

células do tecido hematopoético (SHEN et al, 2005). O presente trabalho mostrou que os ratos submetidos a diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração apresentaram diminuição no número de leucócitos totais bem como alterações nos parâmetros referentes a série vermelha, tais como diminuição do VCM e HCM, caracterizando uma anemia microcítica hipocrômica. Os valores do hemograma corroboram as alterações observadas no mielograma destes animais, uma vez que foi constatada a redução significativa da relação M/E e, portanto, um possível efeito tóxico da *S. occidentalis* sobre a medula óssea durante o tratamento crônico de 90 dias. A redução significativa da relação M/E nos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais ocorreu devido ao aumento progressivo de eritroblastos jovens e policromáticos na medula óssea. Índices baixos da relação M/E podem estar associados a uma anemia regenerativa em função de hemólise extravascular ou, ainda, à eritropoiese ineficaz. A partir do mielograma foi observada a redução significativa de células blásticas e de todos os tipos celulares, especialmente, da linhagem granulocítica, com predomínio da linhagem linfocitária. No entanto, uma vez que os linfócitos estão, continuamente, recirculando, o seu aumento ou diminuição não reflete, necessariamente, alteração na linfopoiese.

A análise diagnóstica da medula óssea compreende, classicamente, a citologia. Mais recentemente, tornou-se rotina o estudo histológico. Desde o início do projeto, estes dados foram integrados, pois, enquanto a citologia fornece uma análise mais detalhada das características das células e permite a sua quantificação, a biópsia, analisar o tecido como um todo e permite o estudo da estrutura do tecido hematopoético. A análise anatomopatológica da medula óssea de animais dos grupos experimentais indicou a existência de um aumento progressivo da celularidade, caracterizando hiperplasia medular. Estes resultados se correlacionam aos dados do mielograma.

Na anemia regenerativa foi observada diminuição da sobrevivência das hemácias na circulação, resultante de hemólise extravascular realizada por macrófagos, especialmente, do tecido esplênico. Assim, o tratamento crônico com *S. occidentalis* poderia estar associado ao processo hemolítico, haja vista a observação de aumento de hemossiderina no baço de animais tratados com esta planta. O tratamento crônico com *S. occidentalis* também promoveu a redução significativa na celularidade do baço bem como alterações anatomopatológicas, incluindo espessamento de cápsula e rarefação celular.

Na avaliação dos estoques de ferro medular efetuada com a Reação de Perls foi constatada uma redução no score de ferro dos animais tratados com diferentes concentrações de *S. occidentalis* na ração quando comparados aos respectivos controles. A redução observada de grânulos de ferro na medula óssea poderia estar associada a um distúrbio de reutilização deste mineral. Estes dados confirmam os resultados obtidos na análise morfométrica do baço destes animais, haja vista a constatação de um aumento de depósito de ferro, na forma de pigmentos de hemossiderina, em amostras esplênicas dos ratos tratados com *S. occidentalis* na ração por 90 dias. **Conclusão:** A administração a longo prazo de sementes de *S. occidentalis* pode promover hematotoxicidade.

Palavras-chave: *Senna occidentalis*; hematotoxicidade; medula óssea; hiperplasia eritróide, ratos.

Referências

- 1 TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000.
- 2 BIN-HAFEEZ, B. et al. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 75, n. 1, p. 13-18, Apr. 2001.
- 3 SPILLER, H. A. et al. Skin breakdown and blisters from senna-containing laxatives in young children. **Ann. Pharmacother.**, v. 37, n. 5, p. 636-39, May 2003.
- 4 BEUERS U.; SPENGLER, U.; PAPE, G. R. Hepatitis after chronic abuse of senna. **Lancet**, London, v. 337, n. 8737, 372-373, Feb. 1991.
- 5 MARKS, G. B.; SALOME, C. M.; WOOLCOCK, A. J. Asthma and allergy associated with occupational exposure to ispaghula and senna products in a pharmaceutical work force. **Am. Rev. Respir. Dis.**, Baltimore, v. 144, n. 5, p. 1065-1069, Nov. 1991.

- 6 HELIN, T.; MAKINEN-KILJUNEN, S. Occupational asthma and rhino conjunctivitis caused by senna. **Allergy**, v. 51, n. 3, p. 181-184, Mar. 1996.
- 7 SEYBOLD, U. et al. Senna-induced hepatitis in a poor metabolizer. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 141, n. 8, p. 650-651, Oct. 2004.
- 8 VANDERPERREN, B. et al. Acute liver failure with renal impairment related to the abuse of senna anthraquinone glycosides. **Ann. Pharmacother.**, Cincinnati, v. 39, n. 7-8, p. 1353-57, July-Aug. 2005.
- 9 HARAGUCHI, M. et al. Muscle atrophy induced in broiler chicks by parts of *Senna occidentalis* seeds. **Vet. Res. Commun.**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 265-271, June 1998.
- 10 FURLAN, F. H. et al. Toxic myopathy and acute hepatic necrosis in cattle caused by ingestion of *Senna obtusifolia* (sicklepod; coffeesenna) in Brazil. **Toxicol.**, Oxford, v. 92, p. 24-30, Dec. 2014.
- 11 TASAKA, A. C. et al. Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. **Vet. Res. Commun.**, Amsterdam, v. 24, n. 8, p. 573-580, Dec. 2000.
- 12 SOYUNCU, S.; CETE, Y.; NOKAY, A. E. Portal vein thrombosis related to *Cassia angustifolia*. **Clin. Toxicol. (Phila)**, Philadelphia, v. 46, n. 8, p. 774-777, Sept. 2008.
- 13 BARBOSA-FERREIRA, M. et al. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 497-503, Apr. 2005.
- 14 SHEN, S. G. et al. The distribution patterns of trace elements in the blood and organs in a rabbit experimental model of copper pollution and study of haematology and biochemistry parameters. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 19, n. 2, p. 379-384, Feb. 2005.

PROJETO EM ANDAMENTO: AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ANTI E PRÓ-APOPTÓTICAS EM CULTURA DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS EXPOSTOS À COCAÍNA, AEME E ASSOCIAÇÃO: RESULTADOS PRELIMINARES

UDO, MARIANA SAYURI BERTO¹; SILVA, MARIANA AGUILERA ALENCAR¹; DURO, STEPHANIE OLIVEIRA¹; DAL'JOVEM, LEANDRO FERREIRA²; GARCIA, RAPHAEL CAIO TAMBORELI³; MARCOURAKIS, TANIA¹

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

² Programa de graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, Brasil.

³ Instituto de Ciências do Meio Ambiente, Química e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil.

Introdução: A cocaína é uma das substâncias com alto poder de adição utilizada, nos dias de hoje pela sociedade que pode causar desejo, busca e uso compulsivo e abusivo, mesmo diante de consequências negativas [1]. O número de usuários de cocaína na forma de crack vem crescendo e a escolha por essa forma decorre do baixo custo, facilidade de administração e da velocidade e intensidade com que os efeitos aparecem [2]. O uso dessa substância está associado ao prejuízo das habilidades de atenção, memória e funções executivas, dificuldades em tomadas de decisão, abstração e planejamento, possivelmente associadas ao alto índice de recaídas e baixa adesão ao tratamento por parte desses pacientes [3]. É sabido que o hipocampo é uma das principais estruturas envolvidas com os processos de memória e aprendizagem e que os diferentes tipos celulares dessa região são altamente vulneráveis à injúrias, dessa forma, morte celular nessa área cerebral pode comprometer essas habilidades cognitivas [4]. Os usuários de crack estão expostos não somente à cocaína volatilizada, mas também à AEME, principal produto de pirólise da cocaína, assim, Garcia et al. [5], examinando os neurônios hipocampais mostraram que tanto a cocaína, quanto o AEME e a associação de ambas são passíveis de reduzir a viabilidade celular a partir de 12h. Dessa forma, o presente trabalho investigou a via de ativação das mortes celulares nesse tipo de exposição.

Material e Métodos: Neurônios hipocampais, obtidos de fetos de ratos no 18º dia de gestação, foram cultivados (1,8 x 10⁶ célula/poço) por sete dias à 37°C e 5% de CO₂ em meio neurobasal acrescido de 50µM glutamina + 25µM glutamato + 1% de penicilina:estreptomicina (10.000U : 10.000µg/mL) + 2% de suplemento b27 (Gibco). No sétimo dia de cultivo, as células foram expostas à 2mM de cocaína (Coc), 1mM de AEME (A) ou à associação de ambas por 3 e 6h. Dez mM de glutamato (Glu) foram utilizados como controle

positivo de apoptose e as células controle negativo de morte (Ctrl) foram expostas somente ao meio neurobasal acrescido de penicilina:estrepomicina e glutamina. A expressão das proteínas pró-apoptóticas (caspase-8, -9, -3 e Bax) e anti-apoptótica (Bcl-2) foram avaliadas pelo método de Western blot após a separação de 40µg de proteínas totais, por SDS-PAGE. **Resultados e Discussão:** Os resultados preliminares indicaram que em 3h de exposição: Coc expressou mais pró-caspase-8 do que o Ctrl ($p<0,05$), A ($p<0,05$) e C+A ($p<0,01$), assim como o fragmento de 41Kda ($p<0,001$, $p<0,05$ e $p<0,05$, respectivamente) e maior do que o Ctrl no fragmento de 25Kda ($p<0,0001$). Não ativou caspase-9, não alterou a razão Bax/Bcl-2, mas ativou caspase-3, com maior expressão de pró-caspase e caspase clivada (17kda) do que Ctrl ($p<0,0001$ e $p<0,001$, respectivamente), A (ambas $p<0,0001$) e C+A (ambas $p<0,0001$). Sugerindo que a Coc pode ativar a apoptose mediada por caspase-8 nesse período de exposição. AEME apresentou maior expressão do fragmento de 25Kda do que o Ctrl ($p<0,01$), expressou mais o fragmento clivado de caspase-9 do que Coc ($p<0,05$), razão Bax/Bcl-2 normal e menor expressão de pró-caspase-3 do que Ctrl ($p<0,05$) e caspase clivada do que Coc ($p<0,05$), sugerindo que nesse tempo, ainda não há morte celular por apoptose por essa droga. C+A, assim como AEME, expressou mais do que o Ctrl o fragmento clivado de caspase-8 ($p<0,01$), mais do que a Coc o fragmento clivado de caspase-9 ($p<0,01$), com razão Bax/Bcl-2 normal porém, quanto à caspase-3, a associação expressou mais pró-caspase-3 do que o Ctrl ($p<0,001$) e AEME ($p<0,01$), mas menos do que Coc ($p<0,0001$), e expressou menos o fragmento clivado de 17Kda do que Coc ($p<0,0001$), mostrando que nesse tempo de exposição a associação se comporta semelhante à AEME diferenciando apenas pela expressão de pró-caspase-3. Em 6h de exposição; Coc não apresentou sinais de ativação das caspases-8 ou -9, mas apresentou maior clivagem de caspase-3 do que o Ctrl ($p<0,01$), com aumento da razão Bax/Bcl-2. Como a ativação de Bax antecede ativação de caspase-9, esperamos observar ativação dessa via em tempo maior de 6h de exposição. AEME expressou mais pró-caspase-8 do que Ctrl, sem alterações quanto caspase-9 ou caspase-3, mas com aumento da razão Bax/Bcl-2. C+A, apesar de expressar mais do que o controle o fragmento clivado de caspase-8, a associação das drogas não ativou caspase-9 e apresentou menor razão Bax/Bcl-2 do que as drogas isoladamente, com aumento de pró-caspase-3 e caspase-3 clivada, semelhantemente à Coc em 3h, ou seja, mediado por caspase-8. **Conclusão:** Devido ao reduzido número amostral, ainda é cedo para se caracterizar uma via de ativação da apoptose, mas foi constatado que a associação de drogas comporta-se de modo diferente em 3h e 6h. Cocaína parece ativar caspase-3, "ponto sem retorno" para a morte celular, a partir da via extrínseca da apoptose (mediada por caspase-8) em 3h de exposição e a AEME a partir de 6h. Outras proteínas e vias ainda devem ser investigadas para melhor caracterizar o processo de indução de morte celular decorrente da exposição dessas substâncias. **Apoio financeiro:** FAPESP, CNPq

Referências

- [1] DIECKMANN, L. H. J.; et al. Effects of biperiden on the treatment of cocaine/crack addiction: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 8, p. 1196-1202, 2014.
- [2] UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report*. United Nations publication, 2014. 127 p.
- [3] LANE, S. D.; et al. Diffusion tensor imaging and decision making in cocaine dependence. *PLoS ONE*, v. 5, n. 7, p. e11591, 2010.
- [4] XIE, X.; WELLS, A. M.; FUCHS, R. A. Cocaine Seeking and Taking: Role of Hippocampal Dopamine D1-like Receptors. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 17, n. 9, p. 1533-1538, 2014.
- [5] GARCIA, R. C. T.; et al. Neurotoxicity of Anhydroecgonine Methyl Ester, a Crack Cocaine Pyrolysis Product. *Toxicological Sciences*, v. 128, n.1, p.223-234, 2012.

PLASMÍDEOS E GENES DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS E CEFALOSPORINAS DE TERCEIRA GERAÇÃO EM AMOSTRAS CLÍNICAS E COMENSAIS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FRANGOS DE CORTE, POEDEIRAS E PERUS NO BRASIL

CUNHA, MARCOS PAULO V.1; FRANCO, LETICIA SOUZA1; CARVALHO, VANIA MARIA1, MORENO, ANDREA MICKE2; KNÖBL, TEREZINHA1.

1Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

2 Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Introdução e Objetivos: A pressão seletiva causada pelos antibióticos utilizados como promotores de crescimento ou terapêuticos em animais de produção é uma preocupação atual no mundo todo.^{1,2} Recentemente, vários trabalhos demonstraram que estirpes de bactérias patogênicas e/ou multirresistentes são selecionadas no contexto da produção animal.² Dentre os antibióticos aos quais as bactérias têm apresentando aumento nos níveis de resistências estão as quinolonas e cefalosporinas de terceira geração. Antibióticos pertencentes a essas classes são os mais utilizados na medicina humana e veterinária mundialmente. Normalmente os mecanismos de resistência a essas classes são mediados por plasmídeos e envolvem a produção de enzimas que hidrolisam os antibióticos, como as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), ou bombas de efluxo e proteção do alvo da molécula dos antimicrobianos, no caso da resistência quinolonas (PMQR).^{3,4} Elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons têm um papel crucial na disseminação e evolução de genes que codificam essas enzimas entre bactérias.⁵ Levando isso em conta, o objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de plasmídeos e genes de resistência em amostras comensais e patogênicas (*avian pathogenic E. coli* - APEC) de *Escherichia coli* isoladas de frangos, poedeiras e perus de criações comerciais utilizando técnicas moleculares.

Materiais e Métodos: 458 estirpes não duplicadas de *Escherichia coli* isoladas de perus (APEC=225, comensal=130) frangos de corte e poedeiras (APEC=33, comensal=70), em amostras colhidas, no período de 2009 a 2014, em granjas de criação, situadas nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, Brasil foram sementes em meio de cultura contendo ácido nalidixico (16 mg/L) e ceftiofur (8mg/L). As que apresentaram crescimento foram submetidas à técnica de PCR para a pesquisa de genes plasmidiais de resistência às quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *oqxAB*, *qepA* e *aac(6)'Ib-cr*), *ampC* plasmidiais (*blaCMY*, *blaDHA*, *blaFOX* e *blaACC*) e beta-lactamases de espectro estendido (*blaCTX-M*, *blaSHV* e *blaTEM*). Os produtos foram sequenciados para determinação das variantes. Amostras positivas para qualquer um dos genes tiveram seus plasmídeos classificados pela técnica de PBRT (PCR-based on Replicon Typing) incluindo 22 grupos de incompatibilidade plasmidial (A/C, B/O, F, FII, FIA, FIB, FIC, I1, K, HI1, HI2, L/M, N, P, R, T, U, X, Y, W, CoE, CoLETP) e o ambiente genético foi determinado com a pesquisa de sequências de inserção e transposons (IS26, ISEcp1, Tn3 e ISCR1) e da técnica de primer walking. A conjugação de plasmídeos foi realizada com a estirpe *E. coli* C600 (ATCC 23724) como receptora. A extração e purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit comercial (Wizard Plus SV, Promega, USA). Plasmídeos Cole-like foram completamente sequenciados com técnicas de primers divergentes e primer walking. As análises, alinhamento e anotação dos plasmídeos foi realizada com os softwares ClustalX2 v2.1 (<http://www.clustal.org/clustal2/>), BioEdit v7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e Artemis (Sanger Institute, UK).