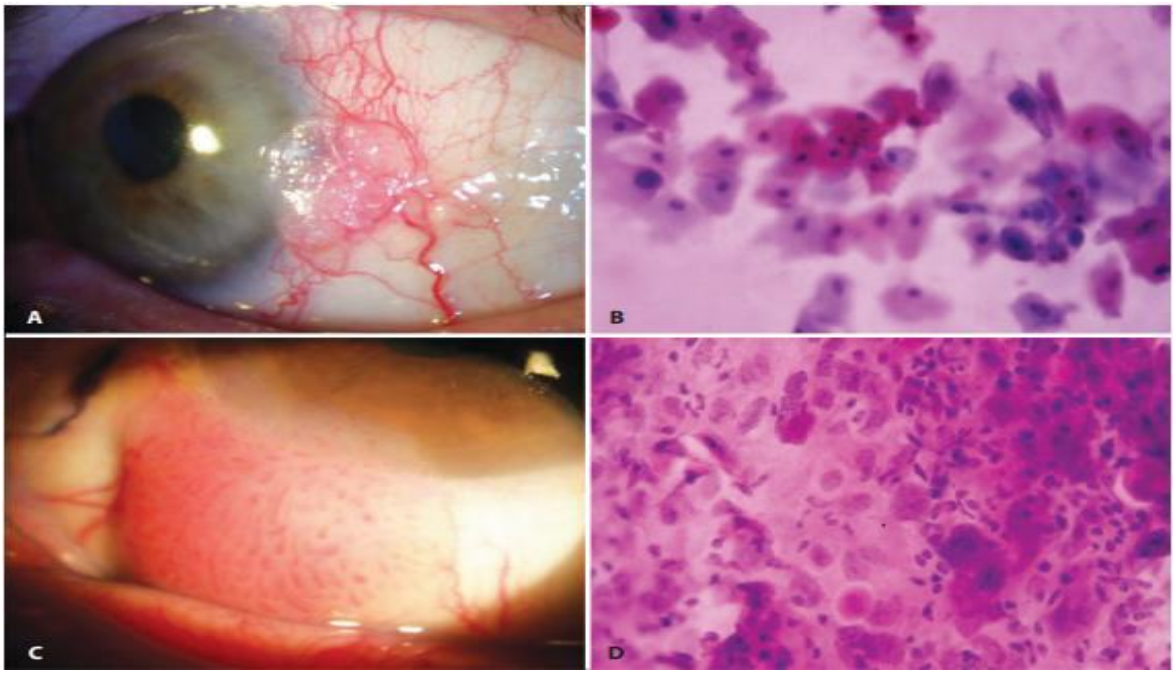
O uso da citologia de impressão na superfície ocular demonstrou ser valioso para o diagnóstico e rastreamento de complicações oculares, incluindo cicatrizes e deformidades palpebrais. Além disso, desempenha um papel crucial no diagnóstico e tratamento de lesões malignas e benignas na superfície ocular (BARROS *et al*., 2015).

A técnica de coleta de amostras foi detalhada por Kanavi e colaboradores (2017). Antes da coleta, é essencial esterilizar o papel filtro com óxido etílico para evitar infecções na superfície ocular. A coleta da amostra é realizada segurando o papel filtro com uma pinça, a fim de evitar o contato direto das células da polpa digital com o papel filtro. Após a aplicação de anestesia tópica e a exposição do olho com um blefarostato, o papel filtro é pressionado sobre a superfície ocular por 2 a 5 segundos em toda a sua extensão para obter uma amostra celular viável. Após esse período, o papel filtro é removido por meio de uma manobra de peeling e é imediatamente fixado

em uma solução composta por 100 ml de álcool a 75%, 5 ml de ácido acético glacial e 5 ml de formaldeído a 37%. A amostra deve permanecer na solução por 10 minutos. Para a coloração, são utilizados ácido periódico de Schiff (PAS), hematoxilina e Papanicolau modificado.

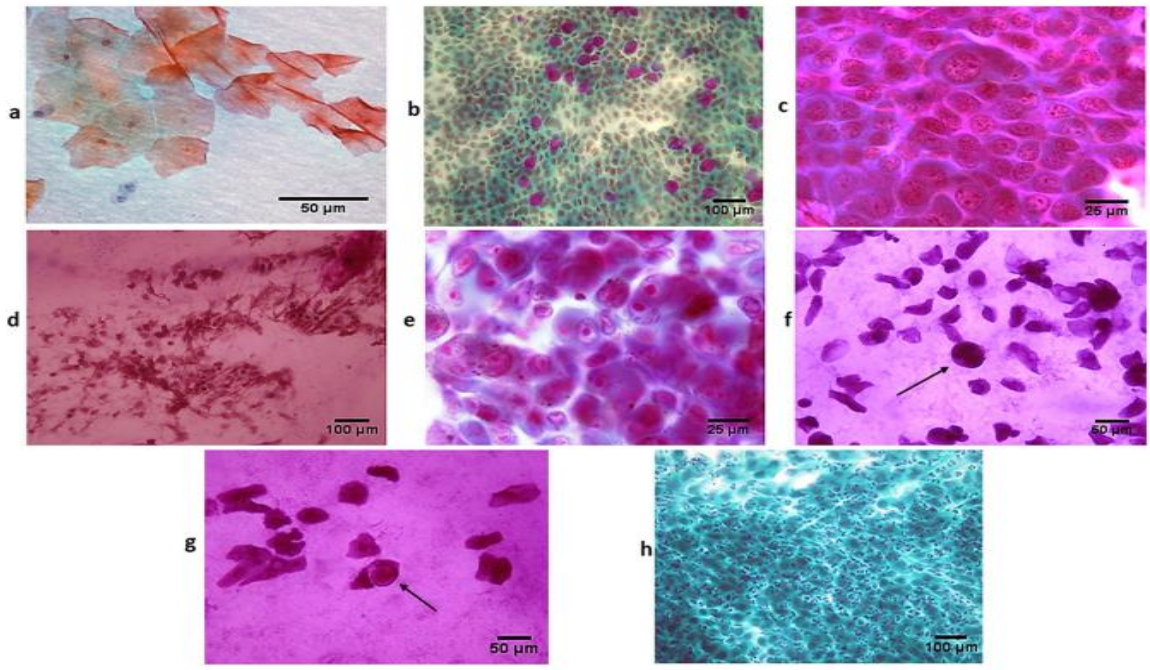
Ao analisar microscopicamente, critérios citológicos como aumento da razão núcleo-citoplasma, irregularidades na cromatina nuclear, núcleos grandes, presença de mitoses e anisocariose são considerados indicadores de malignidade em células pigmentadas. Quando a proporção relativa de melanócitos atípicos é baixa, as lesões são classificadas como pré-malignas, enquanto a presença abundante de células cancerígenas sugere melanoma. No entanto, é importante ressaltar que, para determinar a origem e a extensão dessas lesões, a biópsia ainda é necessária. O uso da citologia de impressão na superfície ocular é valioso por sua capacidade de reduzir riscos e desconforto ao paciente (LAVER, 2021). Esses critérios citológicos podem ser visualizados nas Figuras 01 e 02.

Figura 01: Características celulares observadas em carcinomas. A) lesão suspeita. B) Citologia de impressão superficial da lesão referente ao olho A. C) lesão suspeita. D) Citologia de impressão superficial da lesão referente ao olho C.



Fonte: BARROS *et.al.*, 2015

Figura 02. Citologia de impressão. A) Células com núcleos picnóticos. B) Células caliciformes positivas para PAS. C) Pleomorfismo nuclear significativo. D). Ninhos de melanócitos e núcleos de aparência insípida. (E) Melanocitos bastante pigmentados. F) e G) Presença de trofozoíto (F, seta) e cisto (G, seta) nos casos com ceratite por Acanthamoeba. (H) Presença de células inflamatórias abundantes entre as células epiteliais.



Fonte: Moshtaghion *et al.*, 2021

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da citologia de impressão para o rastreio e diagnóstico de neoplasias de superfície ocular tem se apresentado como um método de ótimo aproveito. Esta respectiva afirmação se justifica, pois, comparando a metodologia de impressão com o método de biopsia, visando em primeiro momento o paciente, a citologia de impressão se caracteriza por ser um método de menor invasibilidade, possibilitando assim uma recuperação mais rápida ao paciente, uma menor probabilidades de acidentes no desenvolvimento da colheita da amostra a ser avaliada laboratorialmente, e um menor custo financeiro.

Visando em um segundo momento, não menos importante que o primeiro, o uso da metodologia de impressão garante uma boa representatividade do epitélio, gerando assim uma amostra sem qualidade para fins de diagnóstico**,** no entanto o uso de várias impressões da mesma área foi capaz de demonstrar não somente a morfologia epitélio corneano, mas possibilita a análise da morfologia do epitélio limbal basal**.** O método de impressão para estudo citológico no tecido ocular permite a análise do grau de metaplasia escamosas, no entanto a sua utilização não se restringe somente ao rastreio de metaplasias, visto que a metodologia também pode ser utilizada com o intuito de acompanhamento após tratamento de tumores da superfície ocular de origem epitelial ou melanocítica; estudo quantitativo de células caliciformes em casos de olho seco; auxilia

no diagnóstico e rastreio de hipovitaminose A, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide ocular e queimaduras. A técnica de impressão da superfície ocular ainda permite utilizar-se como método de análise microbiológica viral, e a avaliação da superfície ocular de diabéticos, pacientes que utilizam lentes de contato e em bebês prematuros.

Embora seja um método de estudo de confiança, como demostrado acima, há alguns pontos que merecem ser ressaltados. Por avaliar apenas as camadas superficiais do epitélio corneano, o uso da metodologia de impressão é indicado como viável apenas para estudos de patologias que se restringem a superfície ocular, para as patologias que se estendem ou se originam em tecidos abaixo do epitélio corneano o método indicado como viável continua sendo a secção transversal da superfície ocular.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C. R. O papel das revisões de literatura na produção e síntese do conhecimento científico. **Ver. Interinst. Psicol.** v. 14. p, 2021. DOI 10.36298/gerais202114e23310

ATIA, R.; LEJOYEUX, R.; GEORGON, C.; ANDREIUOLO, F.; LAROCHE, L.; BORDERIE, V.; BOUHERAOUA, N. Néoplasies épidermoïdes intra-épithéliales cornéennes: dysplasie et carcinome in situ. **J Fr Ophtalmol**. v. 41, n. 09, p. 881-883. 2018. DOI 10.1016/j.jfo.2018.01.028

BARROS, J. N.; ALMEIDA, S. R. A.; LOWEN, M. S.; CUNHA, M. C.; GOMES, J. A. P. Impression cytology in the evaluation of ocular surface tumors: review article. **Arq. Bras. Oftalmol**, v. 78, n. 2, p. 126-132. 2015. DOI 10.5935/0004-2749.20150033

KANAVI, M. R.; HOSSEINI, S. B.; ALIAKBAR-NAVAHI, R.; AGHAEI, H. Impression cytology in a series of clinically diagnosed ocular surface melanocytic lesion. **J Ophthalmic Vis Res.** v. 12, n. 1, p. 17-22. 2017. DOI 10.4103/jovr.jovr_72_16

LAVER, N. M. V. Ocular cytology: Diagnostic features and ongoing practices. **Cancer Cytopathol.** V. 128, n.6, p. 419-431 .2021. DOI 10.1002/cncy.22384

MENDONZA, P. R.; CRAVEN, C. M.; IP, M. H.; WILSON, M. W.; CORONEO, M. T.; GROSSNIKLAUS, H. E. Conjunctival squamous cell carcinoma with corneal stromal invasion in presumed pterygia: a case series. **Ocul Oncol Pathol**. v. 4, p240-249. 2018. DOI 10.1159/000485425

MOSHTAGHION, S. M.; ABOLHOSSEINI, M.; KANAVI, M. R.; HOSSEINI, S. B.; KANAVI, M. R. Impression cytology for detection of clinically suspected ocular surface disorders: A cross-sectional study. **Eur J Ophthalmol.** v. 31, n. 3, p. 943 – 950. 2021. DOI 10.1177/1120672120932093

NANJI, A. A.; MERCADO, C.; GALOR, A.; DUBOVY, S.; KARP, C. L. Updates in ocular surface tumor diagnostics. **In Ophthalmol Clin**. v. 57, n. 3, p. 47-62. 2017. DOI 10.1097/IIO.0000000000000174

RATHI, S. G; KAPOOR, A, G; KALIKI, S. Ocular surface squamous neoplasia in HIV-infected patients: current perspectives. **HIV/AIDS – Research and Palliative Care**. v.10, p 33–45. 2018. DOI 10.2147/HIV.S120517

YADAV, S.; GUPTA, N.; SINGH, R.; PATIL, M.; MEEL, R.; VANATHI, M.; KASHYAP, S.; TANDON, R. Role of conjunctival ultraviolet autofluorescence in ocular surface squamous neoplasia. **Ocul Oncol Pathol**. v. 6, n. 6, p. 422 – 429. 2020. DOI 10.1159/000509578



CAPÍTULO 6

INIBIÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 6 (HDAC6) E INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM GLIOBLASTOMA

HISTONE DEACETYLASE 6 (HDAC6) INHIBITION AND CHROMOSOMAL INSTABILITY IN GLIOBLASTOMA

Laís Bernardo Lopes
E-mail: lais.lopes@sou.unifal-mg.edu.br
Instituto de Ciências da Natureza/Universidade Federal de Alfenas

João Marcos Oliveira-Silva
Instituto de Ciências da Natureza/Universidade Federal de Alfenas

Leilane Sales Oliveira
Instituto de Ciências da Natureza/Universidade Federal de Alfenas

Angel Mauricio Castro-Gamero
Instituto de Ciências da Natureza/Universidade Federal de Alfenas

DOI: https://www.doi.org/10.52832/wed.66.409

RESUMO
A histona desacetilase 6 (HDAC6) desempenha um papel crucial na formação e progressão de tumores, estimulando o crescimento, a resistência a tratamentos quimioterápicos e a mobilidade celular. Paralelamente, a instabilidade cromossômica (CIN) é conhecida por causar alterações genéticas em grande escala que impulsionam a malignidade celular e o avanço irreversível do câncer. Este estudo investigou como a inibição da HDAC6 afeta a CIN em células de glioblastoma humano, T98G. Inicialmente, o tempo de duplicação celular das T98G foi medido em 25 horas. Em seguida, essas células foram tratadas com o inibidor altamente seletivo da HDAC6, o WT161, em concentrações subletais (IC5, IC10, IC15) por um ciclo celular. Após o tratamento, a citocinese foi bloqueada, e os indicadores de CIN, como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares, foram significativamente aumentados pela WT-161. Posteriormente, será realizado um ensaio de Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) com sondas pancentromêricas para avaliar a origem aneugênica e/ou clastogênica desses biomarcadores. Essa pesquisa visa proporcionar um entendimento mais profundo das bases biológicas das neoplasias, especialmente no que diz respeito aos processos de segregação mitótica e ao controle dos microtúbulos, abrindo caminho para a identificação de novos alvos terapêuticos contra o câncer.

Palavras-chave: Instabilidade cromossômica. Glioblastoma. WT-161. Terapia anti-câncer.

ABSTRACT
Histone deacetylase 6 (HDAC6) plays a crucial role in the formation and tumor progression, stimulating growth, resistance to chemotherapy, and cellular mobility. Simultaneously, chromosomal instability (CIN) is known to cause extensive genetic alterations that drive cellular malignancy and the irreversible advancement of cancer. This study investigated how the inhibition of HDAC6 affects CIN in human glioblastoma cells, T98G. Initially, the cell doubling time of T98G was measured at 25 hours. Subsequently, these cells were treated with the highly selective HDAC6 inhibitor, WT161, at sublethal concentrations (IC5, IC10, IC15) for one cell cycle. Following treatment, cytokinesis was blocked, and CIN indicators, such as micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear budding, were significantly increased by WT-161. Subsequently, a Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) assay with pancentromeric probes will be conducted to assess the aneugenic and/or clastogenic origin of these biomarkers. This research aims to provide a deeper understanding of the biological foundations of neoplasms, particularly concerning mitotic segregation processes and microtubule control, paving the way for the identification of new therapeutic targets against cancer.

Keywords: Chromosomal instability. Glioblastoma. WT-161. Anti-cancer therapy.

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas, classe de tumores com alta taxa de mortalidade, têm origem nas células da glia e são classificados de acordo com o tipo de célula que origina o tumor, incluindo astrocitoma, oligoastrocitoma misto, oligodendroglioma e ependimoma. Em adultos, o glioblastoma (GBM), um astrocitoma de grau IV, é a forma mais maligna desses cânceres. Aproximadamente metade dos tumores cerebrais malignos são glioblastomas, e a média de sobrevida é de cerca de dois anos (SCHAFF; MELLINGHOFF, 2023).

A instabilidade cromossômica (CIN) desempenha um papel significativo na progressão do câncer, desencadeando uma série de eventos que contribuem para sua agressividade e resistência. Alterações cromossômicas, como deleções, amplificações e rearranjos genéticos, geram diversidade genômica intratumoral, permitindo que as células cancerosas se adaptem a ambientes adversos, resistam a tratamentos e persistam em condições variáveis (AL-RAWI; BAKHOUM, 2022). Essa heterogeneidade genética pode levar a subpopulações de células mais invasivas, com maior propensão a metástases e menos sensíveis às terapias convencionais, resultando em uma progressão mais rápida e agressiva do tumor (BACH; ZHANG; SOOD, 2019).

Entre os inúmeros métodos de análise da instabilidade cromossômica, o micronúcleo se destaca. Os micronúcleos são pequenas estruturas semelhantes ao núcleo, envoltas por um envelope nuclear e separadas espacialmente do núcleo principal. Eles se formam quando cromossomos atrasados ou fragmentos de cromossomos não são reintegrados ao núcleo durante a interfase, levando à deposição do envelope nuclear ao seu redor. A acumulação de micronúcleos é amplamente usada como biomarcador de CIN e estresse genotóxico, revelando erros durante a mitose (KRUPINA; GOGINASHVILI; CLEVELAND, 2022).

Além da instabilidade cromossômica, a regulação da transcrição gênica por meio do sistema epigenético desempenha um papel crucial na progressão do câncer. Dentro desse sistema, as histonas desacetilases (HDACs), um grupo enzimático composto por diversos subtipos, têm um papel essencial na inibição da transcrição e bloqueio do DNA. Inibidores dessas enzimas estão ganhando destaque devido à sua capacidade antitumoral, induzindo a parada da proliferação do câncer e até mesmo a morte celular (LAINO *et al.*, 2019).

O estudo da instabilidade cromossômica oferece uma perspectiva valiosa para a análise dos eventos citogenéticos subjacentes à progressão do câncer, incluindo a investigação do papel das aneuploidias na tumorigênese. Por meio dessa abordagem, é possível compreender como essas anormalidades genéticas afetam e modulam o curso da progressão tumoral. Ao desvendar os mecanismos pelos quais a instabilidade cromossômica influencia a progressão do câncer, torna-se possível identificar potenciais alvos terapêuticos que podem ser explorados no combate à doença. Da mesma forma, é fundamental avaliar os efeitos da inibição da HDAC6 na instabilidade cromossômica, incluindo a formação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares

2 METODOLOGIA

2.1 Linhagens celulares e condições de cultura

Na realização deste estudo foi utilizada a linhagem derivada de glioblastoma T98G

proveniente do banco de células internacional *American Type Culture Collection*, USA (ATCC). As células foram mantidas em garrafas de 25cm² em meio DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil; pH 7,2 - 7,4), associado com penicilina (60 mg/Ml) em atmosfera úmida contendo 5% CO2 e a temperatura de 37ºC. Para propósitos de manutenção e aumento da confluência, as células são enzimaticamente desprendidas com 0,05% tripsina (Gibco BRL, Life, Technologies, Carlsbad, CA, USA), e a suspensão celular foi dividida em novas garrafas de cultura de 25cm².

2.2 Ensaio de *doubling-time*

O *doubling-time* é o tempo que a célula demora para se dividir. Nesse estudo, o ensaio foi realizado com o intuito de descobrir o tempo de duplicação da linhagem T98G, de glioblastoma, para ser utilizado como tempo de tratamento no ensaio de micronúcleo.

A linhagem foi cultivada normalmente até atingir a terceira passagem, onde foi plaqueada em placas de cultura celular de 24 poços, em uma concentração de 20.000 células. Após 24 horas de incubação, foi realizada a colheita das células de 3 poços por meio de tripsinização, e as células foram contadas com o auxílio de um hemocitômetro. Esse procedimento foi realizado todos os dias durante 6 dias, no mesmo horário.

2.3 Ensaio de micronúcleo

Com o intuito de avaliar danos cromossômicos, amplificações de DNA e erros de segregação cromossômica, foram quantificados os biomarcadores de micronúcleo, broto nuclear e ponte nucleoplasmática, respectivamente, por meio do método de ensaio de citoma de micronúcleo por bloqueio de citocinese (FENECH, 2007). Para isso, a linhagem T98G foi plaqueada em uma concentração de 1 E 5 em discos de cultura celular (35 x 10 mm) suspendida em 2 ml de DMEM. Após 24 horas, as células foram tratadas por um ciclo celular com WT-161, nas concentrações de 0,50 μM, 0,95 μM e 1,25 μM; TMZ, na concentração de 255 μM, o qual foi utilizado como controle positivo para a formação de micronúcleo; e DMSO, o qual foi utilizado como controle de veículo. Terminado o tratamento com WT-161, os poços foram lavados com PBS e tratados com citocalasina B em uma concentração de 5 μg/mL, por um período de um ciclo celular e meio.

Encerrado o tratamento com citocalasina B, as células foram processadas para a confecção da lâmina de avaliação. Para isso, o meio de cultivo contendo citocalasina foi removido transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Após a remoção do meio de cultivo, o disco foi lavado com PBS, o qual também foi transferido para o tubo Falcon de 15 mL.

Seguido, com a lavagem as células, essas foram desprendidas enzimaticamente e adicionadas ao tubo de centrífuga de 15 mL, os poços foram lavados com PBS e novamente o conteúdo foi adicionado ao tubo Falcon de 15 mL. Logo após, as células foram centrifugadas a 900 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, o pellet foi ressuspendido em uma solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl). O material foi centrifugado outra vez. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético na diluição 1:4. Depois, realizou-se a homogeneização da mistura e ela foi centrifugada mais uma vez, por 5 minutos. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi retirado até aproximadamente 0,5mL, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A solução foi armazenada *overnight*.

Para a preparação e análise das lâminas, primeiro foram lavadas com água e detergente, e deixadas para secar em temperatura ambiente. Em seguida, foram armazenadas em um béquer com água destilada no freezer, até a formação de uma fina camada de gelo. O material previamente preparado foi pingado na lâmina com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e a coloração foi feita utilizando corante giemsa na concentração de 1 parte de corante para 30 partes de tampão fosfato.

Por impedir a divisão citoplasmática, as células tratadas com Cyt-B podem apresentar dois ou mais núcleos, sendo resultado do número de vezes que a célula passou pelo ciclo celular. Por essa razão, se faz necessário a determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN), o qual assegura que a maioria das células da amostra analisada passou por apenas um ciclo celular, para isso é necessário que o IDN esteja próximo de 2. Para o cálculo do IDN, utiliza-se a fórmula: $IDN = (M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3 \times 3) + (M4 \times 4) / N$; em que M1 representa a quantidade de células mononucleadas, M2, binucleadas, M3, trinucleadas e M4, tetranucleadas e N, o número de células viáveis contadas. Também foi avaliada a quantidade de células apoptóticas e necróticas.

Para a avaliação dos micronúcleos foram utilizados os critérios estabelecidos pelo Fenech (2007). Micronúcleos são classificados como fragmentos de cromossomos que se perderam durante a divisão celular, ou cromossomos inteiros perdidos. Para sua identificação, deve-se levar em consideração seu tamanho reduzido em comparação ao núcleo de uma célula, além de serem não-refratores e não estarem conectados ao núcleo, e possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo. Quanto às pontes nucleoplasmáticas, geralmente não excedem ¼ do tamanho do núcleo celular e também apresentam a mesma intensidade de coloração. Os botões nucleares são similares aos micronúcleos em aparência, entretanto, são conectados ao núcleo por uma ponte mais estreita que o próprio botão.

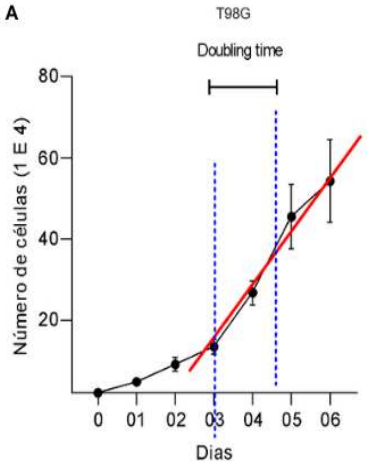
Para determinar o nível de instabilidade cromossômica (CIN), foram quantificados os

micronúcleos (MN), as pontes nucleoplasmáticas (P) e os botões nucleares (B).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de avaliar o tempo necessário para a duplicação da linhagem T98G, originária de glioblastoma, respectivamente, procedeu-se à realização do ensaio de *doubling time*. Nesse contexto, as células foram cultivadas e inoculadas em placas de cultura celular, e a contagem das células foi conduzida diariamente ao longo de um período de 8 dias para e 6 dias para T98G. A partir do crescimento exponencial, o tempo de duplicação foi calculado, revelando que a linhagem T98G (Figura 1A) apresentou um tempo de duplicação de 25 horas, enquanto a linhagem exibiu um tempo de duplicação de 46 horas. Os valores correspondentes a cada linhagem e seus respectivos desvios estão detalhados na tabela 01.

Figura 1 - Tempo de *doubling-time* para T98G



Célula	Doubling time
T98G	25H ± 2H

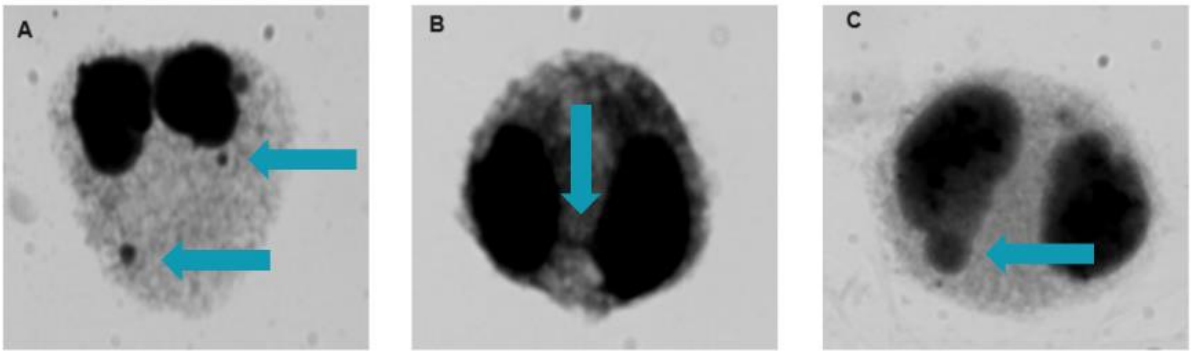
Fonte: Autor (2023)

Resultados prévios obtidos por Oraiopoulou e colaboradores (2019) indicam um tempo médio de duplicação para a linhagem T98G de cerca de 29,9 horas, o que corrobora com os achados deste estudo. No entanto, é importante destacar que não existem registros do tempo de duplicação para na literatura científica, o que confere um caráter inédito aos resultados aqui apresentados.

Com o propósito de investigar os potenciais efeitos da inibição da HDAC6, por meio de um inibidor específico denominado WT-161, sobre a instabilidade cromossômica na linhagem derivada de glioblastoma, T98G, realizou-se uma análise abrangente dos biomarcadores, que incluiu a avaliação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (Figura 2A, B e C). O tempo de tratamento com WT-161 foi determinado com base no *doubling time*, conforme

ilustrado na figura 01, o qual correspondeu a um período equivalente a uma duplicação celular, enquanto o tratamento com Citocalasina B teve a duração de um e meio tempo de duplicação.

Figura 2 - Biomarcadores de CIN.



Fonte: Autor (2023)

Empregando concentrações de 0,50 μM, 0,95 μM e 1,25 μM, que correspondem a reduções de 5%, 10% e 15%, respectivamente, na viabilidade das células tratadas com WT-161 durante 48 horas, realizou-se um tratamento de 25 horas, equivalente a um ciclo de duplicação celular. O critério de índices de divisão nuclear (IDN) superiores a 2 (Tabela 1) foi adotado para assegurar que a maioria das células da amostra analisada havia completado apenas uma duplicação.

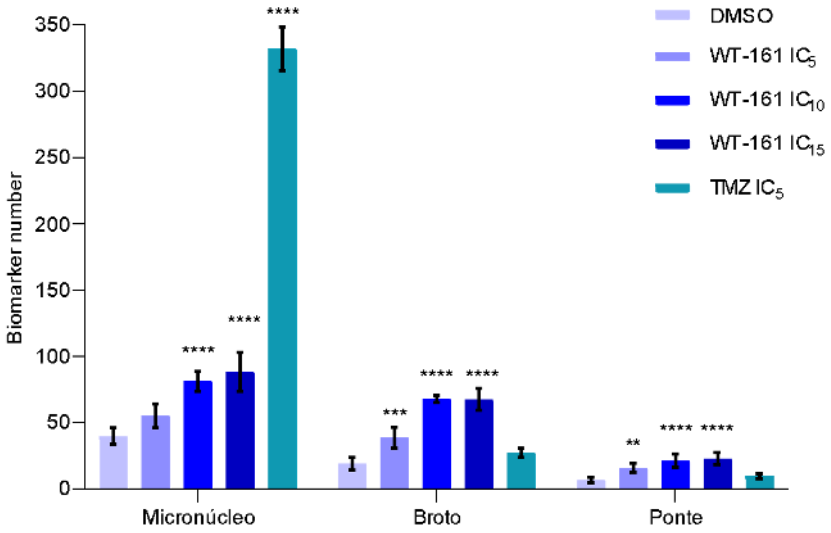
Tabela 1 - IDNs referentes aos tratamentos.

Tratamento	Índice de Divisão Nuclear *
DMSO	2,10 ± 0,05
WT-161 IC_5	2,12 ± 0,05
WT-161 IC_{10}	2,13 ± 0,03
WT-161 IC_{15}	2,14 ± 0,04
TMZ IC_5	2,18 ± 0,03

Fonte: Autor (2023)

A análise dos biomarcadores de instabilidade cromossômica (CIN) revelou um notável aumento em resposta ao tratamento com WT-161, em comparação com o grupo de controle, como mostra a Figura 3. Esses achados estão em conformidade com um estudo previamente conduzido por Shin e colaboradores (2003), que já havia sugerido que a inibição da atividade das HDACs resulta na inadequada localização das proteínas envolvidas nos pontos de verificação mitóticos nos cinetócoros, culminando no prolongamento da fase mitótica e na saída anormal da parada mitótica, desencadeando a instabilidade cromossômica (CIN).

Figura 3 - Contagem de biomarcadores em células tratadas.



Fonte: Autor (2023)

É importante destacar a discrepância significativa na quantidade de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares observados nas células tratadas com TMZ, conforme esperado. O TMZ é conhecido por induzir quebras cromossômicas e danos ao DNA devido à sua natureza como agente alquilante. Essa substância pode ocasionar diversos tipos de lesões, incluindo mutações e anormalidades cromossômicas. Pesquisas anteriores, como os estudos conduzidos por Guérard *et al.* em 2017 e Vernole, Pepponi e D'Atri em 2003, já haviam documentado a indução de micronúcleos em células tratadas com TMZ, corroborando nossos resultados.

A instabilidade cromossômica é um fator contribuinte para a progressão do câncer, uma vez que pode levar a uma maior diversidade genética nas células tumorais, promovendo a adaptação das células malignas e a resistência a tratamentos. Portanto, a compreensão dos mecanismos subjacentes à CIN pode fornecer *insights* valiosos para o desenvolvimento de terapias direcionadas e estratégias eficazes no combate ao câncer.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelam que a inibição seletiva da HDAC6, usando o inibidor WT-161, desempenha um papel relevante na promoção da instabilidade cromossômica (CIN). A análise dos marcadores de CIN, como micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, indica um aumento notável quando as células são expostas ao WT-161 em comparação com o grupo de controle. Esses achados sugerem que a inibição da HDAC6 pode afetar indiretamente a estabilidade cromossômica, influenciando a dinâmica do citoesqueleto e causando anormalidades na divisão celular. Essas descobertas contribuem para uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes à CIN em células de glioblastoma, destacando o potencial terapêutico do

WT-161, que merece investigações adicionais. Isso enfatiza a importância contínua da pesquisa de abordagens terapêuticas visando a CIN como estratégia contra o glioblastoma.

REFERÊNCIAS

AL-RAWI, D. H.; BAKHOUM, S. F. Chromosomal Instability as a Source of Genomic Plasticity. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 74, 101913, 2022. DOI 10.1016/j.gde.2022.101913.

BACH, D. H; ZHANG, W.; SOOD, A. K. Chromosomal Instability in Tumor Initiation and Development. **Cancer Res.**, v. 79, n. 16, p. 3995–4002, 2019. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-3235

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc.** v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

GUÉRARD, M.; JOHNSON, G.; DERTINGER, S.; DURAN-PACHECO, G.; FUNK, J.; ZELLER, A. Dose-response relationship of temozolomide, determined by the Pig-a, comet, and micronucleus assay. **Arch Toxicol**., v. 91, n. 6, p. 2443-2453, 2017. DOI 10.1007/s00204-016-1923-4

KRUPINA, K.; GOGINASHVILI, A.; CLEVELAND, D, W. Causes and consequences of micronuclei. **Curr Opin Cell Biol**., v. 70, p. 91-99, 2021. DOI 10.1016/j.ceb.2021.01.004.

ORAIOPOULOU, M, E.; TAMPAKAKI, M.; TZAMALI, E.; TAMIOLAKIS, T.; MAKATOUNAKIS, V.; VAKIS, A, F.; ZZCHARAKIS, G.; SAKKALIS, V.; PAPAMATHEAKIS, J. A 3D tumor spheroid model for the T98G Glioblastoma cell line phenotypic characterization. **Tissue Cell**, v. 59, p. 39-43, 2019. DOI 10.1016/j.tice.2019.05.007.

SCHAFF, L, R.; MELLINGHOFF, I, K. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. **JAMA**, v. 329, n. 7, p. 574-587, 2023, DOI 10.1001/jama.2023.0023.

SHIN, H.-J.; BAEK, K-H.; JEON, A-H.; KIM, S-J.; JANG, K-L.; SUNG, Y-C.; KIM, C-M.; LEE, C-W. Inhibition of Histone Deacetylase Activity Increases Chromosomal Instability by the Aberrant Regulation of Mitotic Checkpoint Activation. **Oncogene**, v. 22, n. 25, p. 3853–3858, 2003. DOI 10.1038/sj.onc.1206502

VERNOLE, P.; PEPPONI, R.; D'ATRI, S. Role of mismatch repair in the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cells treated with different chemotherapeutic agents. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 52, n. 3, p. 185-192. DOI 10.1007/s00280-003-0660-6.

Junielson Soares da Silva
Ana Cláudia Rabelo e Silva
Organizadores

PESQUISAS EM CITOLOGIA E GENÉTICA:
ASPECTOS GERAIS

1ª edição



Home page: www.editorawissen.com.br
E-mail: contato@wisseneditora.com.br
wisseneditora@gmail.com
Instagram: @wisseneditora

Teresina – PI, 2023

Wissen editora
2023