

*20th Tropical Medicine
Research Center Meeting*

**ADVANCED TOPICS IN
BIOMEDICINE**

May, 13-14th, 2016

Fortaleza - Ceara - Brasil

Hotel Sonata de Iracema

www.ibisab.ufc.br/tmrc2016

Realização:



**Universidade
Federal do
Ceará**



Apoio:



XX Reunião Anual do Centro de Medicina Tropical

13-14 Maio 2016, Hotel Sonata de Iracema
Av. Beira Mar, Praia de Iracema, Fortaleza, CE

A. Identificação do evento:

A reunião anual do **Centro de Medicina Tropical** é um evento anual científico regular, com início no ano de 1996 e que neste ano de 2016 completará sua vigésima edição. O evento foi criado no sentido de congregar pesquisadores, técnicos e estudantes ao nível nacional e internacional interessados no desenvolvimento científico e tecnológico da pesquisa em doenças tropicais que afligem as populações na região no semiárido brasileiro. Inicialmente o evento foi realizado com a participação efetiva de três grupos de pesquisadores nacionais e três grupos de pesquisadores internacionais. Os grupos de pesquisadores nacionais foram liderados pelos professores Edgar M. Carvalho, Universidade Federal da Bahia, Selma Jerônimo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, e Aldo AM Lima, Universidade Federal do Ceará. Os grupos internacionais foram liderados pelos pesquisadores, Warren Johnson, Cornell University, NY, Richard L. Guerrant, University of Virginia, CHO, VA e Lee W. Liley, University of California, Berkeley, CA. O evento anual tem abordado tópicos de pesquisas em andamento e de perspectivas em diversas áreas da medicina tropical como leishmaniose, leptospirose, doenças diarreicas, enteropatia tropical e desnutrição, HTLV, HIV, Lepra, tuberculose dentre outras. A programação preliminar do próximo evento será realizada em Fortaleza, CE, 13-14 Março de 2016. O evento é aberto ao público de pesquisadores, professores, alunos de graduação e pós-graduações, bem como pessoal técnico. Anualmente o evento recebe de 30-60 pessoas participantes dentre os pesquisadores nacionais, internacionais, alunos e técnicos. O evento tem contribuído para o desenvolvimento da pesquisa em medicina tropical ao nível nacional e internacional, manutenção de uma rede de pesquisa ao nível nacional e internacional de pesquisa nos tópicos mencionados. Citamos ainda a participação efetiva e nos últimos seis anos de dois INCTs (Biomedicina e Imunologia das Doenças Tropicais). A colaboração nacional e internacional, como o intercâmbio de estudantes de pós-graduações e técnico, tem sido significativo e criado modelos de longa duração para este tipo de atividade científica e tecnológica. Citamos a efetiva colaboração de longo prazo entre os grupos nacionais e internacionais citados anteriormente. Desta colaboração e interação foram beneficiados e criados novos cursos de pós-graduações nacional e internacional.

Palavras chaves: Medicina tropical, doenças diarreicas, enteropatia tropical, desnutrição, leishmaniose, tuberculose, lepra.

B. Breve histórico de edições anteriores:

Nos últimos quarenta anos, inicialmente dois grupos de pesquisas nacionais, liderados pelos professores Edgar M. Carvalho e Aldo AM Lima, se desenvolveram em linhas de pesquisas ligada a medicina tropical, leishimaniose e doenças diarreicas & desnutrição, na Universidade Federal da Bahia e Universidade Federal do Ceará, respectivamente. Posteriormente, um terceiro grupo liderado pela professora Selma Jerônimo da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, também eclodiu na linha de pesquisa em leishimaniose. Desde o início estes três grupos de pesquisa mantinham uma forte colaboração internacional com os grupos internacionais liderados pelos pesquisadores, Warren Johnson, Cornell University, NY, Richard L. Guerrant, University of Virginia, CHO, VA e Lee W. Liley, University of California, Berkeley, CA. O desenvolvimento e o progresso destas linhas de pesquisas foram impactados com a agregação de novos pesquisadores e o financiamento competitivo nacional e internacional destes grupos por agentes financiadores de pesquisas nacionais, CNPq e CAPES, e internacional como o National Institute of Health (NIH), Bethesda, MD. O ambiente comum de pesquisas ligadas a medicina tropical em uma região de prioridade nacional como a região no semiárido brasileiro, bem como a rede criada de financiamento destes grupos levaram a formatação deste evento denominado de **Reunião Anual do Centro de Medicina Tropical**. A primeira reunião anual do Centro de Medicina Tropical ocorreu em meados de março de 1996. A **Figura 1** ilustra somente os pesquisadores participantes da **II Reunião Anual do Centro de Medicina Tropical em Salvador, BA**, em março-1997. Notar os pesquisadores Lee W. Liley (1o. da esquerda para direita), Aldo AM Lima (3º), Edgar M Carvalho (6º na primeira linha), Selma Jerônimo (8º na primeira linha), Manassés Fonteles (10º na primeira linha), Richard Pearson, UVa, CHO, VA (1º na segunda linha), e Warren Johnson (2º na segunda linha).

Figura 1 - Foto dos pesquisadores participantes da II reunião anual do **Centro de Medicina Tropical** em Salvador, BA, em março de 1997. Notar os pesquisadores Lee W. Liley (1o. da esquerda para direita), Aldo AM Lima (3º), Edgar M Carvalho (6º na primeira linha), Selma Jerônimo (8º na primeira linha), Richard Pearson, UVa, CHO, VA (1º na segunda linha), e Warren Johnson (2º na segunda linha).



Neste ano de 2016, o evento completará sua **XX reunião anual e regular do Centro de Medicina Tropical**. A longevidade deste evento é baseada principalmente na interação e colaboração nacional e internacional de pesquisadores ligados às linhas de pesquisas em medicina tropical. Esta interação e colaboração tem resultado profícuo na produção científica e tecnológica, patentes, formação de recursos humanos ao nível de pós-graduações, *postdoctoral*, pós-doutorado, e técnico em pesquisa. Estes dados podem ser evidenciados através dos CVs Lattes dos pesquisadores líderes e colaboradores. Dois convênios internacionais de pesquisas entre as instituições UFBA & University of Cornell e a UFCE, UFRGN & University of Virginia foram desenvolvidos ao longo deste período e hoje constituem modelos de cooperação científico e tecnológico internacionais para várias outras instituições. Os pesquisadores líderes hoje são reconhecidos nacional e internacional em sociedades como a

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e a American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Esta interação permitiu o desenvolvimento de várias patentes, prêmios, medalhas e honras internacionais dos pesquisadores participantes destes eventos. Os resultados destas pesquisas tem sido impactantes no mundo e no desenvolvimento de novas profilaxias e tratamento dessas doenças tropicais citadas na programação deste evento da **XX reunião anual e regular do Centro de Medicina Tropical**. Decorrentes do fomento destas reuniões anuais e regulares foram possíveis o desenvolvimento de dois INCTs, Biomedicina e Imunologia das Doenças Tropicais, e duas redes de pesquisas, **RECODISA** e **MAL-ED**, ao nível nacional e internacional. A lista de participantes destes eventos e hoje formados através dos programas nacionais e internacionais de pós-graduações conforme evidenciados nos CVs Lattes dos líderes, demonstra a capacidade formadora de recursos humanos que tiveram direta ou indiretamente o fomento destas reuniões anuais e regulares do **Centro de Medicina Tropical**. A qualidade desta formação pode ser avaliada através da maioria, >80% dos egressos, são hoje professores e/ou pesquisadores de instituições nacionais e/ou internacionais. Importante citar que através destas colaborações internacionais foi possível a inserção internacional dos programas de pós-graduações inseridos neste evento.

C. Programação:

XX Tropical Medicine Research Center Meeting

Hotel Sonata de Iracema em Fortaleza, CE, Brasil

13 - 14 de Maio de 2016

Sexta-Feira - 13 de Maio de 2016

8:30-8:45	Abertura do Evento Reitor da UFC - Prof. Henry de Holanda Campos
8:45-9:00	Opening remarks Aldo AM Lima – Breve histórico do TMRC

1^a Seção: ***Doenças tropicais re-emergentes: epidemias e endemias por arbovírus e Leishmania spp***
Edgar M Carvalho & Selma MB Jerônimo
UFBA & Fiocruz, BA e UFRN, RN

9:00-9:20	Eficácia da vacina tetravalente contra dengue da Sanofi Pasteur Luís C Rey – Universidade Federal do Ceará
9:20-9:40	Epidemiologia da Infecção pelo vírus da zika Anastácio Q Sousa - Universidade Federal do Ceará
9:40-10:00	The new face of visceral leishmaniasis in urban settings in Rio Grande do Norte and pathways involved in disease development Selma MB Jerônimo – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
10:00-10:20	Imunopatogênese da Leishmaniose disseminada Edgar M Carvalho Filho – UFBA & Fiocruz, BA

10:20-10:50 - Coffee Break

2^a Seção: ***Patógenos entéricos e enteropatia de importância nos trópicos***
Reinaldo B Oriá & Gerly Anne C Brito
Universidade Federal do Ceará

10:50- 11:10	Marcadores de virulência do <i>H. pylori</i> em Fortaleza, Ceará, Brasil Lúcia LB Braga - Universidade Federal do Ceará
11:10-11:30	<i>Clostridium difficile</i>: incidência da infecção e caracterização das cepas isoladas dos pacientes com diarreia nosocomial em Hospital Haroldo Juaçaba Gerly AC Brito - Universidade Federal do Ceará
11:30-11:50	Separação materna prolongada induz a desnutrição e alteração no desenvolvimento hipocampal Reinaldo B Oriá - Universidade Federal do Ceará

12:00-13:30 – Lunch

3^a Seção: **Patobiologia e biomarcadores aplicados à medicina tropical**
Aldo AM Lima & Manassés C Fonteles
Universidade Federal do Ceará

2:00-2:20	Os trinta e três anos das guanilinas Manassés C. Fonteles
------------------	---

2:20-2:40	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa e coinfeções entéricas: fatores determinantes, patobiologia e impacto nutricional em crianças do estudo multicêntrico coorte Mal-Ed Aldo AM Lima - Universidade Federal do Ceará
2:40-2:55	Correlação dos biomarcadores mieloperoxidase, calprotectina e lipocalina-2 na inflamação gastrointestinal em crianças desnutridas em Fortaleza, Ceará Mara de Moura Gondim Prata - Universidade Federal do Ceará
2:55-3:10	Prevalência de <i>norovírus</i> em crianças de um estudo caso-controle de diarreia no semiárido brasileiro Rafhaella Della Guardia Gondim - Universidade Federal do Ceará
3:10-3:25	<i>Rotavírus</i>: um estudo caso-controle de diarreia em crianças no semiárido brasileiro Rafaela Chemello Pankov - Universidade Federal do Ceará
3:25-3:40	Prevalência e identificação dos fatores de virulência da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica no semiárido brasileiro Ana Karolina Santos - Universidade Federal do Ceará

3:40-4:00 - Coffee Break

4ª Seção: Patobiologia e biomarcadores aplicados à medicina tropical

Alexandre Havt

Universidade Federal do Ceará

4:00-4:20	Patógenos entéricos em um estudo caso-controle de desnutrição infantil em Fortaleza, Ceará: análise quantitativa utilizando a plataforma tecnológica de <i>tac array</i> Alexandre Havt - Universidade Federal do Ceará
4:20-4:35	Diagnóstico e perfil de genes de virulência de <i>Campylobacter jejuni</i> em crianças com diarreia moderada a severa em Fortaleza, Ceará, Brasil Herlice do Nascimento Veras - Universidade Federal do Ceará
4:35-4:50	Caracterização molecular da virulência e resistência antimicrobiana de <i>Shigella</i> spp em Fortaleza, Ceará, Brasil Pedro Henrique Quintela - Universidade Federal do Ceará
4:50-5:05	Infecção por cepas de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica na migração de células intestinais Paloma Araújo Cavalcante - Universidade Federal do Ceará

Foto oficial do XX TMRC – Fortaleza, CE, Brasil.

Sábado 14 de Maio de 2016

5a. Seção: Motilidade gastrointestinal e doença do refluxo gastroesofágico
Miguel Ângelo Nobre e Souza and Dr. Márcia Magalhães Netto
Universidade Federal do Ceará

8:30- 8:50	Anatomo-functional changes in crural diaphragm in gastro-esophageal reflux disease Miguel AN Souza - Universidade Federal do Ceará
8:50-9:05	Effect of acid exposure of hypopharynx in patients with posterior laryngitis Tanila Aguiar Coutinho - Universidade Federal do Ceará
9:05-9:20	Effects of acute exercise on gastric emptying of liquids and solids meals in awake rats Rômmulo Celly Lima Siqueira - Universidade Federal do Ceará
9:20-9:35	Acidosis attenuates gastric contractile response on rat stomach fundus by decrease in calcium permeability Daniel Maia Nogueira de Oliveira - Universidade Federal do Ceará
9:35-9:50	Motor repercussions in isolated esophagus exposed to solution that mimics the gastric juice in gastroesophageal reflux in rats Kalinne Kelly Lima Gadelha - Universidade Federal do Ceará

Coffee break: 9:50-10:10am

6a. Seção: Motilidade gastrointestinal e doença do refluxo gastroesofágico
Pedro Jorge Caldas Magalhães and Dr. Ana Paula Macedo Santana
Universidade Federal do Ceará

10:10-10:25	TRPV1 receptors modulate acid induced esophageal inflammation in surgical murine model of gastro-esophageal reflux disease Renan Oliveira - Universidade Federal do Ceará
10:25-10:40	Is it possible to treat GERD with natural products? Insights with a biopolymer Lucas Antônio Duarte Nicolau - Universidade Federal do Ceará
10:40-10:55	Effects of inspiratory muscular training in patients with gastro-esophageal reflux disease Juliete Vaz Ferreira - Universidade Federal do Ceará
10:55 -11:10	Minimal alterations in cardiovascular function in patients with Chagas Disease Danielle Melo de Leopoldino - Universidade Federal do Ceará
11:10-11:25	Modulatory effects of compounds [6]- and [10]-gingerol on acute renal failure Induced by polymicrobial sepsis Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues - Universidade Federal do Ceará
11:25-11:40	Acute Nephrotoxicity Induced by Cisplatin in C57BL/6 Mice Tamara Silva Rodrigues - Universidade Federal do Ceará
11:40	Adjour

SESSÕES

Sexta-Feira

13 de Maio de 2016

Eficácia da Vacina contra dengue CYD-TDV de Sanofi Pasteur
Autor: Luís Carlos Rey

Professor Adjunto do Departamento de Saúde Materno-Infantil – FAMED - UFC
Pesquisador convidado, IBIMED- UPC – UFC

Introdução: Globalmente, dengue é a doença viral transmitida por mosquito de maior expansão. Ela é causada por 4 vírus relacionados DENV 1-4. Nos últimos 60 anos, os casos de dengue clínico notificados à Organização Mundial da Saúde aumentaram 30 vezes, em número de países e áreas urbanas e rurais. Os objetivos da Estratégia Global de Prevenção e Controle da Dengue da OMS (2012-2020) são a redução da letalidade e morbidade em 50% e 25% respectivamente. Desde os anos 50 do século passado tem sido buscada uma vacina eficaz contra a infecção, porém sem sucesso, uma vez que a vacina deve comportar os 4 sorotipos virais, ocorrendo interferências em todas as vacinas naturalmente atenuadas até o momento.

Métodos: Foi desenvolvida uma vacina de segunda geração através da substituição genômica das proteínas E e prM da vacina de febre amarela 17D, por genes das proteínas E e prM de cada um dos vírus da dengue, criando quatro híbridos FA/DENV-1, FA/DENV-2 etc e formando uma vacina quimérica (CYD) tetravalente contra dengue (TDV). Os estudos de fase 1 mostraram boa imunogenicidade e baixa reatogenicidade em voluntários soronegativos para flavivirus; posteriormente foram delineados estudos de eficácia vacinal de fase 2 e 3 em dez países, com voluntários entre 2 e 15 anos na Ásia, e entre 9 e 16 anos nas Américas e seguimento de 2 anos.

Resultados: Os estudos na Ásia mostraram baixa eficácia vacinal (56,5%), sobretudo em menores de 9 anos e contra o sorotipo DENV-2 (35%); nas Américas a proteção alcançou 64,7% contra dengue clínico, 80,3% para hospitalização por dengue e 95,5% contra dengue grave. México, Filipinas, El Salvador, Paraguai e Brasil concederam registro à CYD-TDV. As Filipinas iniciarão a primeira campanha de vacinação pública contra dengue, com 1 milhão de doses em escolares entre 9 e 14 anos.

Conclusão: A vacina CYD-TDV mostrou ser eficaz a partir de 9 anos contra formas graves e hospitalização por dengue.

9:20- 9:40	Epidemiologia da Infecção pelo vírus da zika Anastácio Q Sousa - Universidade Federal do Ceará
------------	---

The new face of visceral leishmaniasis in urban settings in Rio Grande do Norte and pathways involved in disease development

Iraci Lima^{1,2}, Paulo R. Nascimento², ¹Adila Lorena Moraes, ²Raulizito Fernandes, ^{2,3}Joao Paulo Matos, Gloria R. Monteiro^{1,2}, Joao Rodrigues-Neto^{2,3}, Joanna Valverde², Daniella Martins^{2,4}, Carol Mendes², Leonardo Capistrano^{2,3}, Francisco Freire-Neto^{2,3}, Claudio Santiago^{2,3}, Ingryd Camara^{2,3}, Jose Wilton Queiroz², Jenefer Blackwell⁵, Richard D. Pearson⁶, Mary E. Wilson⁷ and Selma M.B. Jeronimo^{2,4}

¹Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Norte, ²Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte, ³Department of Biochemistry, ⁴Department of Biology and Genetics, , Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil; ⁵Cambridge University, United Kingdom and Telethon Kids Institute, Australia; ⁶Department of Medicine, University of Iowa, Charlottesville, VA, and ⁷Department of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA.

Visceral leishmaniasis (VL) has become a disease of urban and periurban areas in Brazil over the past 20 years. VL was primarily found along the eastern coast of the State of Rio Grande do Norte, spreading thereafter to other regions. VL is more common in males ($p=0.05$, $\beta=0.003$ per year and $R^2=0.398$). Simultaneously, the incidence of VL has significantly decreased in children in age groups 0 to 4 years ($p<0.000$; $\beta=-0.0117$; $R^2=0.6564$) and 5 to 9 years ($p<0.0001$; $\beta=-0.0042$; $R^2=0.4740$). At the same time there has been an increase in VL in adults belonging to age groups 20-39 ($p<0.0071$; $\beta=0.0071$, $R^2=0.5636$) and over 40 years ($p<0.0001$; $\beta=0.0105$, $R^2=0.8309$). These findings were associated with improved nutritional status in children under 5 years, and vaccination with BCG ($p<0.0001$), polio vaccine ($p=0.0036$) and measles vaccine ($p=0.0276$). Similar to prior reports by our group and others, the majority of people infected with *L. infantum* had immunologic evidence of infection without a history of clinical symptoms, indicating they had controlled the infection.

Domestic dogs are a reservoir for *L. infantum* infection in northeast Brazil. Dogs also provide a means of studying immune responses to the parasite in a non-human naturally infected host. Based on the hypothesis that an understanding of protective immune responses to leishmaniasis will be revealed by contrasting differences between individuals with symptomatic compared to asymptomatic Leishmania infections. Therefore we studied transcriptional profiles of blood cells and spleens of dogs with VL versus dogs with no evidence of infection. There was a marked difference between transcriptional responses of symptomatic versus asymptomatic dogs, with higher expression of transcripts indicating NK cell activation, toll-like receptor and NOD-like receptor pathways in the spleen of symptomatic dogs compared to asymptomatic. In contrast, transcripts belonging to GPI-anchor synthesis and immunoproteasome activity were down-regulated in the spleens of dogs with symptomatic disease, and upregulated in animals with asymptomatic infection. Our observations underscore a change the

demographic of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, and document differences in inflammatory gene expression in local dogs with symptomatic versus asymptomatic infection.

Support: National Institutes of Health (AI-30639) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Immunopathogenesis of Disseminated Leishmaniasis

Edgar M. Carvalho^{1,2}, Olívia Bacellar¹, Pedro Paulo Carneiro¹, Walker Nonato¹, Luiz Henrique Guimarães¹, Paulo Machado¹

¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

²Centro de Pesquisa Gongalo Moniz, Fiocruz-Bahia

Disseminated leishmaniasis (DL) is characterized by the presence of more than 10 papular, acneiformes and ulcerated lesions spanning for two different parts of the body. Usually patients present between 10 to 100 lesions, but are not uncommon cases with up to 1000 lesions. The primary lesion is a classical CL ulcer. Then patients suddenly present a large number of lesions associated to fever, chills and malaise. DL is relevant because of the 20 fold increasing in the number of cases in the last 30 years, the presence of great number of lesions, occurrence of mucosal disease in up to 40% of the patients, and high rate of failure to antimony (Sb⁵) therapy.

L. braziliensis is polymorphic and there is an association between genotypic characteristics and clinical forms of the disease. The possibility that DL is associated with an impairment in the immune response is attractive, but immunopathologic analysis in tissue from CL and DL did not show difference. In vitro lymphocyte from DL patients produce significantly less IFN- γ and TNF than cells from CL. However this is due to the migration of leishmania reaction cells to the multiple DL lesions. Alternatively, there are multiple evidences that an exaggerated inflammatory response is observed in DL. Isolates of *L. braziliensis* from DL patients induce a greater respiratory burst and higher levels of chemokines than isolates from CL patients. Macrophages from DL produce higher levels of TNF and chemokine than cells from CL. The histopathology of DL lesions shows lymphocyte and macrophage infiltration with granuloma formation. These data indicate that disseminated leishmaniasis is due to an exaggerated inflammatory response leading to metastasis of *L. braziliensis* infected cells.

10:50- 11:10	Marcadores de virulência do <i>H. pylori</i> em Fortaleza, Ceará, Brasil Lúcia LB Braga - Universidade Federal do Ceará
--------------	--

11:10-11:30	<i>Clostridium difficile</i> : incidência da infecção e caracterização das cepas isoladas dos pacientes com diarreia nosocomial em Hospital Haroldo Juaçaba Gerly AC Brito - Universidade Federal do Ceará
-------------	---

***Clostridium difficile*: incidência da infecção e caracterização das cepas isoladas dos pacientes com diarreia nosocomial em Hospital Haroldo Juaçaba**

Cecília Leite Costa¹; Carlos Quesada-Gomez², Cibele Barreto M. de Carvalho¹, Gerly AC Brito¹ – 1- Universidade Federal do Ceará, 2- Universidade da Costa Rica

Clostridium difficile é um bacilo Gram positivo, anaeróbio estrito, formador de esporos e produtor de toxinas. Atualmente, representa a principal causa de diarreia hospitalar associada ao uso de antibióticos. Pacientes oncológicos são um dos principais grupos de risco para infecção por *C. difficile* (CDI), visto que o uso de agentes quimioterápicos pode alterar a mucosa intestinal. Além disso, estes pacientes normalmente são imunodeprimidos e frequentemente utilizam antibióticos de largo espectro. Este estudo visou determinar a incidência e caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes oncológicos internados do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará. Durante o período de 18 meses (maio/2013 a novembro/2014) foram coletadas 48 amostras de fezes diarreicas. Toxinas A e/ou B (TcdA e TcdB) foram detectadas a partir das fezes por meio de um kit de detecção comercial ELISA. Em seguida, as amostras foram cultivadas em Agar Cicloserina, Cefoxitina, Frutose (CCFA) e incubadas em anaerobiose. As cepas isoladas foram processadas e realizadas identificação fenotípica e análise de detecção dos genes das toxinas e do fragmento do gene *tpi* (identificação definitiva) por PCR convencional. A sensibilidade das cepas isoladas a 12 antimicrobianos foi determinada por meio de *E-test*. Também foi realizado a genotipagem das cepas por meio da análise molecular PFGE e a ribotipagem por PCR. Análise de virulência foi realizada utilizando o modelo de alça ileal em camundongos. 48% (23/48) das amostras foram positivas para presença das toxinas A/B por ELISA e/ou cultura do *C. difficile*. Dessas amostras, foram isolados *C. difficile* em quatro (17,4% - 4/23). Em todos os isolados foram detectados os genes *tpi*, *tcdA* e *tcdB*. O domínio de ligação da toxina binária (*cdtB*) foi detectado em uma das cepas (ICC-45), porém não foram observadas deleções no gene *tcdC* nos isolados. Três cepas apresentaram o mesmo genótipo e ribotipo, NAP4 e 014/020, respectivamente. Uma cepa apresentou um genótipo e ribotipo desconhecido pertencente a classe ST41, MLST Clade 2 e toxinotipo IXb. A cepa ICC-45 foi sensível a fluoroquinolona e não apresentou superprodução de *tcdA* e *tcdB*. No entanto, o sobrenadante da cepa ICC-45 causou dano na mucosa, efeitos inflamatórios e oxidativos similares ao induzido por NAP1 quando injetados em alça ileal de camundongos. Este trabalho descreveu uma elevada incidência de CDI em pacientes oncológicos do Estado do Ceará, e evidenciou pela primeira vez no Brasil a presença de uma cepa de *C. difficile* com características de hipervirulência semelhante a NAP1. Esses dados ressaltam a importância da investigação dessa bactéria

para a compreensão da situação epidemiológica dessa infecção e de sua dispersão entre unidades hospitalares brasileiras.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*. CDI. Diarréia. Pacientes oncológicos.

11:30-11:50	Separação materna prolongada induz a desnutrição e alteração no desenvolvimento hipocampal Reinaldo B Oriá - Universidade Federal do Ceará
-------------	---

Prolonged maternal separation induces undernutrition and systemic inflammation with disrupted hippocampal development in mice

Ítalo Leite Figueiredo D.V.M., Ph.D; Ramon da Silva Raposo D.V.M., Ph.D; Geanne M. de Andrade Ph.D.; Nuno Sousa M.D., Ph.D.; Reinaldo B. Oriá D.V.M., Ph.D.

**Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil
Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Campus Gualtar, Braga, Portugal ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimaraes, Portugal
Experimental Biology Core, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil**

ABSTRACT

Objective: Prolonged maternal separation (PMS) in the first 2 wk of life has been associated with poor growth with lasting effects in brain structure and function. This study aimed to investigate whether PMS-induced undernutrition could cause systemic inflammation and changes in nutrition-related hormonal levels, affecting hippocampal structure and neurotransmission in C57BL/6J suckling mice. Methods: This study assessed mouse growth parameters coupled with insulin-like growth factor-1 (IGF-1) serum levels. In addition, leptin, adiponectin, and corticosterone serum levels were measured following PMS. Hippocampal stereology and the amino acid levels were also assessed. Furthermore, we measured myelin basic protein and synaptophysin (SYN) expression in the overall brain tissue and hippocampal SYN immunolabeling. For behavioral tests, we analyzed the ontogeny of selected neonatal reflexes. PMS was induced by separating half the pups in each litter from their lactating dams for defined periods each day (4 h on day 1, 8 h on day 2, and 12 h thereafter). A total of 67 suckling pups were used in this study. Results: PMS induced significant slowdown in weight gain and growth impairment. Significant reductions in serum leptin and IGF-1 levels were found following PMS. Total CA3 area and volume were reduced, specifically affecting the pyramidal layer in PMS mice. CA1 pyramidal layer area was also reduced. Overall hippocampal SYN immunolabeling was lower, especially in CA3 field and dentate gyrus. Furthermore, PMS reduced hippocampal aspartate, glutamate, and gammaaminobutyric acid levels, as compared with unseparated controls. Conclusion: These findings suggest that PMS causes significant growth deficits and alterations in hippocampal morphology and neurotransmission

Os trinta e três anos das guanilinas**Manassés C. Fonteles e Aldo A. M. Lima****Universidade Estadual do Ceará e Universidade Federal do Ceará**

Em 1980 enquanto trabalhava com o fisiologista americano Prof. Julius Cohen, em metabolismo renal, tive a ideia de que o intestino do ponto de vista do transporte de solutos, substratos e íons, nada mais era que um grande nefron, apresentando semelhanças grandes para a absorção destas substâncias. No final de 1979 acabávamos de assistir a uma reunião na Universidade de Oxford, cujo título era: *The most neglected disease of mankind*. Incluíram-se no programa as doenças diarreicas, que matavam tantas crianças no Ceará, antes de atingirem cinco anos de vida. No laboratório pesquisávamos a utilização de ácidos graxos pelos rins, como uma forma de fornecer ATP para garantir energia para o transporte de sódio, a principal e mais importante de suas funções. Presentes à reunião estavam grandes clínicos e fisiologistas como os Drs. Richard Guerrant, Ferid Murad (Prêmio Nobel) e o presidente da Fundação Rockefeller (Dr. Ken Warren). Outros pesquisadores da Inglaterra, de Nova York, de Boston e Atlanta estiveram presentes. Nos cenários diversos foram apresentadas doenças que ninguém queria financiar, na busca por novos remédios, porque são patologias de países em desenvolvimento. Voltei impressionado com a avalanche de novas ideias que dali surgiu. Ao retornar à Nova York vinha convencido que deveria fazer alguma coisa por esta causa. Indaguei do Prof. Julius Cohen se podia investigar a toxina da cólera na próxima preparação de rim isolado, ao que ele negou peremptoriamente, por se tratar de uma toxina extremamente perigosa. Concluí o trabalho pós-doutoral e retornei ao Brasil, fiz concurso para Professor Titular e publiquei o trabalho de tese no *Am. J. Physiol.* Mas na agenda de pesquisas continuei com a ideia de pesquisar as toxinas no rim, quando recebo um jovem, Aldo AM Lima, docente de Farmacologia como aluno de pós-graduação, recém-egresso da residência de Doenças Infecciosas. Após alguns encontros definimos que a sua dissertação constaria dos estudos renais das toxinas da cólera e da toxina termoestável (STa) da *Escherichia coli*. A primeira estava disponível no Laboratório e poderia ser obtida facilmente nos Estados Unidos; já a segunda não estava disponível no mercado Internacional e teve que ser isolada de fezes diarreicas de crianças de Pacatuba e de lá foi extraída das bactérias cultivadas *in vitro*. Passamos quase um ano em trabalho árduo, já que tínhamos que montar todo o sistema de coração-pulmão artificial para estudo das funções renais *in vitro*. Os primeiros testes revelaram que mesmo com as toxinas em forma impura, a toxina STa da *E. coli* promovia profunda natriurese, caliurese e diurese. Esta bactéria está também envolvida na diarreia dos viajantes. Estes resultados foram apresentados no XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia de 17-20 de setembro de 1983, S. Lourenço, Minas Gerais, e um Resumo publicado em seus Anais.

Após várias tentativas de isolamento do ligante endógeno publicamos no Congresso Mundial de Cólera e Doenças Relacionadas (1991) uma súmula extensa em que reafirmamos a ideia de um ligante endógeno para o seu receptor depois identificado como guanilato ciclase C(GC-C). De fato, isso viria a ocorrer em 1992, quando Mark Currie e col isolaram do intestino de ratos a Guanilina, que tinha uma estrutura semelhante a da toxina STa da *E. coli*. Um pouco antes, o grupo do Prof. Forte em Columbia Missouri, demonstrou a existência de receptores nos rins de ratos e gambás. Daí para frente, o grupo tem tido reconhecimento através de várias contribuições para o estudo do metabolismo do sal e do sistema de transdução de sinais moleculares envolvidos nos efeitos desses hormônios. Em 1996, publicamos os primeiros resultados com a forma clonada da lisil-guanilina que apresentou resultados semelhantes aos da toxina STa no rim perfundido. Em 1998, publicamos extensivo estudo da guanilina e da uroguanilina(URG) no *Am. J. Physiology*. Em 2006, desvendamos seus efeitos no canal de potássio (maxi K) e os publicamos no *Can. J. Physiol and Pharmacol*. Recente, temos tido uma série de trabalhos que nos levaram a caracterização em 2012, dos seus efeitos no transportador de Na e H(NHE3) e efeitos na Hidrogênio ATPase, ligando pela primeira vez as guanilinas com equilíbrio ácido básico. Ademais, identificamos os efeitos destes compostos em corpora cavernosa humano e animal produzindo relaxamento destes tecidos e induzindo ereção peniana e, portanto induzindo um efeito semelhante ao viagra, embora por outros mecanismos; a URG produz ainda apoptose em células neoplásicas em cultura que geralmente está bloqueada no câncer. A substância parece estar envolvida em novos efeitos no cérebro aonde é capaz de induzir saciedade podendo vir a ser útil no tratamento da obesidade.

***Escherichia coli* enteroagregativa e coinfeções entéricas: fatores determinantes, patobiologia e impacto nutricional em crianças do estudo multicêntrico coorte Mal-Ed**

Aldo AM Lima¹, Alberto M Soares¹, José Q Filho¹, Alexandre Havt¹, Ila F Lima¹, Noélia L Lima¹, Pedro H Quintela¹, Rosa MS Mota¹, Richard L Guerrant² e rede MAL-ED.

¹Universidade Federal do Ceará, ²University of Virginia, CHO, VA e rede MAL-ED

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é comum em crianças nos países em desenvolvimento. Foram avaliadas infecções subclínicas por EAEC nas fezes mensais testados em 1226 crianças assintomáticas, com mais de 90% (duas vezes por semana) no acompanhamento para os primeiros dois anos de vida em oito locais da rede *Malnutrition & Enteric Diseases* (MAL-ED) na Ásia, África e América Latina. Quando as crianças com infecções por EAEC foram comparados com aquelas sem agentes patogênicos, outros agentes patogênicos, ou com EAEC mais 1, 2 ou 3 outros agentes patogênicos, aquelas com EAEC e qualquer outro patógeno tinham saneamento inadequados comparados com os que não tinham patógenos em qualquer um dos três períodos analisados (0-6 0-12; ou 0-24 meses). A falta de saneamento, percentual das mães com <6 anos de educação, avaliação socioeconômica inferior ou por cento com renda <US\$150/mês foram associados com EAEC e coinfeções em comparação com os outros grupos, incluindo aquelas com patógenos e sem EAEC. O maior uso de antibióticos e o baixo percentual no aleitamento materno também foram associados com EAEC e coinfeções. O biomarcador mieloperoxidase estava aumentado no grupo com EAEC e coinfeções comparado com todos os outros grupos, incluindo o grupo com patógenos sem a presença de EAEC. Alfa-glicoproteína e neopterina estavam reduzidos no grupo com EAEC e coinfeções em comparação com todos os outros grupos. O grupo com EAEC e coinfeções também mostrou disfunção intestinal medida pelo taxa de lactulose:manitol, impulsionado principalmente pela diminuição da absorção de manitol, refletindo redução na área de absorção intestinal. O grupo com EAEC e coinfeções também foi associado a mudanças mais baixas dos z escores do peso-para-idade, peso-para-comprimento e de comprimento-para-idade em comparação com todos os outros grupos. As mais frequentes coinfeções cumulativas foram *Campylobacter*, *Giardia* e *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC). Concluímos que EAEC e coinfeções estão associadas com menor status socioeconômico, saneamento, amamentação e maior uso de antibióticos. As coinfeções mais frequentes foram *Campylobacter*, *Giardia* e aEPEC. Interações da EAEC e patógenos entéricos também estão associados com inflamação intestinal e diminuição das respostas imunológicas locais e sistêmicas e disfunção intestinal, especialmente, redução na função de absorção intestinal. Assim, infecções subclínicas por EAEC são frequentes e

parecem ter um sinergismo com outros patógenos levando ao comprometimento do crescimento em crianças neste estudo de coorte na rede MAL-ED.

Financiamento: *INCT-IBISAB, CNPq e Bill and Melinda Gates Foundation (BMGF)*

Correlação dos biomarcadores mieloperoxidase, calprotectina e lipocalina-2 na inflamação gastrointestinal em crianças desnutridas em Fortaleza, Ceará

Mara de Moura Gondim Prata¹, Havt A¹, Bolick DT², Pinkerton R, Lima AAM¹ and Guerrant RL^{2,1*}

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia e Biomedicina-INCT, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

² Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Medicine, University of Virginia, School of Medicine, Charlottesville, VA 22908, USA

Biomarcadores fecais surgiram como importantes ferramentas para avaliar a inflamação intestinal e as enteropatias. O objetivo deste estudo foi investigar as correlações entre os marcadores fecais, mieloperoxidase (MPO), a lactoferrina (FL), calprotectina (FC) e lipocalin-2 (Lcn-2), e comparar a normalização da proteína fecal com a normalização do peso fecal. As quantificações de MPO, FL, FC e Lcn-2 foram determinados em amostras de fezes congeladas coletadas de 78 crianças (idade média de $15,2 \pm 5,3$ meses) em um estudo caso-controle de desnutrição infantil. As amostras fecais foram selecionadas com base nas concentrações alta (1072,16-3435,43 ng/ml), moderada (266,54-907,39 ng/ml) e baixa (0,88-83,58 ng/ml) de MPO anteriormente realizados no Brasil. As concentrações de biomarcadores foram medidos por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados demonstraram que a correlação entre todos os biomarcadores foram significativas ($P < 0.01$). Foi encontrado que as associações mais relevantes ($p < 0.001$) foram entre MPO fecal com lactoferrina e calprotectina fecal e, a menos relevantes ($p < 0.01$) entre os 3 biomarcadores inflamatórios com Lcn-2, provavelmente porque este último reflete lesão do enterócito, bem como a presença de neutrófilos. Os resultados de biomarcadores com a proteína normalizada em comparação com valores normalizados com base no peso fecal não foram diferentes, sugerindo que o custo e o tempo adicional para a normalização com a medida total de proteínas não foram necessários. Em conclusão, MPO fecal correlaciona com lactoferrina fecal e calprotectina independentemente da situação do aleitamento materno e caracteriza um biomarcador útil para comparação de estudos nos modelos experimentais em humano e animal.

PREVALÊNCIA DE *NOROVÍRUS* EM CRIANÇAS DE UM ESTUDO CASO-CONTROLE DE DIARREIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Rafhaella Nogueira Della Guardia Gondim¹, Rafaela Chemllo Pankov¹, Mara de Moura Gondim Prata¹, Paloma Araújo Cavalcante¹, Helice Veras¹, Ana Karolina Santos¹, Thiago Miranda de Freitas¹, Claudiane Carvalho Bessa¹, Alexandre Havt Bindá¹, Jie Liu², Eric Houpt², Tulio Machado Fumian³, José Paulo Gagliardi Leite³, Marize Pereira Miagostovich³, Aldo Ângelo Moreira Lima¹.

¹ Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (INCT – IBISAB), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

² Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Medicine, University of Virginia, School of Medicine, Charlottesville, VA, USA.

³ Departamento de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Norovírus (NoV) é um dos principais agentes etiológicos na diarreia infantil, sendo reconhecidos como responsável por mais de 90% dos surtos de gastroenterite viral aguda no mundo. Postulamos que o NoV seja uma causa prevalente de diarreia infantil na infância e que o conhecimento genético do mesmo auxilie no desenvolvimento de potencial vacina. O estudo tem como objetivos caracterizar a infecção pelo NoV, avaliando genótipos prevalentes, realizar análise filogenética e associação com os dados socioeconômicos e ambientais, clínicos, e antropométricos das crianças do estudo. Ademais, o estudo caracteriza a diversidade genética dos NoVs circulantes na região no semiárido brasileiro. Para isso, foram selecionadas crianças de 6 cidades da região no semiárido: Cajazeiras (PB), Crato (CE), Ouricuri (PE), Patos (PB), Picos (PI) e Souza (PB), no período de 2009 a 2011. Destas, 200 crianças de cada cidade com a idade de 2 a 36 meses foram divididas entre casos e controles (100/100), tendo como definição de caso a criança ter apresentado algum episódio de diarreia nos últimos 14 dias antes da coleta. As 1200 amostras de fezes coletadas foram armazenadas em RNA later em temperatura -20°C. O RNA foi extraído com kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Valencia, CA). Para diagnóstico, as amostras foram submetidas à tecnologia do Luminex Bio-Plex 200 System (Bio-Rad), o qual utiliza microesferas de poliestireno acopladas a sondas de hibridização específicas para o vírus. O resultado mostrou uma prevalência de 3% (36/1200) de NoV nestas amostras. Após o diagnóstico, as amostras positivas foram acrescidas de mais 130 amostras inicialmente negativa e novamente testada, agora através da metodologia de RT-qPCR. O resultado mostrou que das 166 amostras testadas, 75 amostras tiveram resultado positivo para NoV. Estas 75 amostras foram purificadas e encaminhadas para sequenciamento do genoma e posterior genotipagem, além de análise filogenética, para termos conhecimento dos tipos de NoV circulantes na região do semiárido. Os resultados preliminares mostraram uma variação na prevalência 3-45% de NoV associado com amostras fecais no semiárido brasileiro.

Rotavírus: um estudo caso-controle de diarreia em crianças no semiárido brasileiro

Rafaela Chemllo Pankov¹, Rafhaella Nogueira Della Guardia Gondim¹, Mara de Moura Gondim Prata¹, Paloma Araújo Cavalcante¹, Herlice do Nascimento Veras¹, Thiago Miranda de Freitas¹, Claudiane Carvalho Bessa¹, Alexandre Havt Bindá¹, Jie Liu², Eric Houpt², Tulio Machado Fumian³, José Paulo Gagliardi Leite³, Marize Pereira Miagostovich³, Aldo Ângelo Moreira Lima¹.

1 Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (INCT – IBISAB), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

2 Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Medicine, University of Virginia, School of Medicine, Charlottesville, VA, USA.

3 Departamento de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

As doenças diarreicas infecciosas representam um grande problema de saúde pública mundial e acometem principalmente crianças com até cinco anos de idade. As infecções entéricas estão diretamente relacionadas às condições socioeconômicas e aos países em desenvolvimento, e os seus principais causadores são bactérias, parasitas e vírus. O rotavírus do grupo A é um dos principais agentes causadores das gastroenterites na infância. O objetivo do estudo foi identificar a prevalência de rotavírus em crianças com e sem diarreia na região do semiárido brasileiro. Foram selecionados 600 casos e 600 controles de crianças com a idade entre 2 e 36 meses das cidades de Cajazeiras (PB), Crato (CE), Ouricuri (PE), Patos (PB), Picos (PI) e Souza (PB) durante os anos de 2009 a 2011. Foram coletadas amostras de fezes e armazenadas em tubos contendo RNA later em temperatura -20°C. O RNA foi extraído com kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Valencia, CA). Para a detecção do referido vírus foi utilizado a enzima OneStep RT-PCR (QIAGEN®, Valencia, CA) e como alvo o gene NSP3 foi identificado nas amostras. Para tal diagnóstico as amostras foram submetidas a tecnologia do Luminex Bio-Plex 200 System (Bio-Rad), o qual utiliza microesferas de poliestireno acopladas a sondas de hibridização específicas para o vírus. As amostras diagnosticadas apresentaram uma prevalência de 7,1% (n= 86 amostras positivas), e a comparação entre os controles e os casos observou um valor significativo de $P = 0.0049$. A cidade de Cajazeiras apresentou correlação significativa com os casos ($P = 0.005$). Além disso, a cidade de Crato apresentou a maior prevalência de 23%, seguida de Picos (7%), Cajazeiras (6%), Patos (3%), Ouricuri (2,5%) e Souza (1,5%). Mesmo depois da introdução da vacina para rotavírus (G1P[8] Rotarix) em 2006, os resultados sugerem a associação de rotavírus com diarreia infantil em algumas localidades no semiárido brasileiro. No momento as amostras estão sendo testadas por RT-qPCR para realização da genotipagem e sequenciamento do genoma para melhor compreensão dos clones de rotavírus predominantes nesta região.

Prevalência e identificação dos fatores de virulência da *Escherichia coli* enteropatogênica no semiárido brasileiro**Ana Karolina Silva dos Santos¹; Pedro Henrique Quintela Soares de Medeiros¹; Mara de Moura Gondim Prata¹; Paloma Araújo Cavalcante¹; Marília Silveira Maia Gurgel do Amaral¹; Alexandre Havt¹; Aldo Ângelo Moreira Lima¹****¹Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil; ¹Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (IBISAB)**

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um dos agentes etiológicos mais relevantes para o diagnóstico de diarreias infantil. Contudo, a epidemiologia das infecções por esse patógeno permanece pouco elucidada em grande parte no mundo. Vários genes de virulência relacionados com EPEC foram descritos, mas o seu papel na patobiologia da infecção não está completamente elucidada. Este estudo teve como objetivo determinar a prevalência de EPEC e descrever o perfil molecular de virulência entre casos (crianças com diarreia) e controles (crianças sem diarreia) residentes no semiárido brasileiro. O estudo incluiu 1200 crianças, de 2-36 meses de vida, residentes das cidades de Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Cajazeiras (PB), Souza (CE) e Patos (PB). A duração do estudo foi durante o período de 01 de Setembro de 2009 a 30 de Março de 2011. As fezes foram coletadas e avaliadas para genes de diagnóstico de EPEC (presença de *bfpA* ou *eaeA*) realizado pela tecnologia xMAP (Bioplex 200, Biorad). As amostras positivas foram analisadas por PCR multiplex para 19 fatores de virulência de EPEC amplamente investigados na literatura: *espB*, *espD*, *tir*, *espC*, *espZ*, *espL*, *ler*, *map*, *espG*, *espH*, *nleE*, *nleF*, *nleB*, *paa*, *nleC*, *nleD*, *espJ*, *cesT* e *espP*. Do total de amostras, apenas 730 foram analisadas, sendo a EPEC diagnosticada em 118 amostras. As demais amostras, não foram analisadas devido à limitações do estudo. A EPEC típica mostrou-se em 1,7% dos casos (6/365) e em 0,6% dos controles (2/365), enquanto a EPEC atípica foi detectada em 13,7% dos casos (50/365) e em 16,4% dos controles (60/365). De todas as amostras de EPEC isoladas, os genes *ler*, *cesT* e *espG* foram os mais frequentemente detectados (67,7%, 58,4%, e 52,5%, respectivamente). Estes genes estão associados com a regulação global da ilha de patogenicidade da bactéria. O gene de menor frequência foi o *tir*, importante componente para a aderência bacteriana a célula do hospedeiro. O gene *espD* (translocação dos poros), quando observado isoladamente, obteve associação significativa entre a presença do gene e a subpopulação caso ($p=0,0354$). Na análise utilizando o programa CART® (Classification and Regression Trees, San Diego, CA, EUA), a combinação da presença do gene *paa* com a ausência dos genes *espH*, *espJ* e *espZ*, foi associada com casos de diarreia infantil. Os dados sugerem que a prevalência de EPEC é relativamente alta nesta população infantil no Semiárido Brasileiro, porém esta prevalência não difere entre casos e controles. Este estudo indica a relevância do gene *espD* associado a patogenicidade da EPEC na diarreia infantil nesta população.

Patógenos entéricos em um estudo caso-controle de desnutrição infantil em Fortaleza, Ceará: análise quantitativa utilizando a plataforma tecnológica de Tac Array

¹HAVT, A., ¹LIMA, I.F.N., ¹FILHO, J.Q. ²OPERARIO, D.J., ²LIU, J., ¹VERAS, H.N., ¹SANTOS, A.K.S., ¹MEDEIROS, P.H.Q.S., ¹GUEDES, M.M., ²HOUPPT, E.R., ²GUERRANT, R.L., ¹LIMA, A.Â.M.

¹ Instituto de Biomedicina do Semi-Árido Brasileiro. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

² Central of Global Health - Universidade da Virginia, Charlottesville – VA, EUA.

Como a terapia de reidratação oral reduziu a mortalidade por diarreia aguda, a diarreia persistente e desnutrição têm emergido como as principais causas de mortalidade e morbidade. Para investigar o impacto da desnutrição sobre a saúde infantil realizamos a pesquisa: Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecção Intestinal e Desnutrição e as Consequências para a Saúde e Desenvolvimento da Criança. Neste estudo caso-controle recrutamos crianças desnutridas (casos) de 6 a 24 meses que apresentavam índice de escore Z-peso-por-idade (WAZ) menor que -2 e crianças nutridas (controles) que apresentavam índice WAZ maior que -1. Neste estudo foi utilizado métodos clássicos de diagnóstico de patógenos entéricos como cultura bacteriana e ELISA assim como técnicas moleculares como reação de polimerase em cadeia (PCR). Contudo, não tivemos a possibilidade de realizar todo o diagnóstico através de uma só técnica e que a mesma fosse baseada na identificação do DNA do patógeno diretamente das fezes das crianças. O presente trabalho tem como objetivo apresentar a plataforma tecnológica de *TAC array* baseada na técnica de PCR em tempo Real, que nos traz a possibilidade de, além da identificação molecular, a possibilidade de quantificar a carga patogênica das crianças. Foram coletadas 591 amostras de fezes de 402 crianças recrutadas. Destas amostras isolamos o DNA-RNA de 340 amostras através do sistema QIAamp DNA Stool. Estas amostras representavam a primeira coleta de fezes dentre as duas programadas pelo estudo. Após diagnóstico pela plataforma *TAC array* apenas 286 amostras foram consideradas para a análise estatística associativa, pois apresentavam DNA externo normalizador utilizado no processo de extração. Dentre as 286 amostras 141 (49,30%) eram controles e 145 (50,70%) casos. Entre os 20 patógenos investigados as maiores prevalências foram encontradas para *E. coli* enteroagregativa (*aaiC* ou *aatA*), *Campylobacter sp.*, *E. coli* enteropatogênica atípica (*eaeA*), *Giardia sp.* e *Shigella sp.*. *E. coli* enteroinvasiva nos valores de 54.55, 43.01, 38.46, 28.32 e 23.43%, respectivamente. Após análise estatística (Teste de Fisher com * $p < 0,05$), apesar de sua baixa prevalência (12.24%) o agente *Crostridium difficile* foi associado com a desnutrição ($p = 0.03$, OR = 2.34, IC95% = 1.10 - 4.99). Contudo, *Giardia sp.* foi associado com as crianças nutridas ($p = 0.009$, OR = 0.50, IC95% = 0.29 - 0.84). Nenhum patógeno foi associado com nutrição ou desnutrição quando os valores quantitativos do ciclo limiar (Ct) foram usados na análise. A plataforma *Tac array* apresenta grande avanço no diagnóstico quantitativo molecular de patógenos com a vantagem de poder, até o momento, em uma única reação identificar 71 agentes para 8 amostras. De forma preliminar, poucos foram os achados relevantes. Contudo, uma análise futura mais detalhada nos fará possivelmente verificar uma maior sensibilidade e especificidade do método molecular em relação aos métodos tradicionais, o impacto na desnutrição relacionado com co-infecções encontradas, assim como investigar se cada infecção ou co-infecção influenciou no crescimento das crianças 5 meses após seus diagnósticos. Como perspectiva de melhoria, indicamos maior cuidado no processo de extração de DNA-RNA, para que em um futuro estudo nenhuma amostra precise ser descartada em virtude da ausência da diagnóstico do DNA normalizador externo.

DIAGNÓSTICO E PERFIL DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Campylobacter jejuni* ISOLADOS DE CRIANÇAS COM DIARRÉIA MODERADA E SEVERA NA CIDADE DE FORTALEZA, CEARÁ, BRASIL

Herlice N Veras, Tamara S Rodrigues, Josiane S Quetz, Thiago M Freitas, Ila FN Lima, Alexandre Havt, Rosa MS Mota, Luis C Rey, Aldo AM Lima

Unidade de Pesquisas Clínicas, Instituto de Biomedicina, Universidade Federal do Ceará.

Campylobacter spp. é considerada a causa mais comum de gastroenterite provocada por bactéria. No entanto, a detecção de espécies de *Campylobacter* ainda é um desafio, e o diagnóstico convencional por cultura já vem sendo substituído por métodos moleculares e imunoenzimáticos, pela maior sensibilidade dos mesmos em comparação a cultura. Este estudo tem como objetivo determinar a frequência de episódios diarreicos causados por *Campylobacter* spp. e *C. jejuni* em crianças com idade entre 0-36 meses que necessitaram de atendimento médico emergencial devido à doença diarreica moderada a severa. Este estudo faz parte de um projeto intitulado “Diarrhea Enteric Card (DEC)”, que teve como objetivo desenvolver um ensaio de PCR multiplex para o diagnóstico de bactérias patogênicas. O projeto teve aprovação nos comitês de ética local e nacional no Brasil (HIAS 80/06 e CONEPE 13523/2007, respectivamente). A extração de DNA foi feita diretamente das amostras fecais coletadas de 226 crianças durante os meses de maio de 2008 a abril de 2009, na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. Para a detecção das bactérias para a detecção bacteriana, o diagnóstico microbiológica convencional, diagnósticos moleculares (PCR e qPCR) - usando gene *gyrA* (subunidade A da DNA girase) para *Campylobacter* spp. - e um diagnóstico imunoenzimático (ELISA) foram realizados. A detecção dos genes associados à virulência de *C. jejuni* foi realizado por PCR. *Campylobacter* spp. foi encontrado em 13,07% (20/153) e 29,4% (31/150) - perda de 3 amostras – nas amostras por microbiologia convencional e PCR, respectivamente. O diagnóstico por qPCR e ELISA tiveram positividade em 29,4% (45/153) e 37,9% (58/153) nas amostras, respectivamente. A concordância entre os testes usados para diagnóstico foi moderada a regular, de acordo com o índice Kappa. A identificação de *C. jejuni* foi realizada através do gene *hipO*, e 19,9% (45/226) de *C. jejuni* foi identificado. A presença de genes associados à virulência de *C. jejuni* relacionado à patogenicidade do micro-organismo foi detectado seguindo a proporção de amostras positivas: *flaA*, 77,7% (35/45); *flgE*, 95,5% (43/45); *cheA*, 82,2% (37/45); *cheR*, 71,1% (32/45); *cheW*, 88,8% (40/45) – relacionados a motilidade e quimiotaxia bacteriana; *cadF*, 100% (45/45); *jlpA*, 48,8% (22/45) – relacionados a adesão; *ciaB*, 97,8 % (44/45); *pIdA*, 42,2% (19/45); *iamA*, 93,3% (42/45); *pVir* 0% (0/45) – relacionados a invasão; *cdtABC*, 95,5% (43/45) - relacionados a toxina citotética distensora (CDT); *ceuE*, 24,4% (11/45);

fur, 73,3% (33/45); *cfrA*, 45,7% (16/71) – relacionado ao transporte e regulação de ferro; *racR*, 100% (45/45); *dnaJ*, 88,8% (40/45); *katA*, 62,2% (28/45); *sodB*, 95,5% (43/45) – relacionado a sobrevivência da bactéria ao estresse oxidativo. *Campylobacter* spp. foi detectado em um significativo percentual de crianças com 0-36 meses com doença diarreica. A distribuição dos perfis de genes de virulência de *C. jejuni* não correspondeu com as apresentações clínicas do paciente (dor abdominal, febre e vômito), sugerindo que outros genes ou fatores do hospedeiro, como estado nutricional, são importantes para a definição da severidade das doenças diarreicas associadas a *C. jejuni*.

4:35-4:50	Caracterização molecular da virulência e resistência antimicrobiana de <i>Shigella</i> spp em Fortaleza, Ceará, Brasil Pedro Henrique Quintela - Universidade Federal do Ceará
-----------	---

Caracterização molecular da virulência e resistência antimicrobiana de *Shigella* spp em Fortaleza, Ceará, Brasil

Pedro HQS Medeiros, Ila FN Lima, Marjorie M Guedes, Mariana D Bona, Alexandre Havt, Luis C Rey and Aldo AM Lima

Unidade de Pesquisas Clínicas, Instituto de Biomedicina, Universidade Federal do Ceará

A Shigelose constitui um importante problema de saúde pública mundial, devido a sua alta prevalência, inexistência de vacina e elevada taxa de resistência antimicrobiana. O estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular da virulência e da resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de crianças com diarreia em Fortaleza, Ceará, Brasil. Sessenta e duas cepas de *Shigella* spp foram isoladas de fezes de crianças com diarreia moderada a severa entre 2008 e 2009 em Fortaleza. Foram também coletados dados socioeconômicos e manifestações clínicas da diarreia infantil através de questionário padronizado. A caracterização microbiológica convencional e ensaio de imunoaglutinação foram utilizados para a classificação dos sorogrupos (*S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*). O material genético foi extraído e analisado em quatro reações de polimerase em cadeia múltiplas, detectando 16 genes de virulência. Testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer, utilizando painel de 13 antimicrobianos. Observou-se predominância de *S. flexneri* (42%, 26/62) e *S. sonnei* (43%, 27/62) na população, seguidas de *S. dysenteriae* (8%, 5/62) e *S. boydii* (6%, 4/62). Houve maior associação de *S. flexneri* com crianças com renda mensal familiar abaixo do salário mínimo ($P=0.0001$). Os genes de virulência *pic* (proteína associada à adesão a mucosa intestinal), *set* (enterotoxina 1) e *sepA* (proteína envolvida na invasão celular) isoladamente foram associados à *S. flexneri* ($P<0.0002$). A presença concomitante destes genes foi associada à intensa dor abdominal ($P=0.0379$). O fenótipo de resistência a pelo menos um fármaco foi observado em 96.8% (61/63) dos isolados. A maior taxa de resistência foi para a combinação sulfametoxazol/trimetoprim (82.5%, 52/63), seguida de tetraciclina (79.4%, 50/63) e ampicilina (60.3%, 38/63). Observou-se associação estatística entre *S. flexneri* e resistência a ampicilina e a cloranfenicol ($P<0.0001$ para ambos), e entre *S. sonnei* e resistência a azitromicina ($P=0.01$). Em relação à resistência a mais de um antimicrobiano, 33.30% (21/63) das cepas foram resistentes a dois antimicrobianos, 23.8% (15/63) a três fármacos e 28.6% (18/63) a quatro fármacos. O padrão de resistência a sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol foi o mais prevalente nesta população. A presença concomitante dos genes *pic*, *set* e *sepA* foi também associada a resistência a pelo menos três antimicrobianos ($P=0.0028$). Em conclusão, os dados mostraram que a severidade da Shigelose está associada ao sorogrupo *S. flexneri* e à presença dos genes *pic*, *set* e *sepA*. Estas cepas também possuem maior taxa de resistência antimicrobiana, corroborando para uma associação entre virulência e resistência antimicrobiana na evolução de *Shigella* spp.. Este estudo contribui para a caracterização do perfil de virulência e resistência das cepas de *Shigella* associadas com diarreia em Fortaleza, alertando para elevadas taxas de resistência a fármacos comumente utilizados na prática clínica e apontando especificidade da resistência entre os sorogrupos *S. flexneri* e *S. sonnei*.

Infecção por cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica na migração de células intestinais

Paloma Araújo Cavalcante, Mara de Moura Gondim Prata, Tamara Silva Rodrigues, Antonio Vinícios Alves Silva, Pedro Henrique Quintela Soares de Medeiros, Alexandre Havt, Aldo Ângelo Moreira Lima

Instituto Biomedicina do Semiárido Brasileiro (INCT-IBISAB), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é um importante patógeno associado às doenças diarreicas. Infecções intestinais ocasionam comprometimento da barreira intestinal e um dos primeiros mecanismos de resposta à recuperação é a migração das células intestinais. As principais proteínas que regulam esse processo são as pequenas GTPases Rho, Rac1, RhoA e Cdc42A. Desse modo, investigou-se o efeito de quatro cepas de EPEC, uma cepa padrão (E2348/69), uma cepa selvagem (proveniente de uma criança desnutrida), uma cepa $\Delta escF$ (cepa mutante para o sistema de secreção do tipo III) e uma cepa $\Delta escF escF$ (cepa restaurada para o sistema de secreção do tipo III) na migração celular intestinal, bem como a regulação da transcrição das GTPases Rho. Em placas de 12 poços, foram adicionados $2,5 \times 10^5$ células/mL poço (células de cripta de intestino de rato – IEC-6). Ao atingirem confluência (48h), adicionou-se mitomicina C 5 μ g/mL por 15 minutos em cada poço a fim de garantir que apenas o processo de migração ocorra. Em seguida, realizou-se um corte na monocamada a partir da região central para o lado direito. Então as células foram infectadas por 3 horas com cepas de EPEC. As células foram fotografadas após 2, 4, 6 e 24 horas da infecção, a contagem das células que migraram foi realizada no *Image pro-plus*. Na avaliação da transcrição dos genes *rhoA*, *rac1* e *cdc42*, as células foram coletadas logo após a infecção e o RNA foi extraído e avaliado através de PCR quantitativo. A análise dos dados foi realizada pelo GraphPad Prism por meio do ANOVA e teste de Bonferroni. A infecção pelas cepas de EPEC reduziram significativamente a migração das células intestinais, com exceção da cepa EPEC $\Delta escF$. Em relação à transcrição gênica das GTPases Rho, observou-se apenas uma redução da transcrição de *rac1* nas células que haviam sido infectadas pelas cepas de EPEC padrão. Esses dados mostraram que a migração das células intestinais é reduzida principalmente pelas cepas patogênicas de EPEC e que o sistema de secreção do tipo III é um fator que contribui para esse efeito. A redução da transcrição gênica de *rac1* pela cepa de EPEC padrão também é um indicativo de mecanismo de como este patógeno ocasiona essa lesão celular.

SESSÕES

Sábado

14 de Maio de 2016

8:30- 8:50	Anatomical and functional deficiencies of the crural diaphragm Miguel AN Souza - Universidade Federal do Ceará
------------	---

Anatomical and functional deficiencies of the crural diaphragm in patients with esophagitis

**Miguel Ângelo Nobre e Souza. Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará,
Fortaleza, Brazil**

Inspiratory esophagogastric junction (EGJ) pressure is lower in GERD and patients fail to increase EGJ pressure during the inspiratory effort.

Aim: to assess the EGJ activity during inspiratory maneuvers (high-resolution manometry-HRM) and the crural diaphragm (CD) thickness (endoscopic ultrasound-EUS) in GERD.

Methods: Twenty esophagitis patients (average age 45y, 7 grade A, 13 grade B) had HRM and EUS. Forty-three controls were recruited; thirty had HRM (average age 33y), and 13 had EUS (average age 40y). The EGJ contractility index (EGJ-CI) (mmHg×cm) was measured during normal respiration and two inspiratory maneuvers: without and with inspiratory loads of 12, 24, and 48 cmH₂O (TH-maneuvers). A composite metric for TH-maneuvers (“EGJ total activity”) was defined as the product of the maximal EGJ pressure and the length of its aboral excursion during the maneuver (mmHg× cm). The CD thickness (cm) was measured during expiration (12 MHz).

Results: Expiratory LES pressure and IRP were lower in GERD. The EGJ-CI and the “EGJ total activity” were lower in GERD during TH-maneuvers (48-cmH₂O load: 168.4±13.8 v 114.8±9.6, p = 0.006). Patients failed to sustain the inspiratory CD activity across the 12 and 48-cmH₂O efforts. The CD was thinner in GERD patients (0.37±0.03 v 0.49±0.04, p = 0.02). The CD thickness correlated with the increment in the “EGJ total activity” in GERD without a hiatal hernia (r = 0.702, p = 0.016, n = 11).

Conclusion: There are anatomical changes and functional failure of the CD in esophagitis patients supporting the possibility of a skeletal muscle deficiency in GERD.

8:50-9:05	Intraluminal impedance evaluation of the pharynx after acute exposure in patients with posterior laryngitis Tanila Aguiar Coutinho - Universidade Federal do Ceará
-----------	---

Intraluminal impedance evaluation of the pharynx after acute exposure in patients with posterior laryngitis

Tanila Aguiar Andrade Coutinho. Clinical Hospital, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

INTRODUCTION: The integrity of the esophageal mucosal barrier is a protective mechanism against gastroesophageal reflux. The baseline value of intraluminal impedance has been used to assess the integrity of the esophageal mucosa. Patients with higher esophageal acid exposure time present lower basal impedance, which leads to structural changes in the mucosa. This study hypothesis is that patients with unspecified chronic laryngopharyngitis have lower basal pharyngeal impedance than healthy individuals after acid exposure. **METHOD:** Quantitative, interventional, and open study comprising two groups of patients: Laryngitis Group (LG) (n=11) with patients presenting chronic intermittent hoarseness and laryngeal edema, and Control Group (CG) (n=10) composed by healthy volunteers. LG underwent clinical assessment (standardized questionnaires) and the two groups underwent functional evaluation (high-resolution manometry and intraluminal impedance-pH monitoring). The intervention lasted 55 minutes, from the 1st to 5th, 30mL of water were administered orally (6mL/minute); 16th to 30th, 60mL of hydrochloric acid were administered (2mL/30 seconds); 41st to 45th, 30mL of water were once again administered (6mL/minute). Intraluminal impedance was continuously monitored with a probe whose sensors were placed 2cm above the proximal edge of the upper esophageal sphincter (UES), the edge of the UES, and the proximal esophagus. Values were measured every 5 minutes on stable, artifacts-free segments. **RESULTS:** Basal impedance 2cm above the upper edge of the UES in laryngitis group was similar to the control (LG=2525±448 vs. CG=2439±282, p=0.72). During acid exposure, 20th minute of the intervention, the impedance was significantly lower in the laryngitis than in control group (LG=1374±334 vs. CG=2595±2110, p=0.02). At the end of the test, 55th minute, this significance was confirmed even after water intake (LG=1088±331 vs. CG=1691±654, p=0.02). In the hypopharyngeal, at the edge of the UES, basal impedance presented no differences among the two groups (LG=2583±322 vs. CG=2514±348, p=0.72). During acid exposure, 20th minute, impedance was lower in LG (LG=1207±212 vs. CG=1518±387, p=0.05) and at the end of the test, 55th minute, there was no significant difference, but the impedance value was higher in control than in laryngitis group (LG=1004±240 vs. CG=1288±427, p=0.19). **CONCLUSION:** Hypopharyngeal impedance-pH monitoring values after acid exposure were lower in patients with unspecified chronic laryngitis, commonly attributed to reflux disease, than in healthy volunteers.

Effects of acute exercise on gastric emptying of liquids and solids meals in awake rats
Efeitos do exercício agudo no esvaziamento gástrico de líquidos e sólidos em ratos acordados**Rômulo Celly Lima Siqueira, Armênio Aguiar dos Santos;****Universidade Federal do Ceará - UFC, Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia**

INTRODUÇÃO: O esvaziamento gástrico (EG) é uma das principais funções do trato gastrointestinal e o uso de formas não-invasivas para determinar o EG tem ganhado destaque, pois permite a reavaliação do EG em ratos não necessitando do sacrifício destes para obtenção da medida. **OBJETIVOS:** Padronizar o uso da metodologia de teste respiratório com isótopo de carbono-13 (^{13}C) para mensuração do EG em ratos e avaliar o EG de líquidos e sólidos após exercício agudo. **METODOLOGIA:** Foram utilizados ratos *Wistar* machos pesando entre 180-280g, para avaliação do EG de Líquidos (EGL) os animais foram gavados com achocolatado (2,5ml/kg) adicionado de acetato de sódio- ^{13}C (16mg/kg). E para os EG de sólidos (EGS) os animais passaram por um processo de condicionamento para alimentação por 4 dias consecutivos, a refeição consistia de 1 g da panqueca, preparada através do cozimento de 50mL de uma mistura total de 450mL de leite com uma gema de ovo adicionada de 100 μL de ^{13}C - ácido octanóico, perfazendo um conteúdo aproximado de 1 μg de ^{13}C - ácido octanóico. Para validação dos resultados os animais foram canulados para coleta do sangue em diferentes tempos (0'; 1,5'; 2,5'; 10') com intuito de averiguação do tempo ideal de saturação. Além disso, estes foram pré-tratados (30') com atropina (2,5mg/kg, i.p.) e metoclopramida (10mg/kg, s.c.). Para execução do exercício, os animais passaram por um processo de adaptação ao meio líquido que consistiu em exercício de natação progressivo por cinco dias (10, 20, 30, 40 e 40'). As amostras de ar foram coletadas em dois momentos: primeiramente sendo submetidos a condição de repouso por 15' (condição sedentário) em um recipiente com 5cm de água e uma semana depois os animais foram submetidos à natação de 15' com 5% do peso corporal (condição exercício). Antes de administrar a refeição (tempo zero) e imediatamente após, os animais foram colocados em uma câmara pletismográfica (850mL) com válvulas fechadas para o controle da saída do ar, permitindo o acúmulo e saturação de CO_2 . A cada 5' e/ou 10' para EGL e a cada 15' e/ou 30' para EGS foram coletados o CO_2 acumulado no tempo 1,5' de saturação através de uma bomba de vácuo. O processo se repetiu por 70' para EGL e por 4h para EGS. As amostras foram avaliadas em um sistema de análise de isótopos (IRIS 2). **RESULTADOS:** Observou-se que o tempo ideal de coleta das amostras de ar, sem indução de hipóxia foi o tempo de 1,5', onde os valores de PO_2 , PCO_2 , SO_2 e pH não foram diferentes do tempo 0'. Constatou-se, como esperado, que a atropina gerou retardo, ao gerar diminuição dos valores do pico de concentração do ^{13}C , ou seja, do Delta Over Base (DOB 0/00), tanto no EGL (226 $\pm$ 33,89 vs 93,68 $\pm$ 17,85), como no EGS (8,056 $\pm$ 3,917 vs 3,529 $\pm$ 1,989), enquanto, a metoclopramida gerou aceleração também no EGL (226 $\pm$ 33,89 vs 281,9 $\pm$ 31,04) e no EGS (8,056 $\pm$ 3,917 vs 11,48 $\pm$ 2,414). Quanto ao exercício, quando comparado à condição de sedentário esse foi capaz de induzir uma diminuição dos parâmetros T_{lag} (EGL: 80,13 $\pm$ 4,470 vs 45,20 $\pm$ 19,27 min; EGS: 31,40 $\pm$ 6,841 vs 24,80 $\pm$ 4,207), $T_{1/2}$ (EGL: 131,1 $\pm$ 7,905 vs 88.20 $\pm$ 20,40; EGS: 62,6 $\pm$ 14,42 vs 32,2 $\pm$ 5,76) e modificar a Curva de Concentração (DOB) nos dois tipos de EG. **CONCLUSÃO:** Foi possível validar a metodologia de avaliação do EGL e EGS por teste respiratório com ^{13}C em ratos. Esta metodologia permitiu verificar os efeitos de aumento do esvaziamento gástrico nos parâmetros T_{lag} , $T_{1/2}$ e Curva de Concentração (DOB).

9:20-9:35	Acidosis attenuates gastric contractile response on rat stomach fundus by decrease in calcium permeability Daniel Maia Nogueira de Oliveira - Universidade Federal do Ceará
-----------	--

ALUNO: Daniel Maia Nogueira de Oliveira
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Ceará
ORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Título: Acidosis attenuates gastric contractile response on rat stomach fundus by decrease in calcium permeability

Previously it was suggested that acidemia, caused by acute exercise session, would be responsible for inducing delayed gastric emptying of liquids, as well as decrease the contractile response in isolated tissue stomach fund in rats. In this paper, we studied the effects of extracellular acidosis in gastrointestinal tissues of rats in vitro. Isometric recordings were obtained from strips of stomach and duodenum segments in preparations for isolated organ bath using a digital acquisition system. The extracellular acidosis (pH 6,0) decreased the contractile response significantly ($P < 0.05$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni test) in stomach fundus tissue, evoked by pharmacomecânico coupling (CCh and 5-HT) with maximum response ($148.1 \pm 12.5\% \pm 11.6$ vs. 212%) to CCh and ($76.3 \pm 8\%$ vs $105.6 \pm 8.4\%$) to 5-HT. However, in isolated duodenum tissue in acidified environment, also stimulated by (CCh and 5-HT), no differences were found in the contractile responses ($P > 0.05$). In an acid environment (pH 6,0), the maximum contraction of the stomach fundus tissue by Ca^{2+} entry pathway ROCC channels activated by CCh ($1\mu\text{M}$) was significantly reduced ($P < 0.05$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni test) compared to its control ($56.6 \pm 9.3\%$ vs $93.8 \pm 11.5\%$ respectively). However, when ROCC channels were activated by CCh (30 mM), significant decreases in responses were found only when Ca^{2+} was added at concentrations of 2 and 5 mM ($21.9 \pm 6.6\%$; $84.2 \pm 15.3\%$) vs. ($89.3 \pm 15.5\%$; $150.6 \pm 18.6\%$). In additional experiments, the extracellular acidosis (pH 6,0) reduced contractile responses of stomach fundus tissue by Ca^{2+} entry through the SOCC channels, with significant difference ($P < 0.05$, two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test) when Ca^{2+} was added at concentrations of 2 and 5 mM ($24.5\% \pm 10.1$ and $82.1 \pm 13.9\%$) vs. ($66 \pm 12.9\%$ and $125.3 \pm 12.7\%$). This study suggests that extracellular acidosis decreases the contractile response in gastrointestinal tissues selectively, as only the stomach fundus tissue were affected. Furthermore, this reduction in contractility appears to be due, at least in part, to a decrease in uptake of Ca^{2+} from the extracellular environment by activated calcium channels by intracellular signal transduction.

Keywords: Extracellular acidosis, Smooth Muscle, Gastrointestinal.

9:35-9:50	Motor repercussions in isolated esophagus exposed to solution that mimics the gastric juice in gastroesophageal reflux in rats Kalinne Kelly Lima Gadelha - Universidade Federal do Ceará
-----------	--

10:10-10:25	TRPV1 receptors modulate acid induced esophageal inflammation in surgical murine model of gastro-esophageal reflux disease Renan Oliveira - Universidade Federal do Ceará
-------------	--

TRPV1 Receptors Modulate Acid Induced Esophageal Inflammation in Surgical Murine Model of Gastro-Esophageal Reflux Disease

Renan Oliveira Silva. Pharmacology PhD Program, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

Background: In vitro experiments showed overexpression of TRPV1 receptors in esophageal sensory fibers in GERD, and that acid induced activation of TRPV1 receptors with the release of inflammatory mediators from neurons and epithelial cells. Aim: To investigate the role of TRPV1 in esophageal inflammation “in vivo” using a surgical murine model of GERD.

Methods: Gastro-esophageal reflux was surgically induced in Swiss mice (30– 35g) using a modification of the method described by Omura et al., 1999. The animals were sacrificed at 1, 7 and 14 days post-op. The control group was the Sham surgery. Other groups of mice were divided into: Group I: GERD (positive control), II: GERD + Omeprazole (40 mg/kg, i.p., daily), Group III: GERD + Resiniferatoxin (to deplete capsaicin sensitive neurons (for 3 days; 30 µg/kg, 70 µg/kg and 100 µg/kg, s.c.;) and Group IV: GERD + Capsazepine (TRPV1 antagonist) (5 mg/kg, i.p., daily), and sacrificed after 7 days. Evaluation used macroscopic and histopathological score (according to the criteria of Yerian et al., 2011), esophageal wet weight and myeloperoxidase (MPO) activity.

Results: Surgery did not provoke macroscopic esophagitis but induced microscopic inflammation, increased wet weight and MPO activity with maximal effect at day 7 and resolution after 14 days. Sham intervention did not provoke esophageal inflammation (See Table 1). The model at day 7 was selected for further experiments. Inhibition of acid secretion with omeprazole, depletion of capsaicin-sensitive neurons by Resiniferatoxin and treatment with TRPV1 antagonist capsazepine significantly decreased the surgical induced esophageal inflammation (See Table 2). Conclusion: Our “in vivo” experiments confirm that TRPV1 receptors modulate acid induced esophageal inflammation and are involved in the pathophysiology of esophageal inflammatory process associated with gastro-esophageal reflux disease.

Financial support: CNPq, CAPES.

Is it possible to treat GERD with natural products? Insights of a biopolymer

Lucas Antonio Duarte Nicolau¹, Ana Paula Macedo Santana¹, Francisco José Batista de Lima Júnior¹, Durcilene Alves da Silva², Armenio Aguiar dos Santos¹, Daniel Sifrim³, Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza¹

1- Institute of Biomedicine of Brazilian Semi-Arid (IBISAB), Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil.

2- Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Post-Graduation Program Federal University of Piaui, Parnaiba, Brazil.

3- Wingate Institute of Neurogastroenterology, Bart's and The London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, UK.

Introduction: *Anacardium occidentale* L. (AOL) (cashew) is a natural product obtained from bark of Brazilian northeastern tree. It has previously shown gastro-protective effect in animal models of NSAID-induced inflammation. Impairment of esophageal mucosal integrity is important in the pathophysiology of GERD. Previous studies showed esophageal topical protective effect by alginates. We aimed to assess the mucosal protection effect of AOL in human esophageal biopsies. Methods: Studies were performed on distal esophageal biopsies from 12 patients with heartburn (9 with NERD). Biopsies were mounted in specially adapted Ussing chambers to measure transepithelial electrical resistance (TER). After a 30 minutes period of stabilization, the chambers were opened for a short exposure of the biopsies' mucosal side to a "protectant solution". Negative control biopsies were not exposed to "protectants". Positive control biopsies were exposed to a commercial alginate based product. Protectant solutions tested were: 1) gum obtained from AOL (cashew), solubilized in Krebs with 2.5% concentration and 2) gum obtained from AOL, solubilized in Krebs with 5% concentration. After washing the "protectant solution", the mucosal side of the biopsy was exposed to Krebs solution at pH 2.0 containing pepsin 1 mg/mL and taurodeoxycholic acid 2 mM. The following 30 minutes were recorded and the % change of TER was calculated. This study was approved by Local Ethics Committee (Federal University of Ceara 39538814.6.0000.5045). Results: The acid-pepsin-BA solution provoked a TER drop in the "unprotected" biopsies (negative control) of $20.02 \pm 2.4\%$. In biopsies protected by alginates (positive control), the TER drop was of 1.3 ± 6.1 ($P < 0.05$). The AOL cashew gum at 2.5% did not prevent a drop of TER. In the other hand, AOL cashew gum at 5% had a significant ($P < 0.05$) protective effect (TER drop of $1.69 \pm 2.4\%$). Conclusion: The AOL cashew gum 5% solution produced "in vitro" topical esophageal mucosal protection. This effect was probably due to its muco-adhesiveness properties provided by complex polysaccharides. In vivo long-lasting effect of this muco-protective product will be further explored as add-on therapy for GERD.

10:40-10:55	Effects of inspiratory muscular training in patients with gastro-esophageal reflux disease Juliete Vaz Ferreira - Universidade Federal do Ceará
-------------	--

10:55 -11:10	Minimal alterations in cardiovascular function in patients with Chagas Disease Danielle Melo de Leopoldino - Universidade Federal do Ceará
--------------	---

Correlation between minimal changes in cardiac function, esophageal motility and heart rate variability in patients with the indeterminate form of Chagas Disease

Danielle Melo de Leopoldino. Clinical Hospital, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Introduction Chagas disease (CD) is currently the fourth most impacting disease in Latin America. Infected individuals are at continued risk of developing chronic cardiomyopathy; the main cause of morbidity and mortality. CD may also lead to intrinsic denervation of the enteric nervous system (ENS). Previous studies have described important changes in the autonomic nervous system, myocardium and digestive system. Indeterminate chronic Chagas disease (ICD) is asymptomatic and cannot be detected by simple tests such as electrocardiography, esophagography, contrast enema or chest radiography. However, minimal changes in cardiac and digestive functions have been reported for patients without clear clinical signs of cardiac or ENS denervation. We hypothesize these changes may be due to autonomic dysfunction. The purpose of this study was to evaluate esophageal motility and ventricular function and their correlation with heart rate variability (HRV) in subjects with ICD. Methods. Sixteen subjects with ICD and 8 healthy controls were submitted to electrocardiography for 30 min. with monitoring of HRV in the time and frequency domains, echocardiography with monitoring of cardiac function (systolic/diastolic) and six-channel perfusion esophageal manometry. Results. The systolic function (ventricular ejection fraction) was preserved in ICD patients and controls (66.1 ± 7.28 vs. 69.1 ± 6.36 ; $p=0.35$), but a significant difference was observed in tissue Doppler E' wave values (0.12 ± 0.02 vs. 0.14 ± 0.01 ; $p=0.02$). The average E wave deceleration time was longer for ICD patients but the difference did not reach statistical significance (200.8 ± 35.2 vs. 191.6 ± 36.1). As for the HRV time domain, the average NN50 (27.93 ± 33.97 vs. 138.7 ± 176.1 ; $p=0.02$), pNN50 (2.61 ± 3.47 vs. 11.66 ± 16.16 ; $p=0.04$) and geometric index (9757 ± 2787 vs. 13059 ± 2793 ; $p=0.01$) were significantly lower for patients with ICD. Although SDNN (50.18 ± 22.48 vs. 53.55 ± 12.61 ; $p=0.70$) and rMSSD (23.05 ± 13.78 vs. 32.32 ± 18.18 ; $p=0.18$) were lower for ICD subjects on the average, the difference was not significant. In the frequency domains (expressed in normalized units), HF-FFT (fast Fourier transformation) (29.40 ± 13.96 vs. 43.3 ± 12.9 ; $p=0.03$), HF-AR (autoregressive) (29.3 ± 14.7 vs. 43.7 ± 12.5 ; $p=0.02$), LF-FFT (70.59 ± 13.96 vs. 56.75 ± 12.54 ; $p=0.03$) and LF-AR (70.74 ± 14.75 vs. 56.28 ± 12.54 ; $p=0.02$) differed significantly between the groups, with ICD patients displaying lower average HF values and higher average LF values, whether by FFT or AR. The inferior sphincter relaxation time was longer for ICD patients (8.68 ± 2.95 vs. 5.73 ± 1.80 ; $p=0.04$). A significant correlation was observed between E' wave values and HF-FFT ($r^2=0.37$; $p=0.01$), between E' wave values and HF-AR ($r^2=0.38$; $p=0.01$), between sphincter relaxation time and HF-AR ($r^2=0.55$; $p=0.01$) and between sphincter relaxation time and LF-AR ($r^2=0.39$; $p=0.05$). Conclusion. HF values were significantly lower and LF values significantly higher in individuals with ICD than in normal controls, possibly due to predominantly sympathetic dysautonomia. E' wave values were significantly lower in ICD patients possibly due to minimal changes in diastolic function. In addition, the inferior sphincter relaxation time was significantly longer in subjects with ICD. Dysautonomia and functional changes of the left ventricle and esophagus may be dependent phenomena.

11:10-11:25	Modulatory effects of compounds [6]- and [10]-gingerol on acute renal failure Induced by polymicrobial sepsis Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues - Universidade Federal do Ceará
-------------	--

Modulatory effects of compounds [6]- and [10]-gingerol on acute renal failure Induced by polymicrobial sepsis

Rodrigues, F. A. P.¹; Medeiros, P. H. Q. S.¹; Cândido P.M. S.O¹; Prata, M. M.G¹; Pereira J.M.¹; Silva J.A.²; Havt, A¹

**Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Fortaleza-CE, Brazil¹;
Nucleus Pharmacy, Federal University of Sergipe, Lagarto-SE, Brazil² ;**

Acute renal failure (AFR) is one of the most complicated and critical complications during the sepsis, manifested by production of reactive oxygen species, glomerular and tubular changes, contributing to worsening of prognosis and reduction of survival. The phenolic compounds [6]-gingerol and [10]-gingerol are bioactive substances of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). These molecules have antioxidant and anti-inflammatory effects, which may be effective on renoprotection. This study investigated the modulatory effects of the compounds [6]- and [10]-gingerol on the renal damage triggered by cecal ligation and puncture (CLP) model. All methods were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Ceara, protocol 45/14. Male Wistar rats (180-210g) were divided into 6 groups. The control groups (Sham) were induced to false surgery, and subsequently treated with 2% Tween-80, or [6]- and [10]-gingerol (25 mg/kg); AFR groups were induced by CLP and subsequently treated with 2% Tween-80, [6]- or [10]-gingerol (25 mg/kg, intraperitoneal injection- i.p.). At the end of each treatment, blood, urine and kidneys were collected for analysis. The polymicrobial infection changed considerably the renal parameters compared to the control group. It decreased the glomerular filtration rate (GFR) ($P<0.0001$), urinary flow (UF) and GSH activity, whereas the levels of serum creatinine, urea, FENa, UP:Cr (urinary protein/urinary creatinine ratio), LDH, lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) and nitrite were enhanced ($P<0.05$). Relative expression of TNF- α and IL-1 β was also increased ($P<0.05$). These factors combined were able to trigger the kidney failure, which decreased the animals survival ($P<0.01$). The treatment with [6]-gingerol and [10]-gingerol at dose of 25mg/kg exerted protection on renal injury by sepsis, improving the previous parameters, such as preservation of GFR, UF and improved the GSH activity ($P<0.05$), as also decreasing serum creatinine, urea, FENa, PU:Cr and LDH ($P<0.01$). In addition, was showed a reduction in level of renal MDA and nitrite, beside of inhibition of relative expression of TNF- α and IL-1 β by [6]- and [10]-gingerol ($P<0.05$). Thus, improving kidney function and increased survival of animals. This study indicates that the [6]- and [10]-gingerol have nephroprotective effects in renal dysfunction, oxidative stress and pro-inflammatory cytokines on sepsis-induced AFR, providing a molecular basis for the clinical treatment and management of AFR septic.

ACUTE NEPHROTOXICITY INDUCED BY CISPLATIN IN C57BL/6 MICE

**Rodrigues, T.S.¹; Rodrigues, F.A.P.¹; Reyes, M. A. V.¹; Bessa, C.C.¹; Freitas, T.M.¹;
Cândido, P.M. S.¹; Pereira, J.M.¹; Havt, A¹**

**Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Fortaleza-CE,
Brazil¹**

Cisplatin is one of the most used drugs to treat solid tumors. However, its nephrotoxicity is a serious dose-limiting factor, affecting negatively its therapeutic use. Knowing the potential of cisplatin to trigger kidney injury, mainly through acute tubular necrosis. We aimed to investigate further the changes in kidney function using a model of acute nephrotoxicity induced by cisplatin in C57BL/6 mice. Male C57BL/6 mice were divided into 2 groups: control and nephrotoxicity group (n=8/group). The control group received sterile saline (NaCl 0.9%) by intraperitoneal injection (i.p.). Cisplatin at 25 mg/kg was administered i.p. in the nephrotoxicity group (CIS). Forty-eight hours after cisplatin or saline injection, mice were kept into metabolic cages for urine collection for 24 hours. Blood and kidneys were collected for analysis. We evaluated weight loss, kidney weight, urinary flow rate, and some biochemical parameters of renal function, such as creatinine, urea, electrolytes (sodium, potassium and chloride), and osmolality. The CIS group showed a significant loss of weight 72 hours after inducing kidney injury compared to control ($P=0.0101$). However, there were no significant change in kidney weight between the two groups. The first notorious change in renal function was a decline of the urinary flow rate ($P=0.0180$). Concerning the biochemical parameters, the serum creatinine and urea were increased ($P=0.0017$ and $P=0.0021$, respectively), and the creatinine clearance was extremely reduced ($P=0.0006$). Furthermore, the plasma osmolality was enhanced ($P=0.0178$) while the urine osmolality was extremely reduced ($P<0.0001$), resulting in a significantly reduced osmolar clearance ($P=0.0167$). Regarding the electrolytes, the levels of urinary sodium (Na^+) and potassium (K^+) were increased ($P=0.0070$, and $P=0.0140$, respectively). Conversely, the concentration of chloride (Cl^-) was significantly reduced in plasma ($P=0.0256$). In addition, the fraction of excretion of the three ions was enhanced (Na^+ , $P=0.0238$; K^+ , $P=0.0357$; Cl^- , $P=0.0238$). The failure in reabsorption of these ions might indicate an injury is happening mostly in tubular cells. These results imply cisplatin at 25 mg/kg is able to elicit serious acute kidney injury in C57BL/6 mice, and this pre-clinical model is going to be useful to investigate new substances to treat this problem.

EXTRA

Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth

**Richard L. Guerrant, A Havt, J Swann, J Mayneris-Perxachs, AM Leite, DT Bolick, RC Pinkerton,
MMG Prata, PHQS Medeiros, SR Moore, AAM Lima
UVa, UFC, Imperial College
Charlottesville, Fortaleza, London**

Critical to the design and assessment of interventions for enteropathy and its developmental consequences in children living in impoverished conditions are non-invasive biomarkers that can detect intestinal damage and predict its effects on growth and development. We assessed fecal and systemic biomarkers of enteropathy and growth predictors in 375 6-26 month-old children with varying degrees of malnutrition (stunting or wasting) in Northeast Brazil. 301 of these children returned for followup anthropometry after 2-6m. Stunting correlated with greater plasma IgA anti-LPS and anti-FliC, zonulin (if >12m old), and intestinal FABP (I-FABP, suggesting prior barrier disruption); and with citrulline, tryptophan and with lower serum amyloid A (SAA) (suggesting impaired defenses); while subsequent growth was worse in those with higher fecal MPO or A1AT. Subsequent growth impairment was also predicted by correlations with higher L/M, plasma LPS, I-FABP and SAA (showing intestinal barrier disruption and inflammation). Better growth was predicted in girls with higher plasma citrulline and in boys with higher plasma tryptophan. Interactions were also seen with fecal MPO and neopterin in predicting subsequent growth impairment.

Biomarkers clustered into markers of 1) functional intestinal barrier disruption and translocation, 2) structural intestinal barrier disruption and inflammation and 3) systemic inflammation. Principle components pathway analyses also showed that L/M with %L, I-FABP and MPO associate with impaired growth, while also (like MPO) associating with a systemic inflammation cluster of kynurenine, LBP, sCD14, SAA and K/T. Systemic evidence of LPS translocation associated with stunting, while markers of barrier disruption or repair (A1AT and Reg1 with low zonulin) associated with fecal MPO and neopterin. Furthermore, EAEC associated with increased MPO and Giardia infections associated with impaired subsequent growth.

Murine models show distinct microbiome and metabolic effects of diet and mimic further effects of Cryptosporidium, EAEC, ETEC and Campylobacter infections on key biomarkers of intestinal disruption and inflammation, and even suggest potentially protective microbiota.

We conclude that key noninvasive biomarkers of intestinal barrier disruption, LPS translocation and of intestinal and systemic inflammation can help elucidate how we recognize, understand, and assess effective interventions for enteropathy and its growth and developmental consequences in children in impoverished settings.