

PESQUISAS EM TEMAS DE Ciências Biológicas

VOLUME 4

Ednilson Sergio Ramalho de Souza
(Editor)

The background of the cover is a grayscale microscopic image. It features several large, spherical structures with numerous protruding, rod-like appendages, resembling viruses or complex biological cells. These structures are set against a dark, almost black background, with some smaller, similar structures visible in the upper left and upper right corners. A semi-transparent white rectangular box is positioned in the center, containing the title text.

PESQUISAS EM TEMAS DE Ciências Biológicas

VOLUME 4

Ednilson Sergio Ramalho de Souza
(Editor)

Volume 4

PESQUISAS EM TEMAS DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Edição 1

Belém-PA



© 2022 Edição brasileira
by RFB Editora
© 2022 Texto
by Autor(es)
Todos os direitos reservados

RFB Editora
Home Page: www.rfbeditora.com
Email: adm@rfbeditora.com
WhatsApp: 91 98885-7730
CNPJ: 39.242.488/0001-07
R. dos Mundurucus, 3100, 66040-033, Belém-PA

Diagramação

Danilo Wothon Pereira da Silva

Design da capa

Pryscila Rosy Borges de Souza

Imagens da capa

www.canva.com

Revisão de texto

Os autores

Bibliotecária

Janaina Karina Alves Trigo Ramos

Gerente editorial

Nazareno Da Luz

<https://doi.org/10.46898/rfb.9786558892489>

**Catálogo na publicação
Elaborada por RFB Editora**

P474

Pesquisas em temas de ciências biológicas / Ednilson Sergio Ramalho de Souza
(Editor) – Belém: RFB, 2022.

(Pesquisas em temas de ciências biológicas, V.4)

Livro em PDF

3.600 KB., il.

ISBN: 9786558892489

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489

1. Ciências Biológicas. I. Souza, Ednilson Sergio Ramalho de (Editor). II. Título.

CDD 370

Índice para catálogo sistemático

I. Ciências Biológicas.



Todo o conteúdo apresentado neste livro, inclusive correção ortográfica e gramatical, é de responsabilidade do(s) autor(es).

Obra sob o selo *Creative Commons*-Atribuição 4.0 Internacional. Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.

Conselho Editorial

Prof. Dr. Ednilson Sergio Ramalho de Souza - UFOPA (Editor-Chefe)

Prof.^a Dr.^a. Roberta Modesto Braga-UFPA

Prof. Dr. Laecio Nobre de Macedo-UFMA

Prof. Dr. Rodolfo Maduro Almeida-UFOPA

Prof.^a Dr.^a. Ana Angelica Mathias Macedo-IFMA

Prof. Me. Francisco Robson Alves da Silva-IFPA

Prof.^a Dr.^a. Elizabeth Gomes Souza-UFPA

Prof.^a Dr.^a. Neuma Teixeira dos Santos-UFRA

Prof.^a Ma. Antônia Edna Silva dos Santos-UEPA

Prof. Dr. Carlos Erick Brito de Sousa-UFMA

Prof. Dr. Orlando José de Almeida Filho-UFSJ

Prof.^a Dr.^a. Isabella Macário Ferro Cavalcanti-UFPE

Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares-UFPI

Prof.^a Dr.^a. Welma Emidio da Silva-FIS

Comissão Científica

Prof. Dr. Laecio Nobre de Macedo-UFMA

Prof. Me. Darlan Tavares dos Santos-UFRJ

Prof. Dr. Rodolfo Maduro Almeida-UFOPA

Prof. Me. Francisco Pessoa de Paiva Júnior-IFMA

Prof.^a Dr.^a. Ana Angelica Mathias Macedo-IFMA

Prof. Me. Antonio Santana Sobrinho-IFCE

Prof.^a Dr.^a. Elizabeth Gomes Souza-UFPA

Prof. Me. Raphael Almeida Silva Soares-UNIVERSO-SG

Prof.^a Dr.^a. Andréa Krystina Vinente Guimarães-UFOPA

Prof.^a Ma. Luisa Helena Silva de Sousa-IFPA

Prof. Dr. Aldrin Vianna de Santana-UNIFAP

Prof. Me. Francisco Robson Alves da Silva-IFPA

Prof. Dr. Marcos Rogério Martins Costa-UnB

Prof. Me. Márcio Silveira Nascimento-IFAM

Prof.^a Dr.^a. Roberta Modesto Braga-UFPA

Prof. Me. Fernando Vieira da Cruz-Unicamp

Prof.^a Dr.^a. Neuma Teixeira dos Santos-UFRA

Prof. Me. Angel Pena Galvão-IFPA

Prof.^a Dr.^a. Dayse Marinho Martins-IEMA

Prof.^a Ma. Antônia Edna Silva dos Santos-UEPA

Prof.^a Dr.^a. Viviane Dal-Souto Frescura-UFSM

Prof. Dr. José Moraes Souto Filho-FIS

Prof.^a Ma. Luzia Almeida Couto-IFMT

Prof. Dr. Carlos Erick Brito de Sousa-UFMA

Prof.^a Ma. Ana Isabela Mafra-Univali

Prof. Me. Otávio Augusto de Moraes-UEMA

Prof. Dr. Antonio dos Santos Silva-UFPA
Prof^a. Dr. Renata Cristina Lopes Andrade-FURG
Prof. Dr. Daniel Tarciso Martins Pereira-UFAM
Prof^a. Dr^a. Tiffany Prokopp Hautrive-Unopar
Prof^a. Ma. Rayssa Feitoza Felix dos Santos-UFPE
Prof. Dr. Alfredo Cesar Antunes-UEPG
Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira-UFPE
Prof^a. Dr^a. Ilka Kassandra Pereira Belfort-Faculdade Laboro
Prof. Dr. Manoel dos Santos Costa-IEMA
Prof^a. Dr^a. Érima Maria de Amorim-UFPE
Prof. Me. Bruno Abilio da Silva Machado-FET
Prof^a. Dr^a. Laise de Holanda Cavalcanti Andrade-UFPE
Prof. Me. Saimon Lima de Britto-UFT
Prof. Dr. Orlando José de Almeida Filho-UFSJ
Prof^a. Ma. Patrícia Pato dos Santos-UEMS
Prof.^a Dr^a. Isabella Macário Ferro Cavalcanti-UFPE
Prof. Me. Alisson Junior dos Santos-UEMG
Prof. Dr. Fábio Lustosa Souza-IFMA
Prof. Me. Pedro Augusto Paula do Carmo-UNIP
Prof^a. Dr^a. Dayana Aparecida Marques de Oliveira Cruz-IFSP
Prof. Me. Alison Batista Vieira Silva Gouveia-UFG
Prof^a. Dr^a. Silvana Gonçalves Brito de Arruda-UFPE
Prof^a. Dr^a. Nairane da Silva Rosa-Leão-UFRPE
Prof^a. Ma. Adriana Barni Truccolo-UERGS
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares-UFPI
Prof. Me. Fernando Francisco Pereira-UEM
Prof^a. Dr^a. Cátia Rezende-UNIFEV
Prof^a. Dr^a. Katiane Pereira da Silva-UFRA
Prof. Dr. Antonio Thiago Madeira Beirão-UFRA
Prof^a. Ma. Dayse Centurion da Silva-UEMS
Prof.^a Dr^a. Welma Emidio da Silva-FIS
Prof^a. Ma. Elisângela Garcia Santos Rodrigues-UFPB
Prof^a. Dr^a. Thalita Thyrza de Almeida Santa Rosa-Unimontes
Prof^a. Dr^a. Luci Mendes de Melo Bonini-FATEC Mogi das Cruzes
Prof^a. Ma. Francisca Elidivânia de Farias Camboim-UNIFIP
Prof. Dr. Clézio dos Santos-UFRRJ
Prof^a. Ma. Catiane Raquel Sousa Fernandes-UFPI
Prof. Dr. Marcos Pereira dos Santos - FAQ/FAEG

Nossa missão é a difusão do conhecimento gerado no âmbito acadêmico por meio da organização e da publicação de livros científicos de fácil acesso, de baixo custo financeiro e de alta qualidade!

Nossa inspiração é acreditar que a ampla divulgação do conhecimento científico pode mudar para melhor o mundo em que vivemos!

Equipe RFB Editora



SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO 9

CAPÍTULO 1

ANÁLISES HISTOQUÍMICAS EM MICROSCOPIA DE LUZ E FLUORESCÊNCIA EM CAULES DE TABACO..... 11

Renan Falcioni

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.1

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA FIBROSE PULMONAR..... 21

Bruno José da Silva Bezerra

Júlia Yone da Silva Pereira

Natan Cordeiro Silva

Thaís Alves dos Santos

Maria Eunice Siqueira Lira

Jannyson José Braz Jandú

Fernanda Miguel de Andrade

Maria Tereza dos Santos Correia

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.2

CAPÍTULO 3

TOXICIDADE DA *BACILLUS THURINGIENSIS* CONTRA LARVAS DE *Aedes Aegypti*: AVALIAÇÃO DE ISOLADOS REGIONAIS 31

Camila Cassia Silva Araújo

José de Paula Oliveira

José Manoel Wanderley Duarte Neto

Ana Lúcia Figueiredo Porto

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.3



APRESENTAÇÃO

Prezad@s,

Satisfação! Esse é o sentimento que vem ao meu ser ao escrever a apresentação deste delicioso livro. Não apenas porque se trata do volume 4 da Coleção Pesquisas em Temas de Ciências Biológicas, publicado pela RFB Editora, mas pela importância que essa área possui para a promoção da qualidade de vida das pessoas.

Segundo a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), fazem parte dessa área: OCEANOGRAFIA, BIOLOGIA GERAL, GENÉTICA, BOTÂNICA, ZOOLOGIA, MORFOLOGIA, FISILOGIA, BIOQUÍMICA, BIOFÍSICA, FARMACOLOGIA, IMUNOLOGIA, MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA, ECOLOGIA. Tal área suscita, portanto, uma gama de possibilidades de pesquisas e de relações dialógicas que certamente podem ser relevantes para o desenvolvimento social brasileiro.

Desse modo, os artigos apresentados neste livro - em sua maioria frutos de árduos trabalhos acadêmicos (TCC, monografia, dissertação, tese) - decerto contribuem, cada um a seu modo, para o aprofundamento de discussões na área de Ciências Biológicas; pois são pesquisas germinadas, frutificadas e colhidas de temas atuais que vêm sendo debatidos nas principais universidades brasileiras e que refletem o interesse de pesquisadores no desenvolvimento social e científico que possa melhorar a qualidade de vida de homens e de mulheres.

Acredito, verdadeiramente, que a ampla divulgação do conhecimento científico de qualidade pode mudar para melhor o mundo em que vivemos!

Esse livro é parte singela da materialização dessa utopia.

Ednilson Sergio Ramalho de Souza

Editor-Chefe

RFB Editora





CAPÍTULO 1

ANÁLISES HISTOQUÍMICAS EM MICROSCOPIA DE LUZ E FLUORESCÊNCIA EM CAULES DE TABACO

*HISTOCHEMICAL ANALYSIS IN LIGHT AND
FLUORESCENCE MICROSCOPY IN TOBACCO STEM*

Renan Falcioni¹

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.1

¹ renanfalcioni@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/7592844212401430>, <https://orcid.org/0000-0002-2343-5045>

RESUMO

Análises histoquímicas são rotineiramente utilizadas na anatomia vegetal. Dessa forma testamos o PEG 6000 (polietileno glicol 6000) como forma de infiltração e emblocamento para cortes em caules de *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) como forma de padronização da espessura das seções e realização dos testes histoquímicos rotineiramente empregados nos laboratórios de anatomia e histoquímica vegetal. Adicionalmente, avaliamos o uso da microscopia de luz e fluorescência para analisar as células do cilindro vascular. Os resultados demonstraram que o PEG6000 permitiu boa infiltração nos fragmentos caulinares, obtenção de cortes histológicos padronizados e, que os testes histoquímicos realizados apresentam excelente capacidade discriminatória das células e tecidos presentes no cilindro vascular, quando analisados sob microscopia de luz e fluorescência. Assim sendo, recomenda-se o método utilizados para análises histológicas vegetais por microscopia de luz e fluorescência com uso do PEG6000, para obtenção e análises simples, rápidas e eficientes em caules de tabaco.

Palavras-chave: Anatomia vegetal. Lignina. Polietilenoglicol 6000. Testes histoquímicos.

ABSTRACT

Histochemical analyzes are routinely used in plant anatomy. In this way, we tested PEG 6000 (polyethylene glycol 6000) as a form of infiltration and blocking for cuts in stems of *Nicotiana tabacum* L. (tobacco) as a way of standardizing the thickness of the sections and performing the histochemical tests routinely used in anatomy and histochemistry laboratories. Additionally, we evaluated the use of light and fluorescence microscopy to analyze vascular cylinder cells. The results showed that PEG6000 allowed good infiltration in the stem fragments, obtaining standardized histological sections and that the histochemical tests performed showed an excellent discriminatory capacity of cells and tissues present in the vascular cylinder when analyzed under light and fluorescence microscopy. Therefore, the method used for plant histological analysis by light and fluorescence microscopy using PEG6000 is recommended to obtain simple, fast, and efficient analyses on tobacco stems.

Keywords: Histochemical analysis. Lignin. Plant anatomy. Polyethylene glycol 6000.

1 INTRODUÇÃO

A anatomia vegetal tem um papel fundamental para análise e interpretação das estruturas histológicas em tecidos vegetais. Muitas técnicas são utilizadas para obtenção de “bons” cortes para análises em microscopia de luz, fluorescência e microscopia confocal (DE MICCO; ARONNE, 2007; KAPP et al., 2015). Todavia rotineiramente cortes a mão livres são utilizados para realização de testes histoquímicos (FERREIRA; TEIXEIRA; ISAIAS, 2014; KRAUS; ARDUIN, 1997). Adicionalmente, quando realizados cortes a fresco é perdida a capacidade em padronização dos cortes, ocorrem incidências de ângulos que prejudicam as análises celulares e teciduais e, em muitos casos são difíceis de serem realizadas, devido à resistência das células e tecidos caulinares lignificados. Nesse sentido, como os testes histoquímicos são importantes na detecção de estruturas, compostos celulares e marcação de estruturas químicas das células vegetais, como detecção de amido, açúcares, celulose, lignina, dentre outras moléculas, um método que pode ser utilizado para análises histoquímicas consiste na incorporação com o polímero PEG (polietilenoglicol 6000), secção dos cortes em micrótomo e marcações com distintos corantes histológicos para sempre analisados tanto por microscopia de luz quanto de fluorescência (FERREIRA et al., 2017; KITIN et al., 2010; VERHERTBRUGGEN et al., 2017). Desse modo, o presente trabalho teve como pontos chaves investigar a infiltração e cortes de seções de caules incorporados com PEG6000 e as análises histológicas sob microscopia de luz e fluorescência em regiões região do cilindro vascular em caules de *Nicotiana tabacum* L. (tabaco).

2 OBJETIVOS

Com base na literatura especializada em métodos e técnicas de anatomia o presente trabalho investigou o uso do Polietilenoglicol 6000 (PEG6000), como meio de infiltração e impregnação para cortes histológicos em seções de caules de plantas de tabaco. Adicionalmente, avaliamos se os testes histoquímicos (corantes e marcadores celulares) rotineiramente utilizados em laboratórios de anatomia e histoquímica vegetal, poderiam ser aplicados nos cortes para evidenciar as estruturas presentes no cilindro vascular. Para essa abordagem objetivou-se analisar os cortes obtidos tanto por microscopia de luz quanto de fluorescência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

Semente de *Nicotiana tabacum* L. (cv. Hav 425) foram germinadas em papel filtro e transplantadas após 10 dias de germinação para copos de café de 50 mL.

Plantas com 10 dias foram transferidas para potes de 500 mL e crescidas mais 20 dias em ambiente natural e aberto. Adicionou água e nutrientes (N-P-K) conforme necessidade.

3.2 Fixação, incorporação, cortes e confecção de lâminas histológicas

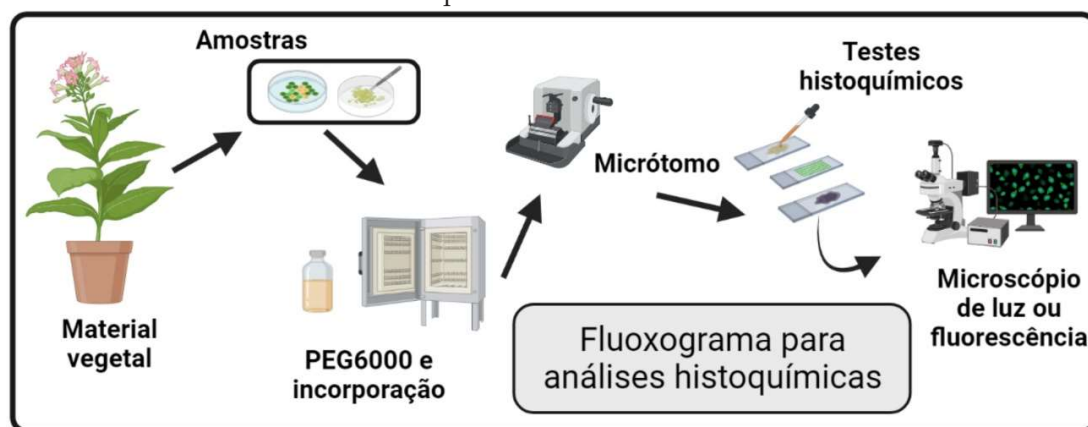
Após 40 dias de emergência (DAE) das plantas os fragmentos do caule com aproximadamente 5 cm² foram selecionados e fixados em solução Karnovsky, tampão fosfato pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965) e armazenados em geladeira, até o processamento das amostras.

Posteriormente os fragmentos caulinares, foram selecionados e infiltrados diretamente em solução de PEG (Polietilenoglicol 6000), em estufa entre 56-58 °C, e emblocados com uma mistura de PEG e goma arábica, seguindo métodos propostos (FERREIRA et al., 2017). Os blocos foram lapidados e cortados em micrótomo rotativo manual. Os cortes com espessura de 35 µm foram então submetidos a colorações de rotina da anatomia vegetal, conforme Tabela 1 (FERREIRA et al., 2017; KRAUS et al., 1998; SOUZA et al., 2016). Os cortes obtidos foram montados entre lâmina e lamínula com água e analisados em microscópio de luz e fluorescência (FERREIRA et al., 2017), com 3 repetições (Figura 1).

3.3 Análises qualitativas por microscopia de luz e fluorescência

Analisou-se em microscopia de luz (Leica ICC 50, Leica, Alemanha) e fluorescência (EKB-2F, Eikonal, Brazil) células e tecidos lignificados do cilindro vascular como elementos de vaso, fibras, células do raio interfasciculares e as células não lignificadas como as parenquimáticas corticais e medulares, conforme esquema da Figuras 1-4.

Figura 1 – Fluxograma para análises histoquímicas em amostras de tecido vegetal, incorporadas com PEG600, cortadas em micrótomo manual, coloração com testes histoquímicos e analisadas por microscopia de luz ou fluorescência.



Fonte: O Autor (2022)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Secções anatômicas de *Nicotiana tabacum* L. (cv. Hav 425), sob microscopia de luz, 40 DAE, apresentam cilindro vascular pouco desenvolvido (Figura 2). Foram identificadas as células do vaso, células do raio, xilema primário e xilema secundário em início do crescimento secundário com deposição de lignina, conforme os testes histoquímicos realizados. Além disso, células do parênquima cortical e medular também foram identificados nos cortes histológicos quando submetidos a distintos corantes (Figura 1-4). Observou-se que as células com paredes mais espessas como as células do vaso em comparação com as células interfascicular, estiveram delimitadas e contrastadas de maneira distintas das demais células majoritariamente constituídas por celulose, na região externa ao cilindro vascular (Figura 2-4).

Tabela 1 - Testes histoquímicos realizados para detecção e coloração visualizada das estruturas lignificadas do cilindro vascular de caules de tabaco.

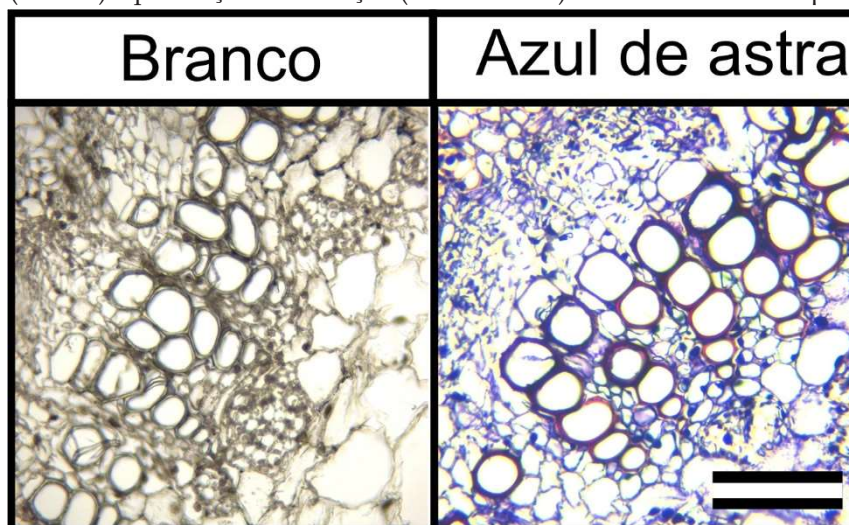
Teste histoquímico	Coloração visualizada
1.Branco	Ausência de coloração
2.Floroglucinol-HCl	Vermelho – Pink
3.Fucsina básica	Vermelho
4.Azul de toluidina tampão fosfato	Azul e roxo

Todas as análises foram comparadas com os cortes controle (1) (ausência de corantes) em relação aos demais testes histoquímicos (2,3 e 4) (Tabela 1).

4.1 Análises histoquímicas do cilindro vascular

Na ausência de coloração é possível distinguir na região do cilindro vascular células com paredes mais espessadas, possivelmente devido ao início de deposição da lignina, conforme os testes histoquímicos realizados nas seções (Figura 2). Células do parênquima cortical e medular também foram bem evidenciadas entre distintas colorações em tonalidades de azul (Figura 2). Feixes vasculares do protoxilema também foram evidenciadas nos cortes, demonstrando as regiões teciduais onde ocorreram deposição de lignina, em tonalidades do amarelo, alaranjado e vermelho, na região do cilindro vascular (Figura 2).

Figura 2 - Cortes histológicos em PEG6000 e analisados sob microscopia de luz, com ausência (branco) e presença de coloração (azul de astra). Barra de escala 300 μ m.



Fonte: O Autor (2022)

4.2 Análises histológicas sob microscopia de luz e fluorescência

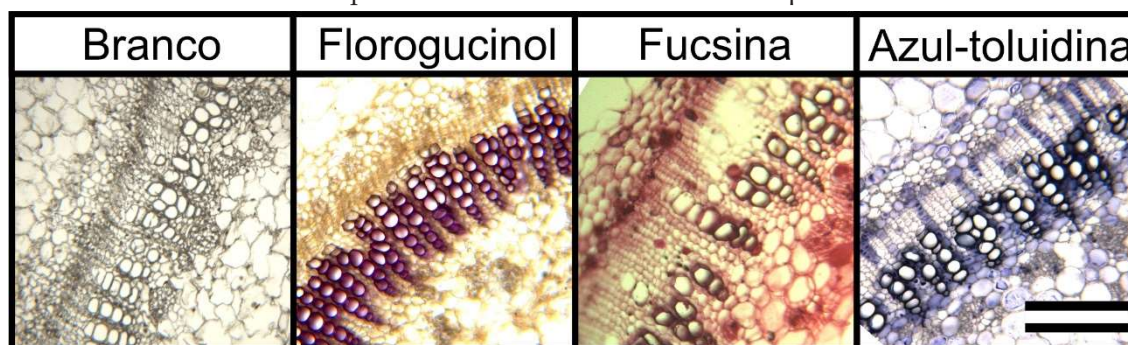
O teste com o floroglucinol-HCl evidencia células vermelho-pink principalmente as células xilemáticas e elementos de vaso, indicando que ocorreu a deposição de lignina, em tons avermelhados. No entanto, células parenquimáticas corticais não foram marcadas, indicando que somente o cilindro vascular apresentou deposição de lignina, suberina e outras substâncias hidrofóbicas nas paredes celulares (Figura 3). Adicionalmente a ausência de marcação em células parenquimáticas corticais e medulares, evidenciam a especificidade, onde a deposição de moléculas hidrofóbicas encontram-se majoritariamente presentes (ANTONIO et al., 2003; FALCIONI et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; SOUZA et al., 2016).

Nos testes com fucsina básica, diferentes tonalidades de vermelho foram evidenciadas (Figura 3), sendo que as células do vaso coram em vermelho escuro e as células do raio, medular e cortical em vermelho claro, conforme relatados em outros trabalhos (AKGUL; ÇOPUR; TEMIZ, 2007; FERREIRA et al., 2017; KAPP et al., 2015; KRAUS et al., 1998). Adicionalmente, observou-se e distinguiu-se células do protoxilema e do floema em tonalidade de vermelho mais claro (Figura 3).

Os testes com azul de toluidina evidenciaram células de elementos de vaso em azul escuro e as demais células do cilindro vascular em intensidade média, em relação a todo o corte histológico caulinar (Figura 3). Nesse sentido, ao comparar com as células também coradas da região medular e cortical do caule, evidencia-se que o PEG6000 exibiu excelente infiltração para obtenção dos cortes, além de

não interferir nas análises histológicas convencionais (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Figura 3 – Cortes histológicos em PEG6000 e analisados sob microscopia de luz. Da esquerda para a direita com ausência de coloração (branco), floroglucinol-HCl, fucsina básica e azul de toluidina, respectivamente. Barra de escala de 200 μ m.



Fonte: O Autor (2022)

Análises da composição molecular de células lignificadas ou celulósicas da região do cilindro vascular, parênquima cortical e medular em caule de tabaco (Figura 3), nos permitem distinguir alterações anatômicas do crescimento de uma planta, inferir sobre a condução de água e o ambiente de crescimento dessa planta (MAGDAONG; BLANKENSHIP, 2018). Ambientes de alta irradiância induzem a maior lignificação do caule enquanto ambientes de baixa irradiância apresentam menores teores na lignificação (FERREIRA et al., 2017; HEDDEN; SPONSEL, 2015). Por outro lado, células mais finas, tênues e frágeis, exibem menor deposição de lignina, o que pode ser visualizado com testes simples, rápidos, conforme analisado em nosso trabalho. Adicionalmente, essas análises histoquímicas, em microscopia de luz, em seções obtidas com PEG6000, permitiram analisar e verificar de maneira adequada padrões de crescimento e desenvolvimento dos tecidos vasculares e fundamentais em caules de plantas de tabaco (Figura 2 e 3) (ANDERSSON-GUNNERÅS et al., 2006; BLOEM et al., 2020; FERREIRA et al., 2017).

Os testes utilizados são rápidos, baratos e simples de se realizar. No entanto, cuidados adicionais devem ser realizados ao uso das soluções de floroglucinol-HCl que utiliza ácido clorídrico 18% e, que podem prejudicar as lentes objetivas dos microscópios quando em contato (SOUZA et al., 2016). Contudo, de modo geral, associar PEG com os testes histoquímicos propiciam ótimas colorações para análises histoquímicas em caules.

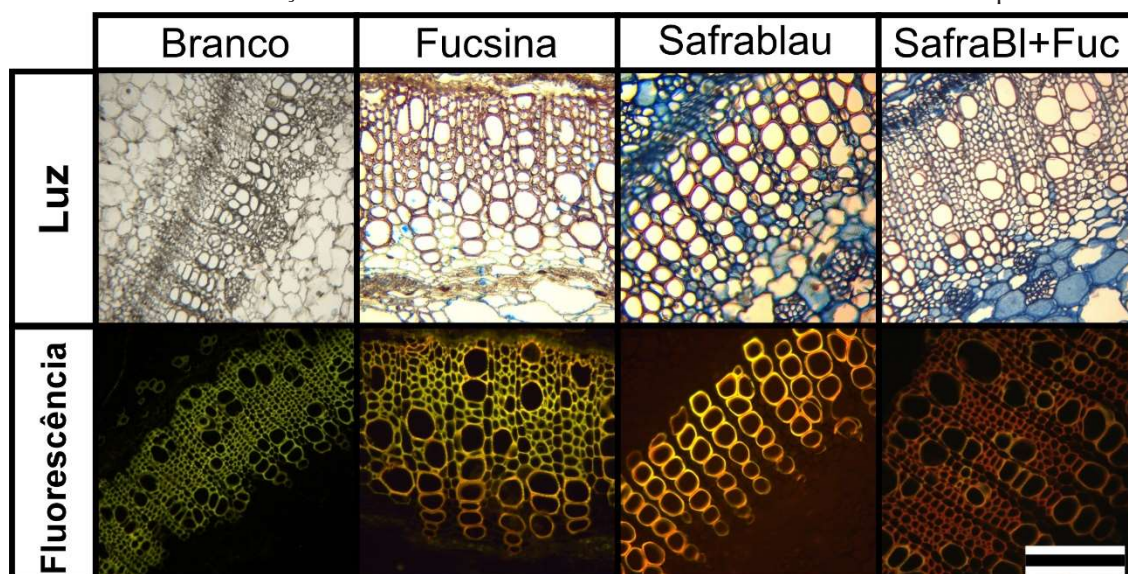
4.3 Análises de cortes histoquímicos impregnados com Polietilenoglicol (PG 6000) analisados por microscopia de fluorescência

Os cortes impregnados com PEG constituíram uma “ótima” ferramenta para análise sob microscopia de luz, sendo importante na padronização da espessura

dos cortes e na realização de testes histoquímicos (FERREIRA et al., 2017; SOUZA et al., 2016). Adicionalmente analisamos, sob microscopia de fluorescência, a possibilidade dos estudos histológicos, analisando cortes com ausência e presença de distintos corantes (Tabela 1 e Figura 4). Foram analisadas estruturas, no qual, em cortes a mão livre tornar-se-iam exageradamente espessos, desuniformes, levando muito tempo para obtenção de um único corte “bom” para análise das estruturas (FERREIRA; TEIXEIRA; ISAIAS, 2014).

Em análises de fluorescências as células do cilindro vascular foram evidenciadas em distintas colorações do amarelo ao vermelho, sendo que elementos de vaso possuem maiores intensidades de fluorescência em relação as fibras xilemáticas e células do raio interfascicular (Figura 4). Conforme FERREIRA et al., (2017), essa diferença de intensidade possivelmente está associado a incorporação de distintos monômeros da lignina, tanto em elementos de vaso quanto nas fibras xilemáticas (FERREIRA et al., 2017). Desse modo, não somente o uso do PEG6000 e testes histoquímicos rotineiramente usados para análises em microscopia de luz, permitiram analisar as células do cilindro vascular, mas também, a microscopia de fluorescência, revelou-se uma ferramenta altamente eficiente, simples e rápida para estudo da composição da lignina presentes nas células, dos tecidos analisados (Figura 4).

Figura 4 – Cortes histológicos em PEG6000 e analisados sob microscopia de luz e fluorescência. Da esquerda para a direita com ausência de coloração (branco), fucsina, safranina e azul de astra (Safrablau) e safranina e azul de astra + fucsina (Safrabl+Fuc). Análises de fluorescência foram realizadas com excitação em 400 nm e emissão em 550 nm. Barra de escala de 200 μ m.



Fonte: O Autor (2022)

Os testes histoquímicos nos tecidos vegetais de caule de tabaco evidenciaram o padrão esperado para plantas saudáveis e em crescimentos secundários. As análises realizadas permitiram ainda, comparar distintas colorações e marcações histológi-

cas evidenciando as estruturas padrões de células do parênquima cortical, medular e do cilindro vascular (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Assim sendo, análise de caules em crescimento secundário, podem se realizar em materiais infiltrados e cortados com PEG6000 em relação àqueles obtidos a mão livre de modo eficiente e ainda, serem analisados tanto por microscopia de luz quanto de fluorescência em análises rotineiramente executadas em laboratórios de anatomia e histoquímica vegetal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises histoquímicas associados ao PEG em caules de *Nicotiana tabacum* L. são rápidas e simples de se realizarem. Nosso trabalho demonstrou as possibilidades em distinguir distintas células, presentes em tecidos caulinares em crescimento primário e secundário, verificar os diferentes padrões de lignificação dos tecidos, fornecendo informações rápidas e precisas das estruturas das plantas. Dessa forma recomendamos o uso do PEG associado aos testes histoquímicos para melhor padronização das análises anatômicas, especialmente quando se objetiva estudar as células dos tecidos caulinares por microscopia de luz e fluorescência.

REFERÊNCIAS

- AKGUL, M.; ÇOPUR, Y.; TEMİZ, S. A comparison of kraft and kraft-sodium borohydrate treated pine pulps. **Building and Environment**, v. 42, n. 7, p. 2586–2590, 2007.
- ANDERSSON-GUNNERÅS, S. et al. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: Global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. **Plant Journal**, v. 45, n. 2, p. 144–165, 2006.
- ANTONIO, É. et al. The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt . cv . *purpurea* Boom (Commelinaceae) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 617–624, 2003.
- BLOEM, E. et al. The potential of spectral measurements for identifying glyphosate application to agricultural fields. **Agronomy**, v. 10, n. 9, 2020.
- FALCIONI, R. et al. Cell wall structure and composition is affected by light quality in tomato seedlings. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, n. December 2019, p. 111745, 2020.

FERREIRA, B. G. et al. Preventing False Negatives for Histochemical Detection of Phenolics and Lignins in PEG-Embedded Plant Tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 65, n. 2, p. 105–116, 2017.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A century of gibberellin research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 4, p. 740–760, 2015.

KAPP, N. et al. Imaging with the fluorogenic dye Basic Fuchsin reveals subcellular patterning and ecotype variation of lignification in *Brachypodium distachyon*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4295–4304, 2015.

KITIN, P. et al. Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: A study by cryo-fluorescence microscopy. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 887–898, 2010.

KRAUS, J. E. et al. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 5, p. 235–243, 1998.

MAGDAONG, N. C. M.; BLANKENSHIP, R. E. Photoprotective, excited-state quenching mechanisms in diverse photosynthetic organisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5018–5025, 2018.

SOUZA, L. A. et al. **Morfologia e anatomia vegetal: técnicas e práticas**. 3. ed. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2016.

VERHERTBRUGGEN, Y. et al. A comparative study of sample preparation for staining and immunodetection of plant cell walls by light microscopy. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. August, p. 1–17, 2017.

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DA FIBROSE PULMONAR

EXPERIMENTAL THERAPEUTIC STRATEGIES FOR THE TREATMENT OF PULMONARY FIBROSIS

Bruno José da Silva Bezerra¹
Júlia Yone da Silva Pereira²
Natan Cordeiro Silva³
Thaís Alves dos Santos⁴
Maria Eunice Siqueira Lira⁵
Jannyson José Braz Jandú⁶
Fernanda Miguel de Andrade⁷
Maria Tereza dos Santos Correia⁸

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.2

1 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: bruno.bjsb@ufpe.br, <http://lattes.cnpq.br/5524038913919195>

2 Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada, PE, Brasil. E-mail: juliayone64@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/3077465386884652>

3 Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: cordeironatan71@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/5861102020265570>

4 Departamento de Farmácia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada, PE, Brasil. E-mail: thaisaquino31@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/2013581069276851>

5 Departamento de Farmácia, Faculdade de Integração do Sertão, 56909-205, Serra Talhada, PE, Brasil. E-mail: mariaeunicelira1@hotmail.com, <http://lattes.cnpq.br/5859234758930507>

6 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: jannysonjose@hotmail.com, <http://lattes.cnpq.br/0003751583176190>

7 Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: fernanda_miguel3@yahoo.com.br, <http://lattes.cnpq.br/8915203118340030>

8 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil. E-mail: mtscorreia@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/7863845087003953>

RESUMO

A Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) é uma doença progressiva, de caráter fibrosante que acomete os pulmões gerando prejuízos nas trocas gasosas. Apresenta um prognóstico difícil em decorrência do tratamento farmacológico limitado que possui. O objetivo deste estudo foi fazer um levantamento das estratégias terapêuticas experimentais desenvolvidas para o tratamento e/ou controle da FPI. Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, onde foram analisados artigos publicados no período de 2002 a 2021 disponíveis nas seguintes bases de dados: Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e JAMA Network (AMA). De acordo com os artigos analisados, os corticosteroides são os mais usados nas fases avançadas da FPI, apesar da literatura apontar poucos ou nenhum benefício desse fármaco. Também foi analisado o comportamento de anti-inflamatórios, beta-bloqueadores e estatinas frente a FPI. Entre as terapias estudadas, a oxigenoterapia é citada como sendo usual em indivíduos acometidos pela doença uma vez que há comprometimento importante na respiração observado através da saturação periférica de oxigênio e desconforto da musculatura respiratória. Os resultados encontrados ainda não são totalmente favoráveis, havendo a necessidade de serem desenvolvidos novos estudos com terapias que possam minimizar a progressão da FPI.

Palavras-chave: Fibrose, Pirfenidona, Nintedanibe, Corticosteroides, Oxigenoterapia.

ABSTRACT

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a progressive, fibrosing disease that affects the lungs, causing losses in gas exchange. It has a difficult prognosis due to the limited pharmacological treatment it has. The aim of this study was to survey the experimental therapeutic strategies developed for the treatment and/or control of IPF. This is an integrative literature review, where articles published between 2002 and 2021 available in the following databases were analyzed: Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO) and JAMA Network (AMA). According to the articles analyzed, corticosteroids are the most used in the advanced stages of IPF, despite the literature indicating little or no benefit of this drug. The behavior of anti-inflammatory drugs, beta-blockers and statins against IPF was also analyzed. Among the therapies studied, oxygen therapy is mentioned as usual in individuals affected by the disease, since there is significant impairment in breathing observed through peripheral oxygen saturation and respiratory muscle discomfort. The results found are still not entirely favorable, and there is a need to develop new studies with therapies that can minimize the progression of IPF.

Keywords: Fibrosis, Pirfenidone, Nintedanib, Corticosteroids, Oxygen Therapy.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) é uma doença que acomete o interstício pulmonar, se manifestando por fibrose progressiva, de etiologia desconhecida, que ocorre principalmente em adultos de idade avançada, e que apesar de ser rara, é o quadro clínico mais prevalente das Pneumonias Intersticiais Idiopáticas. É acompanhada por perda funcional, dispneia progressiva e comprometimento da qualidade de vida (MANCUZO; SOARES E PEREIRA, 2018; PEREIRA 2016). A prevalência de FPI é estimada em 20 casos por 100.000 habitantes, e aproximadamente 10% dos casos são de Fibrose Pulmonar Familiar (BORIE E CRESTANI, 2019). Geralmente se apresenta na 6ª ou 7ª década de vida de fumantes e ex-fumantes, sendo mais comum em homens (PEREIRA et al., 2019).

Do ponto de vista fisiopatológico, a FPI é resultante de uma resposta reparativa anormal (ainda que o estímulo não seja completamente elucidado) evocada pelo acúmulo e persistência dos miofibroblastos. As interações viciosas entre epitélio alveolar lesado, miofibroblastos e matriz extracelular neodepositada levam à fibrose e disfunção tecidual. No tecido pulmonar fibrótico é possível identificar aspecto irregular, com distribuição temporal heterogênea, áreas de pulmão preservado ao lado de outras comprometidas por fibrose, remodelamento do parênquima pulmonar e presença de focos fibroblásticos (COLETTA, 2003; DOURADO; KAIRALLA; CARVALHO, 2013; PEREIRA 2016).

A FPI possui sinais e sintomas semelhantes com a Fibrose Cística (FC), no entanto são doenças diferentes. A FC é uma doença genética autossômica recessiva, rara, caracterizada por infecção pulmonar crônica e comprometimento de glândulas exócrinas (FEITEN et al., 2016; RIBEIRO; RIBEIRO; RIBEIRO, 2002; ROSA et al., 2008). Nessas doenças ocorre o processo de autofagia, que é quando o organismo entende que o corpo está escasso de nutrientes (CARMO et al., 2021).

O mecanismo da autofagia ocorre por via catabólica, degradando as organelas e componentes que deixaram de ser essenciais da própria célula nos lisossomos, o material celular é envolto por uma membrana e decomposto. Estudos recentes demonstram que a autofagia minimiza os efeitos patológicos do acúmulo de proteína nos sistemas hepático, cardiovascular e respiratório (HIDVEGI et al., 2015).

Desde dezembro de 2019, um surto inesperado de uma nova pneumonia por coronavírus altamente contagiosa (COVID-19) varreu rapidamente o mundo. Em

novembro de 2020, o surto havia crescido por infectar mais de 57 milhões de pessoas, com mais de 1,3 milhão de mortes em mais de 200 países. Estima-se que aproximadamente 13,8% das infecções evoluíram para doença grave e 6,1% em estado crítico (PAN et al., 2021). De acordo com a literatura uma proporção considerável de pacientes com covid-19 pode evoluir com FPI, uma consequência do processo de reparação da lesão pulmonar. É possível observar a presença de sequelas tomográficas persistentes que podem estar relacionadas com comprometimento funcional (AMARAL et al., 2021; BALDI, TANNI 2021; SANTANA, FONTANA, PITTA 2021).

Nas últimas décadas, diversas modalidades terapêuticas farmacológicas, com variados mecanismos de ação, foram investigadas para o tratamento dessa doença, com um número substancial de estudos resultando em desfechos negativos. Apesar disso, novos fármacos têm mostrado benefícios para o tratamento da FPI e alguns deles já estão disponíveis no mercado para essa indicação (MARTINEZ et al., 2020).

Após anos de ensaios decepcionantes, a Pirfenidona e o Nintedanibe surgiram como os primeiros fármacos efetivos para controle dessa doença, no qual ambos bloqueiam a formação de cicatrizes, diminuindo a taxa de declínio da função pulmonar nos indivíduos acometidos. Além disso, a suplementação de oxigênio e a reabilitação pulmonar têm sido indicadas para minimizar os episódios de dispneia, uma vez que esse é um dos principais agravos da FPI (GULER et al., 2021; MARTINEZ et al., 2015).

Diante da escassez de alternativas farmacológicas, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver tratamentos alternativos eficazes e não tóxicos para indivíduos com FPI. Esta pesquisa objetiva fazer um levantamento das estratégias terapêuticas experimentais que estão sendo desenvolvidas para o tratamento e/ou controle dessa patologia.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa, realizada a partir de buscas nas seguintes bases de dados: Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO) e JAMA Network (AMA). Onde foram levados em consideração os seguintes critérios de inclusão: artigos de pesquisa, publicações dos últimos vinte anos (janeiro/2002 a julho/2021), texto integral disponível no idioma inglês; e os seguintes critérios de exclusão: revisões de literatura e trabalhos que não tratavam da temática proposta neste estudo. Descritores utilizados: “Fibrosis”, “Pulmonary Fibrosis”, “Drug Therapy”.

Após a coleta dos artigos, os títulos e resumos dos mesmos foram lidos, aqueles que não atendiam os critérios de inclusão e as repetições foram excluídos. Os artigos selecionados, após a leitura dos títulos e resumos, foram lidos na íntegra, os que não atendiam os critérios de inclusão foram excluídos, e os selecionados tiveram seus resultados analisados e comparados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há algumas décadas pesquisadores tentam reproduzir doenças pulmonares intersticiais em modelos experimentais, principalmente a FPI. Nisso vários protocolos farmacológicos e diferentes modalidades ventilatórias foram propostos para o tratamento dessas patologias, contudo o uso de corticosteroides, além da oxigenoterapia nas fases mais avançadas ainda é o usual (CABRAL, 2013).

Os corticosteroides (também chamados de glicocorticoides e esteroides) são fármacos com potencial anti-inflamatório amplamente utilizados na prática clínica, com apresentação imediata ou tardia. Do ponto de vista bioquímico são compostos derivados do colesterol, cuja estrutura consiste em três anéis com seis átomos de carbono e um anel com cinco átomos de carbono (COUTINHO et al., 2020). De acordo com a literatura estudos investigaram o uso de corticosteroides na FPI (LUPPI et al., 2004).

O estudo de Pereira et al. (2006) utilizou corticosteroides isolados, e imunossupressores e corticosteroides combinados em indivíduos com FPI. Ao final 59% dos voluntários evoluíram a óbito por complicações respiratórias. Ainda assim foi observado que os fármacos combinados promoveram uma maior sobrevida em comparação aos isolados. Em um estudo realizado na França com indivíduos com FPI em estágio grave, 27% eram tratados com corticosteroides isolados, e 22% com a terapia combinada (COTTIN et al., 2014). No entanto para Rodrigues (2007), esse tipo de terapia conhecida como tradicional tem se mostrado de pouco ou nenhum benefício.

O fracasso de terapias anti-inflamatórias visando minimizar a progressão da FPI ou retardar a mortalidade tem promovido o estudo de terapias antifibróticas. Portanto, a descoberta de novos alvos terapêuticos para essa doença é crucial. Estudos que exploram os mecanismos envolvidos na FPI identificaram vários alvos possíveis para intervenções terapêuticas (ZHANG et al., 2021). Segundo Hidvegi et al., (2015), o excesso de deposição de colágeno produz mudanças significativas na função pulmonar, tais como: diminuição da complacência, aumento da resistência tecidual e alteração da histerese. Seu estudo realizado com camundongos concluiu

que o aumento do processo de autofagia com uso de drogas intensificadoras (CBZ / Flu) e de transferência de genes aos pulmões é capaz de reverter os efeitos tóxicos da proteinopatia respiratória e reduzir a infiltração de leucócitos, sendo um mecanismo importante de proteostase endógena e uma boa alternativa para a terapia.

Em um estudo de caso realizado durante trabalho de parto em uma gestante diagnosticada na pré adolescência com hemossiderose pulmonar idiopática (HPI) que é uma condição rara associada a fibrose pulmonar, foi aplicado suporte de oxigênio (O₂) através de máscara facial (10litros). Na tentativa de melhorar sua oxigenação durante o trabalho de parto, instituíram a ventilação não invasiva (VNI). A gestante não descompensou, em via normal, reduzindo-se a oferta de O₂ para 1-3 litros/min, nesse caso com cateter nasal pós parto (ALLEN et al., 2008). Para Cabral (2013), a oxigenoterapia é um dos métodos considerados cruciais para os pacientes com FPI em estágios mais graves da doença.

Visando associar a relação entre estatinas e doença pulmonar intersticial, Ponnuswamy et al. (2009), realizaram um estudo de caso-controle em pacientes com diagnóstico de fibrose pulmonar. Dentre os medicamentos analisados estão: as aspirinas, diuréticos, antiinflamatórios, betabloqueadores, e estatinas. Concluíram que não há correlação entre o uso de estatinas e a doença. No entanto, relataram que há uma associação significativa entre doença isquêmica cardíaca e doença pulmonar intersticial independente dos medicamentos prescritos. Vale ressaltar que há inúmeras pesquisas sobre o sistema renina-angiotensina e seu papel na fisiopatologia da fibrose, foi observado que a inibição da angiotensina convertase (ACE) atenuou a fibrose pulmonar induzida, possibilitando o interesse na inibição da ACE como uma terapia potencial.

Murphy et al. (2010) avaliaram os fatores de ativação dos macrófagos nos pulmões de indivíduos portadores de fibrose cística nas condições de infecção pela *Pseudomonas aeruginosa* (PA), terapia com drogas imunomoduladores e função pulmonar. Os dados revelados no estudo sustentam a hipótese de que os macrófagos alternativamente ativados são relevantes na fisiopatologia da infecção crônica de PA, devido a capacidade da azitromicina de polarizar o macrófago em direção ao fenótipo. Além disso, as citocinas IL-4 e IL-13 desempenham um papel na ativação de macrófagos no processo da doença.

Para avaliar a eficácia da terapia com rituximabe em doença pulmonar, Marie et al. (2012), analisaram o prontuário de pacientes portadores de doença pulmonar intersticial, acompanhados durante um ano, sendo que esses indivíduos não responderam a terapia anterior com esteroides, drogas citotóxicas e imunoglobulinas

intravenosa. Com exceção da prednisona, foram suspensos para dar início ao tratamento com rituximabe. Ao longo do período analisado os pacientes apresentaram melhora significativa da sintomatologia clínica da doença incluindo dispnéia e tosse, concluindo que o medicamento é uma proposta adequada de tratamento para doenças pulmonares.

CONCLUSÃO

A FPI promove várias repercussões negativas no sistema respiratório dos indivíduos acometidos principalmente dispnéia que é causada pela dificuldade que os pulmões apresentam de realizar o processo de hematose eficazmente. Embora novas estratégias tenham sido testadas visando atuar na regressão e controle dessa doença, os resultados ainda não são totalmente favoráveis, diante disso é necessário que novos estudos sejam executados a fim de desenvolver terapias que promovam uma melhora no quadro de saúde dos pacientes, e consequentemente na sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, T. K. et al. Management of a parturient with an acute exacerbation of idiopathic pulmonary haemosiderosis and posterior spinal instrumentation. **British journal of anaesthesia**, v. 100, n. 2, p. 235-239, 2008.
- AMARAL, A. F. et al. Exacerbação aguda de fibrose pulmonar pós-COVID-19: viagens aéreas como um potencial gatilho. **Jorn. Bras. Pneum.**, v. 47, 2021.
- BALDI, B. G.; TANNI, S. E. Fibrose pulmonar e acompanhamento de sobreviventes da COVID-19: necessidade urgente de esclarecimento. 2021.
- BORIE, R.; CRESTANI, B. Fibrose pulmonar familiar: um mundo sem fronteiras. **Jorn. Bras. Pneum.**, v. 45, 2019.
- CABRAL, R. M. Modelos experimentais de doenças pulmonares fibrosantes. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2013.
- CARMO, T. I. T. et al. Análise dos efeitos terapêuticos do CAPE sobre a fisiopatologia da fibrose cística. **Revista da Semana Acadêmica do Curso de Medicina da UFFS-Campus Chapecó**, v. 4, n. 4, 2021.
- COLETTA, E.N.A.M et al. Achados histológicos e sobrevida na fibrose pulmonar idiopática. **Jor. Pneu.**, v. 29, n.6, p. 371-378, 2003.
- COTTIN, V. et al. Management of idiopathic pulmonary fibrosis in France: a survey of 1244 pulmonologists. **Respiratory medicine**, v. 108, n. 1, p. 195-202, 2014.
- COUTINHO, I. A. et al. Hipersensibilidade a corticosteroides-Uma revisão. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 28, n. 3, p. 149-160, 2020.

DOURADO, L. K.; KAIRALLA, R. A.; CARVALHO, C. R. Fibrose pulmonar idiopática: uma atualização. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 1, p. 33-37, 2013.

FEITEN, T. S. et al. Fisioterapia respiratória: um problema de crianças e adolescentes com fibrose cística. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, p. 29-34, 2016.

GULER, S. A. et al. Pulmonary function and radiological features 4 months after COVID-19: first results from the national prospective observational Swiss COVID-19 lung study. **European respiratory journal**, v. 57, n. 4, 2021.

HIDVEGI, T. et al. Enhancing Autophagy with Drugs or Lung-directed Gene Therapy Reverses the Pathological Effects of Respiratory Epithelial Cell Proteinopathy. **Journal of biological chemistry**, v. 290, p. 29742-29757, 2015.

LUPPI, F. et al. Corticosteroid and immunomodulatory agents in idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory medicine**, v. 98, n. 11, p. 1035-1044, 2004.

MANCUZO, E. V.; SOARES, M. R.; PEREIRA, C. A. C. Distância no teste de caminhada de seis minutos e sobrevida na fibrose pulmonar idiopática no Brasil. **Jor. Bras. Pneum.**, v. 44, p. 267-272, 2018.

MARIE, I. et al. Rituximab therapy for refractory interstitial lung disease related to antisynthetase syndrome. **Respiratory medicine**, v. 106, p. 581-587, 2012.

MARTINEZ, J. B. et al. Atualização do diagnóstico e tratamento da fibrose pulmonar idiopática. **Jor. Bras. Pneum.**, v. 41, n.5, p.454-466, 2015.

MARTINEZ, J. B. et al. Diretrizes brasileiras para o tratamento farmacológico da fibrose pulmonar idiopática. **Jor. Bras. Pneum.**, v. 46, n.2, 2020.

MURPHY, B. S. et al. Characterization of macrophage activation states in patients with cystic fibrosis. **Journal of cystic fibrosis**, v. 9, p. 314-322, 2009.

PAN, S. et al. Airway resistance variation correlates with prognosis of critically ill COVID-19 patients: A computational fluid dynamics study. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 208, p. 106257, 2021.

PEREIRA, C. A. et al. Survival in idiopathic pulmonary fibrosis – cytotoxic agents compared to corticosteroids. **Respiratory medicine**, v. 100, n. 2, p. 340-347, 2006.

PEREIRA, J. M. Fibrose Pulmonar Idiopática. **Act. Rad. Portuguesa**, v. 28, n. 108, 2016.

PEREIRA, C. A. C. et al. Segurança e tolerabilidade de Nintedanibe em pacientes com fibrose pulmonar idiopática no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, 2019.

PONNUSWAMY, A et al. Association between ischaemic heart disease and interstitial lung disease: A case-control study. **Respiratory medicine**. v. 103, issue 4, p. 503-507, 2009.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. O.; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística: do pediatra ao especialista. **Jornal de pediatria**, v. 78, p. 171-186, 2002.

RODRIGUES, M. Diagnóstico e tratamento da fibrose pulmonar idiopática:[revisão]. **Brasília méd**, p. 240-245, 2007.

ROSA, F. R. et al. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 725-737, 2008.

SANTANA, A. V.; FONTANA, A. D.; PITTA, F. Reabilitação pulmonar pós-COVID-19. Vol 47, 2021.

ZHANG, T. et al. Salvianolic acid B inhalation solution enhances antifibrotic and anticoagulant effects in a rat model of pulmonary fibrosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111475, 2021.



CAPÍTULO 3

TOXICIDADE DA *BACILLUS THURINGIENSIS* CONTRA LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*: AVALIAÇÃO DE ISOLADOS REGIONAIS

*TOXICITY OF BACILLUS THURINGIENSIS AGAINST
AEDES AEGYPTI LARVAE: EVALUATION OF REGIONAL
ISOLATES*

Camila Cassia Silva Araújo¹

José de Paula Oliveira²

José Manoel Wanderley Duarte Neto³

Ana Lúcia Figueiredo Porto⁴

DOI: 10.46898/rfb.9786558892489.3

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Recife-PE <http://lattes.cnpq.br/2278387392313875>

² Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) Recife-PE <http://lattes.cnpq.br/3540150611094753>

³ Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) Recife-PE <http://lattes.cnpq.br/0685998873631474>

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Recife-PE <http://lattes.cnpq.br/4989617783837981>

RESUMO

O uso do biolarvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* no controle do *Aedes aegypti* vem ganhando espaço devido aos benefícios que o controle biológico proporciona. Neste trabalho foram selecionadas doze linhagens do banco de bactérias entomopatogênicas junto ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) com o intuito de verificar a eficiência das mesmas na mortalidade de larvas de *A. aegypti*, para isso, foi analisado sua produção de esporos e cristais ativos sobre as larvas dos insetos de ordem Diptera. Esses dados foram confrontados com os resultados de bioensaios que verificaram a real eficiência dessas linhagens e auxiliaram na seleção do melhor isolado com eficiência de mortalidade a larvas de *A. aegypti*.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*; *Bacillus thuringiensis*; Biolarvicidas; Cepas.

ABSTRACT

The use of *Bacillus thuringiensis*-based biolarvicides to control *Aedes aegypti* has been gaining ground due to the benefits that biological control provides. In this work, twelve strains were selected from the bank of entomopathogenic bacteria at the Instituto Agronomic of Pernambuco (IPA) in order to verify their efficiency in the mortality of *A. aegypti* larvae, for that, their production of spores and active crystals was analyzed. on the larvae of insects of the order Diptera. These data were compared with the results of bioassays that verified the real efficiency of these strains and helped in the selection of the best isolate with efficiency of mortality to *A. aegypti* larvae.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Bacillus thuringiensis*; Biolarvicides; strains.

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses, como a Zika, Dengue e Chikungunya, são um crescente problema de saúde pública no mundo principalmente pelo potencial de dispersão, pela capacidade de adaptação a novos ambientes, pela possibilidade de causar epidemias extensas, e pela susceptibilidade universal e ocorrência dos grandes números de casos graves, com acometimento neurológico, articular e hemorrágico. A introdução de qualquer arbovírus em área endêmica ou com a presença do vetor nunca deve ser negligenciada (SANTOS et al., 2018).

Diante das duas espécies de *Aedes* que estão aptas a transmitir doenças, o *A. aegypti* ainda é o vetor mais frequente no Brasil. O *A. aegypti* apresenta ampla distribuição mundial, sendo mais encontrado em regiões tropicais e subtropicais. tem

hábito diurno, a hematofagia realizada pelas fêmeas para a maturação dos ovos ocorre, preferencialmente, nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer (HALSTEAD, 2015)

Existem uma vasta gama de possibilidades de se prevenir doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores, que vão desde a realização de densidade de seus vetores, afim de reduzir o risco de transmissão. Esse controle pode ser realizado com aplicação em diversos métodos de intervenção dentre eles: Controle Biológico, Químico e Mecânico. Diante disso faz-se necessário a prospecção de novas cepas que mostrem toxicidade específica pelas espécies dos mosquitos vetores, além de contribuir para geração de produtos naturais biologicamente ativos extraídos de micro-organismos, a fim de minimizar os impactos sociais e econômicos que as patologias transmitidas pelos vetores podem ocasionar (ZARA et al., 2016)

Dentro dessa perspectiva, o desenvolvimento das pesquisas no âmbito de produção de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* bt tem crescido principalmente por não oferecer efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente e por ser considerada uma alternativa eficiente no controle dos surtos de doenças tropicais e arboviroses, conhecida mundialmente por sua forte toxicidade inseticida, a bactéria *Bacillus thuringiensis* está entre os entomopatógenos que mais vem sendo utilizados para o controle biológico de insetos (ZARA et al., 2016; YILMAZ et al., 2017).

Este trabalho buscou identificar o isolado de um banco de cepas regionais de Pernambuco, que apresentasse maior atividade larvicida para *Aedes aegypti*.

2 METODOLOGIA

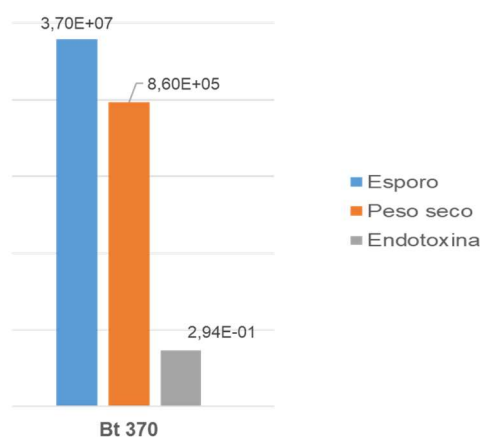
Nesse cenário, foi realizada a presente pesquisa, baseada na seleção de artigos através do levantamento bibliográfico em bases de dados científicas. A busca foi feita na PUBMED e na BIBLIOTECA VIRTUAL DE SAÚDE com os seguintes descritores da busca em língua portuguesa e inglesa com o operador booleano: *Bacillus thuringiensis* AND *Aedes aegypti*. Além de dados publicados em páginas de diferentes instituições científicas e governamentais. Os limites de busca adotados basearam-se em publicações disponíveis em texto completo, com livre acesso.

Foram testados doze isolados de bt obtidos no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sendo eles (pri4.5; bt 1.2; bt 4.3; pri 1.3; pri 2.2; bt 392; pri 4.25; bt 1022b; bt 2.1; bt 370; bt BRE; bt 1.3.). Após a fermentação em caldo Luria Bertani (LB), a produção de endotoxinas e esporos foram avaliadas e os melhores produtores foram bioensaiados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As linhagens bt 370, bt 1022b, bt bre, bt 1.3 e bt 2.1 apresentaram maior produção de endotoxinas, sendo a bt 370 a maior produtora de esporos dentre as linhagens testadas. Observando esses dados apenas essas foram submetidas aos testes de bioensaios afim de avaliar seu efeito larvicida, a cepa bt 2.1 não apresentou atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, as cepas, 1.3 e 370 apresentaram 95% e 100% de mortalidade respectivamente, enquanto as cepas bt 1022b, bt bre, e bt 2.1 tiveram mortalidade inferior a 50%. Diante desses resultados a cepa elegível para dá continuidade aos testes de toxicidade foi a bt 370.

Gráfico 1 - Avaliação da produção de Esporos, Peso seco e Endotoxinas bt 370



Fonte: A autora

3.2 Microrganismo e manutenção

A cepa 370 do *Bacillus thuringiensis* foi adquirida junto ao acervo do laboratório de Biotecnologia do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). A cepa foi reativada em Caldo Lauria-Bertani, (extrato de levedura 5 g/L, triptona 10 g/L e NaCl 10 g/L), incubada a 30 °C por 24h e, posteriormente, armazenada a -20 °C.

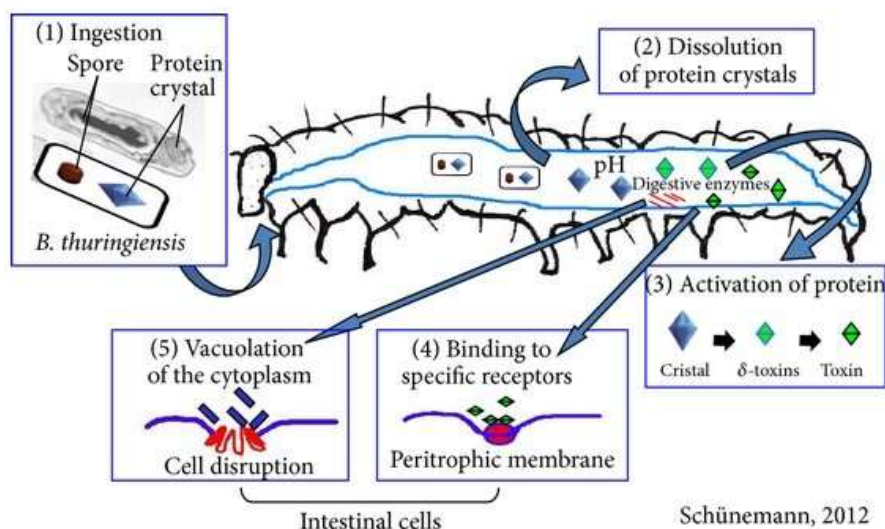
3.3 A avaliação da capacidade larvicida

As toxinas produzidas por bt no meio de cultura Luria Bertani contra *Aedes aegypti* em seu estado larval (instar 3) foi realizada de acordo com Oliveira et al. (1998), no qual os resultados foram considerados conforme a seguinte classificação: 20% de mortalidade igual a baixa toxicidade; 21% a 50% de mortalidade igual a média toxicidade; > 50% mortalidade igual a alta toxicidade.

Nos bioensaios, as larvas foram expostas a concentrações obtidas que variaram entre 0.2mg/ml até 1.0 mg/ml, a partir do meio de cultura. Cada réplica foi constituída por 15 larvas alocadas em 10 ml de água destilada em recipientes plásti-

cos isolados. O registro da mortalidade foi feito após 24 h de exposição. A mortalidade foi avaliada pela contagem do número de larvas mortas e a pela determinação das concentrações letais $LC_{50\%}$ e $LC_{90\%}$ foram avaliadas por análise ProBbit, através do software STATISTICA 7.0.

Figura 1 - Mecanismo de Ação da *Bacillus thuringiensis*



Os inseticidas/larvicidas microbianos as bases de bt ocupam cerca de 90% do mercado mundial, sendo de grande eficácia na eliminação de vetores de doenças a humanos, proteção de cultivos e florestas. A bt ao esporular produz um corpo parasporal composto de toxinas proteicas chamadas de endotoxinas onde atuam como pró toxinas, a ação ocorre através da ingestão do cristal de toxina, o qual não tem ação direta, sendo considerada uma pró-toxina. Pois quando ingeridas pelas larvas dos insetos são convertidas em toxinas ativas através de clivagem por enzimas proteolíticas no intestino médio do inseto. (SCHUNEMANN, 2012).

As toxinas ativas se ligam à membrana microvilar em insetos sensíveis, lisam a célula e destroem o epitélio intestinal, causando a morte (Figura 1).

A toxina ao se ligar nos receptores das células no intestino vai interferir no gradiente iônico e no balanço osmótico do inseto, promovendo a ruptura da parede celular, seguida da morte do inseto. A alimentação do inseto após a ingestão do bt causa um aumento relativo na concentração de potássio no lúmen do intestino médio leva a morte do inseto pode ocorrer, entre outros motivos, por inanição provocada pela parada de ingestão de alimentação após a infecção generalizada no inseto. (FIUZA et al., 2010).

Foi constatado por SALLES et al., (2021). Que outros microrganismos presentes no solo, quando em contato com o formulado a base de cristais de proteínas de bt não apresentaram nenhum sintoma e não tiveram morte decorrente do tratamento.

Diante desses resultados a cepa mostrou-se eficiente na produção de esporos e cristais ativos, além proporcionar efeito larvicida em 100% frente as larvas do *A. aegypti* e não apresenta riscos à saúde dos demais insetos inseridos no meio.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, o melhor isolado com efeito larvicida nesta busca foi a linhagem bt 370, apresentando elevado nível de toxicidade para as larvas do *Aedes aegypti* e com potencial para elaboração de um biolarvicida com aplicação em campo.

5 AGRADECIMENTOS

O trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Instituto agrônomo de Pernambuco (IPA). Laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e o Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ).

6 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Todos os autores do presente trabalho declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- CINARA RAMOS SALLES, ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS. Inibição do crescimento de *Spodoptera frugiperda* e fitopatógenos causados por isolados bacterianos obtidos de lagartas infectadas com microrganismos do solo. **Microbiologia agropecuária**. 2021.
- FIUZA, L. M. MECANISMO DE AÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 32-35, 2010.
- HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, jan. 2008
- SANTOS, E.A.; DANTAS, L.V.A.; MORAES, D.A.N.; FERREIRA, J.A.; SILVA, E. G.S.N.; ROCHA, M.T.P.; SANTOS, I.G.V.; DINIZ, M.C. Desenvolvimento de tecnologias relacionadas à dengue, Chikungunya e zika. **Encontro nacional de propriedade intelectual**, p.1-7, 2018.

SCHNEMANN, O.A. Modo de ação e especificidade das toxinas de *Bacillus thuringiensis* no controle de lagartas e percevejos na cultura da soja, **Microbiology**, 2014.

YILMAZ, S.; AZIZOGLU, U.; AYVAZ, A.; TEMIZGUL, R.; ATCIYURT, Z.B.; KARABÖRKLÜ, S.; Cloning and expression of cry2Aa from native *Bacillus thuringiensis* strain SY49-1 and its insecticidal activity against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 81-85, 2017.

ZARA, A.L.SA.; SANTOS, A.M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, R.E. *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Epidemiology Service Cheers** v. 25, p.1-7, 2016.



The background of the cover is a grayscale microscopic image. It features several large, spherical structures with numerous protruding, rod-like appendages, resembling viruses or complex biological cells. These structures are set against a dark, almost black background, with some smaller, less distinct structures visible in the upper left and right corners. A semi-transparent white rectangular box is positioned in the center, containing the title text.

PESQUISAS EM TEMAS DE Ciências Biológicas

VOLUME 4

PESQUISAS EM TEMAS DE Ciências Biológicas

VOLUME 4

RFB Editora
Home Page: www.rfbeditora.com
Email: adm@rfbeditora.com
WhatsApp: 91 98885-7730
CNPJ: 39.242.488/0001-07
Av. Augusto Montenegro, 4120 - Parque Verde,
Belém - PA, 66635-110

