

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
LABORATÓRIO DE MORFOGÊNESE CELULAR
ESCOLA DE ENFERMAGEM ANNA NERY
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM MATERNO-INFANTIL
NÚCLEO DE PESQUISA EM SAÚDE DA CRIANÇA

MAUREEN MEIRA VIEIRA SOARES

Os efeitos da ampicilina nas células endoteliais humanas: um estudo experimental *in vitro* e as contribuições para o saber da enfermagem neonatal.

RIO DE JANEIRO

2016

Maureen Meira Vieira Soares

OS EFEITOS DA AMPICILINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS: um estudo experimental *in vitro* e as contribuições para o saber da Enfermagem Neonatal.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação e pesquisa em Enfermagem da Escola de Enfermagem Anna Nery da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para à obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jane Cristina de Oliveira Faria
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisa da Conceição Rodrigues

RIO DE JANEIRO

2016

S676e Soares, Maureen Meira Vieira
Os efeitos da ampicilina nas células endoteliais humanas: um estudo experimental in vitro e as contribuições para o saber da enfermagem neonatal. / Maureen Meira Vieira Soares. -- Rio de Janeiro, 2016.
94 f.

Orientadora: Jane Cristina de Oliveira Faria.
Coorientadora: Elisa da Conceição Rodrigues.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Enfermagem Anna Nery, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, 2016.

1. Enfermagem Neonatal. 2. Ampicilina. 3. Células Endoteliais . I. Faria, Jane Cristina de Oliveira, orient. II. Rodrigues, Elisa da Conceição , coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maureen Meira Vieira Soares

OS EFEITOS DA AMPICILINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS: um estudo experimental *in vitro* e as contribuições para o saber da Enfermagem Neonatal.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa em Enfermagem da Escola de Enfermagem Anna Nery da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Aprovada em 15 de Setembro de 2016

(Jane Cristina de Oliveira Faria, Doutora em Ciências Morfológicas, ICB/UFRJ)

(Elisa da Conceição Rodrigues, Doutora em Ciências, EEAN/UFRJ)

(Lys Eiras Cameron, Doutora em Enfermagem, EEAN/UFRJ)

(Fábio de Almeida Mendes, Doutor em Ciências Morfológicas, ICB/UFRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus.

“Todas as coisas foram feitas por Ele, e sem Ele nada do que foi feito se fez”
(João 1:3).

Dedico também aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar e correr atrás dos meus sonhos, e ao meu marido por todo o apoio oferecido. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre em primeiro lugar, agradeço por tudo que me proporcionou viver e aprender.

Aos meus pais, Mauro dos Santos Soares (em memória) e Marilene Meira Vieira Soares, e irmã, Raquel Meira Vieira Soares, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu marido, Jonathas da Silva Borges, por todo apoio e compreensão com meus estudos.

A minha querida orientadora, professora Dr^a. Jane Cristina de Oliveira Faria, por ter me iniciado na ciência, e apesar das dificuldades sempre se mostrou disponível.

Agradeço em colaboração e co-orientação à professora Dr^a. Elisa da Conceição Rodrigues.

Ao professor Dr. Cosme Ferreira da Ponte Neto na modelagem matemática utilizada no trabalho, bem como toda a parte estatística.

A todos do Laboratório de Morfogênese Celular, em especial ao Prof. Titular Vivaldo Moura Neto, pelo apoio científico e a Bióloga Rosenilde Holanda pela ajuda preciosa.

À Professora Dra. Verônica Morandi, pela cessão de culturas celulares de HUVEC.

À Professora Dr.^a Christina Maeda Takiya na interpretação dos resultados.

À Bióloga Grasiella Maria Ventura Matioszek na utilização do microscópio confocal.

Aos demais familiares, avós, tios e primos

A todos os professores da Escola de Enfermagem Anna Nery da UFRJ, que contribuíram ao longo desses anos, por meio das disciplinas e debates, para o meu desenvolvimento e crescimento profissional.

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio.

Obrigada a todos, eu não teria conseguido sozinha!

***"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em
coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o
amam" (1 Coríntios 2:9).***

RESUMO

SOARES, Maureen Meira Vieira Soares. **Os efeitos da ampicilina nas células endoteliais humanas**: um estudo experimental *in vitro* e as contribuições para o saber da Enfermagem Neonatal. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem Anna Nery, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A terapia por infusão é o principal acesso para medicamentos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Observamos, no dia a dia, que muitos recém-nascidos que são submetidos à terapia intravenosa periférica, para uso de antibióticos, sofrem várias intercorrências como flebites e infiltrações, além da necessidade de múltiplas punções. Entre os antibióticos endovenosos mais utilizados nas UTIN está a ampicilina, sobre o qual ainda existem várias lacunas de conhecimento a respeito da segurança e farmacocinética para serem elucidados, principalmente no contexto neonatal. O pH e a osmolaridade das soluções são alguns dos fatores que podem determinar esse processo de lesão celular. Este trabalho tem por objetivo avaliar a ação do antimicrobiano ampicilina e os seus efeitos nas células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), *in vitro*. Foram realizadas análises da morfologia e da citologia das HUVEC, após cultura, em diferentes dosagens e diluições de ampicilina, assim como o estudo das proteínas de matriz extracelular (MEC), Fibronectina, Colágeno IV e Laminina, responsáveis pela adesão celular. Os resultados demonstram que as células HUVEC em cultura sofrem alterações morfológicas que podem ser visualizadas a partir da concentração de 28mg/mL de ampicilina e acima da concentração de 60mg/mL, o número de células HUVEC diminuiu abruptamente, sugerindo que o medicamento atua como um potente causador de injúria celular. As HUVEC quando em contato com a ampicilina diminuem a produção das proteínas Fibronectina, Colágeno IV e Laminina, com modificação da distribuição da MEC, interferindo na adesão celular, o que pode levar ao entendimento do processo de desgaste da rede venosa observado nos recém-nascidos que utilizam esse antimicrobiano por via periférica.

ABSTRACT

SOARES, Maureen Meira Vieira Soares. **Os efeitos da ampicilina nas células endoteliais humanas**: um estudo experimental in vitro e as contribuições para o saber da Enfermagem Neonatal. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem Anna Nery, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Intravenous Therapy (TIV) is the main access to medication in neonatal Intensive Care Units. It is possible to notice in day-to-day care that several newborns that are submitted to peripheral TIV when using antibiotics experience phlebitis and infiltrations. Besides, they need multiple punctures. Among intravenous antibiotics most used in neonatal Intensive Care Units is ampicillin, which there are still many gaps in knowledge about the safety and pharmacokinetics to be elucidated, especially in the neonatal context. Both pH and osmolarity of the solutions are some of the determiners for the cell lesion process. This paper aims to evaluate of the antimicrobial ampicillin and its effects in the endothelial cells of the umbilical chord (HUVEC) in vitro. Several analyses of HUVEC morphology and cytology have been fulfilled after collected in different dosages and dilutions of ampicillin as well as the study of extracellular matrix (ECM) proteins, Fibronectin, Collagen IV and Laminin, which are responsible for cell adhesion. The results shows the HUVEC cells in culture have suffered morphological changes that may be visualized as of 28mg/mL concentration of ampicillin and above 60mg/mL concentration, the number of HUVEC cells gets suddenly down, which brings the idea that such medication acts as a powerful causative agent of cell injury. When in contact with ampicillin, HUVEC cut down the production of proteins, such as fibronectin, collagen IV and laminin, with modification of ECM, interfering in cell adhesion, which can lead to the understanding of the venous network wear process observed in newborns using this antimicrobial by peripheral route.

LISTA DE ESQUEMA, FIGURAS, GRÁFICOS, QUADRO E TABELAS

Esquema 1 - Esquema dos fatores envolvidos no procedimento de Punção Venosa Periférica.

Figura 1 - Ilustração das etapas da Integração Básico-Clínica.

Figura 2 - Eventos Adversos da Terapia Intravenosa Periférica

Figura 3 - Fórmula Estrutural da Ampicilina

Figura 4 - Imagem ilustrativa da camada íntima da veia.

Figura 5 - Avaliação morfológica em concentrações crescentes de ampicilina.

Figura 6 - Avaliação histológica em concentrações crescentes de ampicilina.

Figura 7 - Análise da distribuição de Fibronectina nas células HUVEC.

Figura 8 - Análise da distribuição de Colágeno IV nas células HUVEC.

Figura 9 - Análise da distribuição de Laminina nas células HUVEC.

Gráfico 1 - Quantificação de adesão das células HUVEC visualizadas por microscopia de contraste de fase no grupo controle e nas concentrações de 07, 14, 21, 28, 40, 60, 80 e 100mg/mL de ampicilina por 30 minutos.

Gráfico 2 - Densitometria de fluorescência da glicoproteína de matriz extracelular Fibronectina do controle e células do grupo tratado com concentrações de 40 e 80mg/mL do antimicrobiano ampicilina por 30 minutos.

Gráfico 3 - Densitometria de fluorescência da proteína de matriz extracelular e membrana basal Colágeno IV do controle e células do grupo tratado com concentrações de 28 e 60mg/mL do antimicrobiano ampicilina por 30 minutos.

Gráfico 4 - Densitometria de fluorescência da glicoproteína de matriz extracelular Laminina do controle e células do grupo tratado com concentrações de 21 e 100mg/mL do antimicrobiano ampicilina por 30 minutos.

Gráfico 5 - Avaliação da viabilidade das HUVEC por modelagem matemática.

Gráfico 6 - Quantificação das HUVEC por modelagem matemática.

Quadro 1 - Relação dos descritores utilizados nas estratégias de busca nas bases de dados.

Quadro 2 - Estudos que analisaram, *in vitro*, os efeitos de antibióticos em células endoteliais, selecionados para a revisão integrativa, de acordo com os critérios de inclusão.

Quadro 3 - Resumo dos fatores investigados nos estudos e suas funções.

Quadro 4 - Relação dos efeitos encontrados, *in vitro*, nas células endoteliais, de acordo com a metodologia e os antibióticos utilizados. Antibióticos com baixo potencial citotóxico.

Quadro 5 - Relação dos efeitos encontrados, *in vitro*, nas células endoteliais, de acordo com a metodologia e os antibióticos utilizados. Antibióticos com médio potencial citotóxico.

Quadro 6 - Relação dos efeitos encontrados, *in vitro*, nas células endoteliais, de acordo com a metodologia e os antibióticos utilizados. Antibióticos com alto potencial citotóxico.

Tabela 1 - Intervalo das doses de Ampicilina de acordo com a Idade Gestacional e Pós-Natal.

LISTA DE SIGLAS

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês Bovine Serum Albumin
DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate
HUVEC - Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana, do inglês Human Umbilical Venous Endothelial Cells
IV – Intravenosa
LABANGIO - Laboratório da Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês Low Density Lipoprotein
LMC - Laboratório de Morfogênese Celular
M199 - Meio de cultura 199
MEC - Matriz Extracelular
MTT - 3-(4,5 dimetiliazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazólio brometo)
NUPESC - Núcleo de Pesquisa da Saúde da Criança
PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato
PF - Paraformaldeído
PDGF - Fator de Crescimento Placentário, do inglês Placenta-Derived Growth Factor
SDS-PAGE – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB - Soro Fetal Bovino
TBS-T – Tampão Tris, do inglês tris buffer solution
TNF – Fator de Necrose Tumoral, do inglês, Tumor Necrosis Factor
TIV - Terapia Intravenosa
UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular, do inglês *Vascular Endothelial Growth*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	EVENTOS ADVERSOS NA TERAPIA INTRAVENOSA NEONATAL	15
1.2	SEGURANÇA DO PACIENTE NA TERAPIA INTRAVENOSA	16
1.3	APROXIMAÇÃO COM O TEMA	17
1.4	PROBLEMA DE PESQUISA	18
1.5	OBJETO DE ESTUDO	18
1.6	HIPÓTESE	18
1.6.1	Variável dependente	19
1.6.2	Variáveis independente	19
1.7	JUSTIFICATIVA	19
1.7.1	Estudos anteriores	19
1.7.2	Integração básico-clínica	20
1.7.3	Relevância e contribuições	22
1.8	OBJETIVOS.....	22
1.8.1	Geral	22
1.8.2	Específicos	22
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	EVENTOS ADVERSOS DA TERAPIA INTRAVENOSA PERIFÉRICA	24
2.2	AMPICILINA	25
2.3	O ENDOTÉLIO VASCULAR	29
3	EVIDÊNCIAS ATUAIS	31
3.1	CÉLULAS ENDOTELIAIS	35
3.2	METODOLOGIA APLICADA NOS ESTUDOS	36
3.3	ANTIBIÓTICOS	41
4	METODOLOGIA	48
4.1	DELINEAMENTO METODOLÓGICO.....	48
4.2	LOCAL DO ESTUDO E COLABORADORES	48
4.3	DINÂMICA	48
4.3.1	Cultura de Células Endoteliais de Veia De Cordão Umbilical Humano (HUVEC)	48
4.3.1.1	MEIO DE CULTURA	49

4.3.1.2	PLAQUEAMENTO	49
4.3.2	Padronização de doses e diluições da ampicilina	50
4.3.2.1	RECONSTITUIÇÃO	50
4.3.2.2	DILUIÇÃO	51
4.3.3	Análise morfológica das células endoteliais	51
4.3.4	Análise histológica das células endoteliais.....	52
4.3.5	Quantificação de adesão das células HUVEC	52
4.3.6	Análise de matriz extracelular das células HUVEC por técnica de imunocitoquímica (células do grupo controle e células do grupo tratado com ampicilina)	53
4.3.7	Densitometria por fluorescência	53
4.3.8	Modelo Matemático	53
4.3.9	Análise estatística	54
4.4	QUESTÕES ÉTICAS	54
4.4.1	Riscos e benefícios	55
5	RESULTADOS	57
5.1	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS HUVEC.....	57
5.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS CÉLULAS HUVEC	59
5.3	QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS HUVEC	60
5.4	ANÁLISE DE MATRIZ EXTRACELULAR DAS CÉLULAS HUVEC POR TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (CÉLULAS DO GRUPO CONTROLE E CÉLULAS DO GRUPO TRATADO COM AMPICILINA)	61
5.5	DENSITOMETRIA POR FLUORESCÊNCIA	65
5.5.1	Fibronectina	65
5.5.2	Colágeno IV	66
5.5.3	Laminina	67
5.6	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIABILIDADE COM A QUANTIFICAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DE MODELAGEM MATEMÁTICA	68

6 DISCUSSÃO	71
6.1 IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA DE ENFERMAGEM NEONATAL	74
7 CONCLUSÃO	76
PERSPECTIVAS FUTURAS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

As Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) contam com uma evolução farmacêutica e tecnológica significativa nos dias atuais. Junto com a especialização e qualificação profissional, têm promovido uma maior sobrevivência dos recém-nascidos (RN) pré-termo, de idades gestacionais cada vez menores. No entanto, o tempo de internação tem sido maior, o que acarreta no aumento de infecções, do uso de medicações, em especial os antibióticos endovenosos (BRASIL, 2011).

Entre os antibióticos endovenosos mais utilizados nas UTIN está a ampicilina, sobre a qual existem várias lacunas de conhecimento sobre segurança e farmacocinética para serem elucidados, principalmente no contexto neonatal. A administração desses antibióticos no RN se dá prioritariamente pela via intravenosa, a qual apresenta eventos adversos importantes, que necessitam de estudos para a diminuição de seus agravos (BRASIL, 2011; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014).

Eventos adversos identificados na prática clínica da Enfermagem, devem ser estudados a fim de serem solucionados ou amenizados. Para isso, existem diversas formas de pesquisa, entre elas, uma pouco utilizada pela Enfermagem brasileira – a pesquisa básica experimental *in vitro* – que constitui o alicerce para o delineamento da pesquisa clínica em seres humanos e favorece a inovação tecnológica do país, além de promover mudanças reais para prática profissional (BASTOS, 2013).

A presente pesquisa é desenvolvida como proposta a Integração Básico-Clinica, ou seja, analisar os problemas oriundos da prática clínica no laboratório de pesquisa básica, resgatando assim, conceitos de anatomia, fisiologia, microbiologia, histologia, entre outras, que fundamentam todo o cuidado em saúde.

As pesquisas básicas constituem alicerce para o delineamento da pesquisa clínica, minimizando riscos à vida humana (BASTOS 2013). Neste estudo, problemas identificados durante a prática da Enfermagem, relacionados à administração parenteral de antibióticos através da Punção Venosa Periférica (PVP) em RN foram simulados *in vitro*, permitindo o estudo dos eventos adversos que ocorrem em decorrência deste procedimento.

1.1 EVENTOS ADVERSOS NA TERAPIA INTRAVENOSA NEONATAL

A terapia intravenosa é um procedimento amplamente utilizado em unidades de saúde. Esta prática apresenta muitas vantagens pois permite a infusão de grandes volumes de fluidos em comparação com outras vias, com biodisponibilidade completa e rápida de fármacos. No entanto, apresenta eventos adversos como flebite, dor, extravasamento, infiltração, resultando no aumento da morbidade e mortalidade (ABOLFOTOUH *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Destes, a infiltração, que é a administração inadvertida de uma solução no tecido adjacente, fora da luz do vaso (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014), é o de maior incidência na terapia intravenosa em RN como mostraram Alves (2009) e Batalha *et al.* (2010), com 18,96% e 32,2% respectivamente.

Os eventos adversos da Terapia Intravenosa levam à múltiplas punções durante o período de internação acarretando dor nos RN, lesão tecidual, alto consumo de trabalho e tempo da equipe de Enfermagem (PEDREIRA, 2004), além do alto custo da inserção de cateteres intravenosos periféricos, devido ao material e mão de obra utilizados (GOFF, 2013). Em 1993, Bohony mostrou que dois terços do tempo de tratamento dos pacientes eram usados pela equipe de Enfermagem para a terapia intravenosa. Vinte anos depois, Goff *et al.* (2013) registrou resultados semelhantes, onde 28% do tempo gasto pela equipe de Enfermagem era com três ou mais tentativas de punção venosa em RN. Os dados de Alves (2009) apontam a média de 5,87 inserções de cateter venoso periférico por criança, por internação, trazendo uma realidade clínica que ainda requer investimento em pesquisas para sua qualificação.

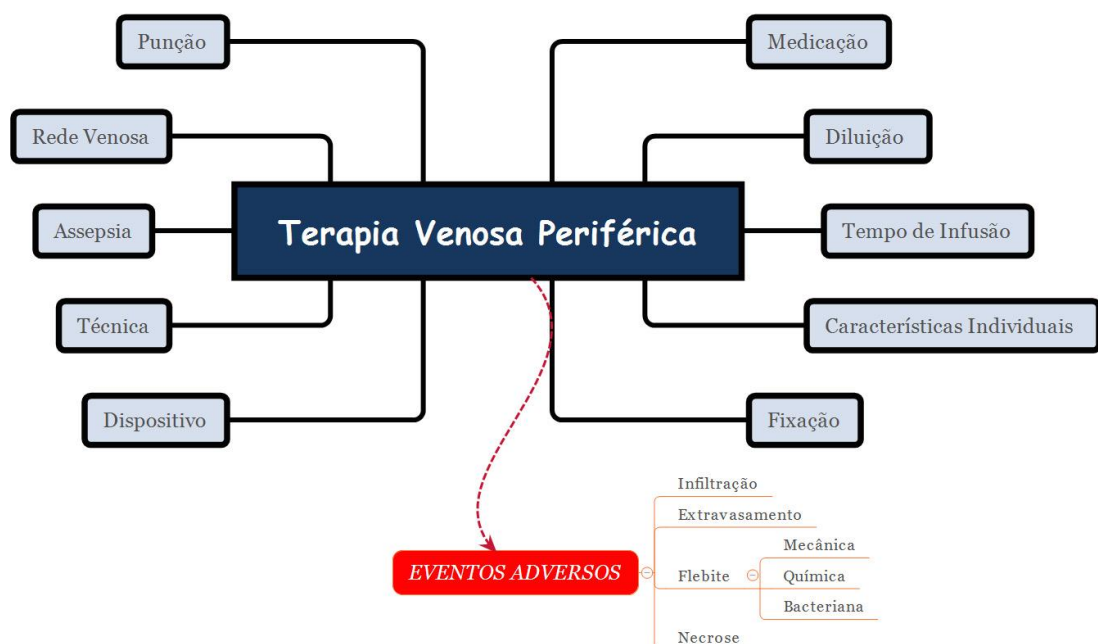
Várias medicações utilizadas na Pediatria podem levar a lesões teciduais importantes relacionadas às suas propriedades físicas e/ou biológicas (CLARK *et al.*, 2013). A administração de antibióticos aumenta os riscos dos eventos adversos da TIV, além dos fatores inerentes ao RN como a prematuridade e o baixo peso ao nascimento (WALLIS *et al.*, 2014).

Na Austrália e Nova Zelândia, 92% das 26 UTIN declararam ter tido um incidente de extravasamento significativo da infusão venosa, com complicações graves e/ou fatais pelo uso dos cateteres de inserção central ou periférico (RESTIEAUX *et al.*, 2013).

A PVP é um procedimento complexo e desafiador, principalmente quando se trata de RN. Exige conhecimentos técnico-científicos e ético-legais inerentes ao saber e ao fazer da Enfermagem na UTIN. Envolve vários fatores para seu sucesso, desde a técnica, escolha do vaso sanguíneo, assepsia, dispositivo, fixação, até a diluição correta, características do medicamento e do indivíduo, e tempo de infusão (CARDOSO *et. al.*, 2011).

Esquema 1

Esquema dos fatores envolvidos no procedimento de Punção Venosa Periférica.



Fonte: Arquivo Pessoal.

1.2 SEGURANÇA DO PACIENTE NA TERAPIA INTRAVENOSA

O paciente deve ter sua segurança garantida nos serviços de saúde. A segurança do paciente na terapia intravenosa vai além da administração de medicação e da técnica correta. As soluções parenterais precisam de todo um cuidado para que sua integridade, qualidade e segurança sejam garantidos. Para isso, normas foram estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução RDC nº45 de 2003, devendo ser seguidas na aquisição,

recebimento, armazenamento, distribuição, dispensação, preparação e administração dessas substâncias.

Cabe ao profissional de Enfermagem o cumprimento dessas normas além de habilidade técnica e o conhecimento científico para a terapia intravenosa, com registro e divulgação de desvios de qualidade em qualquer etapa da utilização das soluções parenterais. O Enfermeiro responsável pela terapia intravenosa deve ter competência e conhecimento prévio sobre o procedimento, atentando para as características anatômicas, limite de dose e volume de acordo com idade, peso e características fisiológicas dos neonatos, ação e interação medicamentosa. Também deve promover conforto e redução de dor (INFUSION NURSES SOCIETY, 2011).

Uma forma de mensurar a qualidade de um serviço de saúde prestado está no uso de indicadores, comparando-o com referenciais adequados e o impacto gerado. Um dos indicadores de qualidade da assistência de Enfermagem encontra-se na terapia intravenosa, que pode ser quantificado pela taxa de infiltração do cateter intravenoso periférico (AMERICAN NURSES ASSOCIATION - ANA, 2007).

1.3 APROXIMAÇÃO COM O TEMA

Durante a graduação em Enfermagem e Obstetrícia pela Escola de Enfermagem Anna Nery (EEAN), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), desenvolvi atividade de Iniciação Científica com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) no projeto “Lesões endoteliais por infusão de antibióticos em recém-nascidos: um estudo experimental”, coordenado pela Professora Dr.^a Jane Cristina de Oliveira Faria e desenvolvido no Laboratório de Morfogênese Celular, do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ, em parceria com a Professora Dr.^a Elisa da Conceição Rodrigues do Núcleo de Pesquisa de Enfermagem em Saúde da Criança, do Departamento de Enfermagem Materno Infantil – EEAN/UFRJ.

Esta dissertação dá prosseguimento às pesquisas realizadas enquanto bolsista de Iniciação Científica, que culminaram no meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), o qual teve resultados promissores e recebeu o 1º lugar no Prêmio Dulce Neves da Rocha, oferecido aos melhores Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação em Enfermagem, referente ao primeiro semestre de 2013, na área de

Saúde da Criança, Núcleo de Pesquisa de Enfermagem em Saúde da Criança e do Adolescente (NUPESC) - EEAN/ UFRJ.

Resumidamente, o TCC apresentou como resultado a diminuição da viabilidade celular após o contato das células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) com o antibiótico ampicilina acima de 2 horas de exposição. Em relação a Matriz Extracelular (MEC), estrutura que fica ao redor da célula endotelial exercendo vários papéis, como o de proteção e adesão celular, as proteínas Laminina (LN), Fibronectina (FN) e Tenascina (TN) presentes nessa matriz, quando em contato com a ampicilina apresentaram alterações importantes na sua organização, com diminuição das interações celulares e da ancoragem apropriada da célula endotelial, provocando desadesão das células e destruição do endotélio (SOARES, 2013).

1.4 PROBLEMA DE PESQUISA

Eventos adversos da Terapia Intravenosa Periférica geram danos no endotélio vascular como consequência do uso de antibióticos, em especial a ampicilina, e demais fármacos em recém-nascidos caracterizados por flebite, infiltração, extravasamento, necrose dos vasos e tecidos adjacentes.

1.5 OBJETO DE ESTUDO

Células endoteliais (HUVEC) antes e após o contato, *in vitro*, com o antimicrobiano ampicilina.

1.6 HIPÓTESE

A exposição das células endoteliais à ampicilina produz uma desorganização dos elementos de adesão da MEC e na morfologia das células de forma dose-dependente.

1.6.1 Variável dependente

As variáveis previstas, compreendidas e explicadas do tratamento das células endoteliais antes e após o contato com a ampicilina foram: a desorganização dos elementos de adesão da matriz extracelular e as alterações morfológicas das células endoteliais.

1.6.2 Variáveis independentes

A concentração de ampicilina e o tempo de exposição das células endoteliais ao antibiótico foram as variáveis controladas durante os experimentos.

1.7 JUSTIFICATIVA

1.7.1 Estudos anteriores

Pesquisa realizada por Soares (2013) avaliou a resposta celular endotelial após tratamento com ampicilina em diferentes concentrações, e analisou a organização da MEC da célula endotelial, após tratamento, com especial atenção para LN, FN e TN, como elementos importantes de adesão celular.

Os resultados, apontaram que as HUVEC não tratadas com o antimicrobiano ampicilina apresentam-se com formato de fuso, unidas uma as outras e entrelaçadas pelas proteínas da MEC, LN, FN, TN, as HUVEC tratadas com o antibiótico ampicilina apresentaram alteração em sua morfologia e uma diminuição abrupta do número por campo e uma escassa MEC.

Esses dados foram evidenciados após 2 horas de experimento, em uma concentração de 60mg/ml de ampicilina, mas os danos celulares foram de tamanha intensidade que não foi possível visualizar o processo da lesão, apenas a citotoxicidade evidenciadas pela diminuição de números de células aderidas umas as outras. Isso levou às seguintes questões: Essas células foram induzidas à apoptose, morte celular programada, por terem suas estruturas de adesão prejudicadas, levando-as a desadesão? Ou sofreram necrose, morte celular não programada em resposta a uma injúria massiva? Estes questionamentos levaram à necessidade de analisar o que acontece antes dessas 2 horas de experimento.

Nesse contexto, os objetivos do TCC (SOARES, 2013) foram mantidos e ampliados, dando prosseguimento com a atual dissertação de mestrado.

Os resultados encontrados até o momento estimulam a realização de novas pesquisas, uma vez que ao entendermos o processo de lesão endotelial, poder-se-á propor novos estudos na área básica *in vitro*, posteriormente *in vivo*, até que possamos propor uma ação específica que reduza esses eventos adversos da terapia intravenosa periférica por infusão de ampicilina que afetam diretamente o trabalho da Enfermagem. Além disso, se eficaz, a metodologia desse estudo poderá ser reproduzida em outros medicamentos que são infundidos por essa via de administração, tanto para os antimicrobianos, quanto aos demais fármacos.

Essa pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da EEAN/HESFA em 30 de março de 2010 – Protocolo nº 024/2010, CAAE – 0008.0.226.000-10 (anexo A).

1.7.2 Integração básico-clínica

No campo das Ciências da Enfermagem, a produção de conhecimento tem avançado com o objetivo de melhorar a qualidade de vida da população, promover a saúde e um cuidado de Enfermagem seguro. Por outro lado, os estudos e pesquisas, em Enfermagem, além de fortalecerem o conhecimento específico da área, vêm contribuindo para avanços na área da Saúde como um todo, à medida que produzem conhecimento, em associação com os outros campos do saber.

Integrar grupos de pesquisa básica com grupos de pesquisa clínica, o que se denomina pesquisa translacional, no seu original em inglês, *translational research*, tem como objetivo traduzir as descobertas básicas do laboratório em aplicações práticas para a clínica, rompendo o vácuo entre essas duas pesquisas (BAKKEN, 2006). O enfermeiro habilitado no desenvolvimento da pesquisa experimental, fundamentada no conhecimento das ciências básicas, pode oferecer importantes contribuições em diferentes áreas de aplicação dos resultados da investigação.



Figura 1. Ilustração das etapas da Integração Básico-Clínica. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Ensaio *in vitro* e *in vivo* proporcionam o desenvolvimento de novos medicamentos, técnicas de diagnóstico, procedimentos, como também, favorecem o estudo das hipóteses estabelecidas na fase clínica da pesquisa. A experimentação se baseia nas disciplinas básicas como Fisiologia, Anatomia, Microbiologia, tendo forte relação com o modelo biomédico, que valoriza mais o tecnicismo durante a assistência que os aspectos específicos e emocionais dos clientes, o que pode ser a explicação para o baixo número de pesquisas básicas na Enfermagem Brasileira (BASTOS, 2013).

Assim, os problemas identificados na prática clínica de Enfermagem podem ser levados à pesquisa experimental *in vitro* e vice e versa, o que simula situações reais em laboratório, seguido de experimentos *in vivo*, com animais. Esses são chamados ensaios pré-clínicos. Os resultados dessas etapas, se satisfatórios nos testes toxicológicos e de segurança, seguem para ensaios clínicos, e posteriormente, podem exercer mudança “à beira do leito”.

1.7.3 Relevância e contribuições

- Assistência: levantamento de novos saberes na área da Enfermagem Neonatal e áreas afins com desenvolvimento de novas tecnologias na área da Terapia Intravenosa Neonatal, para a qualificação da assistência.
- Ensino: levantamento de dados relativos a Terapia Intravenosa no RN que possam ser levados ao ensino da Enfermagem e áreas afins para discussões nos cursos de Graduação e Pós-Graduação.
- Pesquisa: levantamento de dados inéditos sobre a ampicilina, com o intuito de gerar novas tecnologias e/ou mudança na prática clínica. Este trabalho contribuirá com novos saberes na área da terapia intravenosa periférica, estimulando novos estudos para a articulação com a prática clínica da Enfermagem Neonatal e áreas afins.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Geral

- Avaliar a ação do antimicrobiano ampicilina e seus efeitos nas células endoteliais humanas, *in vitro*.

1.8.2. Específicos

- Analisar a morfologia das células endoteliais antes e após o tratamento com o antibiótico ampicilina em diferentes concentrações.
- Analisar a organização da matriz extracelular (MEC) da célula endotelial, após tratamento com ampicilina, com especial atenção para as glicoproteínas Fibronectina e Laminina, além do Colágeno IV como elementos importantes de adesão celular.
- Refletir sobre as implicações deste estudo na prática clínica da Enfermagem Neonatal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os avanços na área farmacêutica e tecnológica ocorridos nas últimas décadas contribuíram para o aumento da sobrevivência do RN. No entanto, outros problemas surgiram, como o aumento das taxas de infecção hospitalar, especialmente as bacterianas, tornando-se fatores limitantes na sobrevivência desses RN. A mortalidade neonatal é responsável por aproximadamente 70% das mortes no primeiro ano de vida, sendo o cuidado adequado no período da gestação, no momento do parto e ao RN, um desafio para a redução desses índices de mortalidade infantil no Brasil (BRASIL, 2011).

As principais formas de contaminação ou infecção dos RN podem ocorrer intra-útero, nos casos de ruptura prematura de membrana, trabalho de parto prematuro, cerclagem e infecção urinária, por exemplo. Ou após o nascimento, por contato direto dos profissionais de saúde e familiares e indireto através de objetos como o termômetro e o estetoscópio. Além dos fatores inerentes ao próprio RN, tais como a defesa imunológica humoral e celular diminuída, a necessidade de procedimentos invasivos, os quais aumentam conforme o nível de prematuridade, o peso ao nascer, estima-se que a cada 100g a menos de peso de nascimento, o risco de infecção hospitalar aumenta 9% (BRASIL, 2011; PERLMAN *et al.*, 2007).

As infecções são classificadas de acordo com o Ministério da Saúde (2011) em precoce, quando ocorre durante as primeiras 48 horas de vida, e tardia, após 48 horas de vida, demandando tratamento antibacteriano. No caso da infecção precoce está indicado o uso de penicilina ou ampicilina associada a aminoglicosídeos (em geral a gentamicina), e para infecções tardias, a oxacilina associada à amicacina (BRASIL, 2011; SIVANANDAN *et al.*, 2011).

A escolha dos antibióticos adequados nas UTIN depende dos organismos e do padrão de sensibilidade aos antibióticos prevalentes em cada lugar. No Brasil, um país em desenvolvimento, bactérias Gram-negativas e *Staphylococcus aureus* ainda são os principais agentes de contaminação dos hospitais, responsáveis pelas infecções tardias (URZEDO *et al.*, 2014).

2.1 EVENTOS ADVERSOS DA TERAPIA INTRAVENOSA PERIFÉRICA

Os eventos adversos são definidos como lesões não intencionais, causadas por tratamento médico, tendo como resultado uma incapacidade mensurável (LEAPE *et al.*, 1991). Na terapia Intravenosa Periférica temos inúmeros eventos adversos já citados na literatura, relacionados ao cateter venoso periférico, à sua fixação e as medicações infundidas. São eles: a flebite, infiltração, oclusão, remoção acidental, lesões cutâneas, perda da função do membro, necrose, amputação dos membros e morte (WALLIS *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2013; MODES *et al.*, 2011; BATALHA *et al.*, 2010).

A flebite, inflamação da veia por irritação química ou mecânica, caracteriza-se por eritema com ou sem presença de dor, formação de estria e cordão palpável. A infiltração ocorre quando uma solução ou medicamento não-vesicante é administrado no tecido circunvizinho ao vaso sanguíneo, devido o deslocamento ou transfixação da parede da veia e caracteriza-se pelo edema com excesso de líquido no tecido adjacente. Já o extravasamento pode ocorrer pelo mesmo motivo da infiltração, no entanto, nesse caso a solução administrada é vesicante, acarretando no vaso e tecido circunvizinho, lesão que vai desde formação de vesículas e inflamação, até a necrose dos tecidos (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2014).



Figura 2. Eventos Adversos da Terapia Intravenosa Periférica. **A.** Infiltração, **B.** Flebite
C. Extravasamento, **D.** Necrose. **Fonte:** Google Imagens

Vários fatores estão envolvidos no sucesso da punção venosa periférica e no aparecimento de eventos adversos. São eles:

- Tamanho do cateter: quanto maior o calibre, maior ocorrência de flebite e quanto menor, maior remoção acidental do cateter (WALLIS *et al.*, 2014).
- Tipo de medicações: os antibióticos estão significativamente associados com a flebite e a oclusão (WALLIS *et al.*, 2014).
- Idade: quanto mais jovem maior o risco de flebite (WALLIS *et al.*, 2014), e maior dificuldade de punção. No estudo de Reigart *et al.* (2012), de 592 participantes da pesquisa, 300 (50,1%) correspondiam ao grupo infantil com idades de zero a dois anos. Destes, apenas 38,9% tiveram um acesso venoso puncionado na primeira tentativa. Nos demais grupos, pré-escolar (n=75), escolar (n=94) e adolescentes (n=123), a obtenção do acesso venoso na primeira tentativa for de 52%, 58,5% e 52,9% respectivamente. O grupo infantil foi o grupo com a obtenção de acesso venoso, na primeira tentativa com menor sucesso, mas os demais grupos também tiveram dificuldade, até com a idade mais avançada, nos casos dos adolescentes.

2.2 AMPICILINA

Alexander Fleming, em 1928, por um descuido, deixou aberta sua placa de cultura com *Staphylococcus aureus* e observou que com isso, apareceu nela uma massa branca, posteriormente identificada como uma colônia de fungo do gênero *Penicillium*. Essa colônia provocou a lise dos *Staphylococcus aureus* apresentando assim sua função antibacteriana (RAO *et al.*, 2011; FLEMING, 1929). Com essa descoberta inicial, vários estudos foram realizados até o desenvolvimento de novos antibióticos naturais e sintéticos capazes de inibir o crescimento e/ou causar a morte de bactérias.

A ampicilina foi o primeiro antibiótico semissintético produzido a partir da penicilina e tem efetividade contra organismos gram-negativos e gram-positivos, pertencente à classe das aminopenicilinas (ACRED, 1962). É um antibiótico amplamente utilizado para tratar infecções neonatais (KUPPALA *et al.*, 2011; ALEXANDER *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2011). Apesar de ser considerada de baixo

risco para lesões segundo Clark *et al.* (2013), há evidências na literatura de lesões permanentes após sua utilização (BORMAN *et al.*, 1998).

Todos os antibióticos β -lactâmicos, como a ampicilina, são bactericidas, pois apresentam como mecanismo de ação a inibição irreversível da enzima transpetidase. A transpetidase leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas, conferindo proteção através da rigidez da parede celular. O anel β -lactâmico é fundido em outro anel de cinco ou seis membros, dependendo do antibiótico, penicilinas ou cefalosporinas, e juntos mimetizam o resíduo terminal da cadeia peptídica, prejudicando a formação de peptidoglicana que compõe a parede celular (KREIMER, 2005).

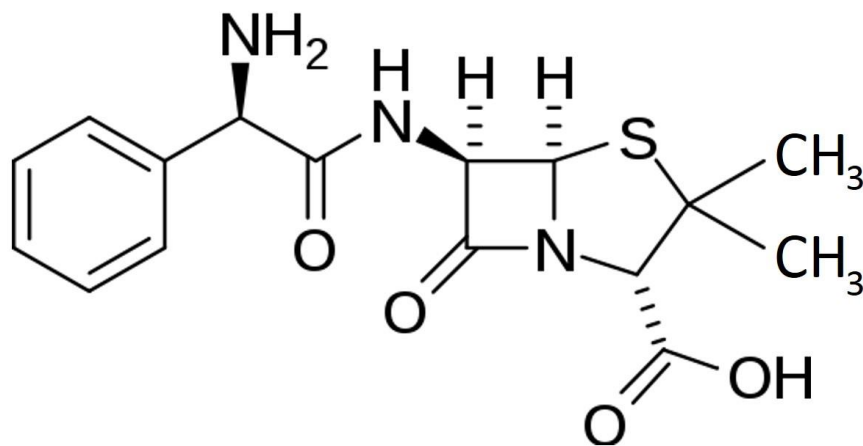


Figura 3. Fórmula Estrutural da Ampicilina **Fonte:** Farmacopeia Brasileira, 2010.

A dosagem de ampicilina para neonatos recomendado para a prática clínica, de acordo com Neofax (REUTERS, 2011), é de 25 a 50mg/Kg por dose intravenosa. A dose máxima de utilização é de 150 a 200 mg/kg para bacteremia e de 300 a 400 mg/kg para meningites. O intervalo entre as doses deve obedecer ao exposto na Tabela 1.

Tabela 1

Intervalo das doses de Ampicilina de acordo com a Idade Gestacional e Pós-Natal.

Idade Gestacional (semanas)	Idade Pós-Natal (dias)	Intervalo (horas)
≤ 29	0 a 28	12
	> 28	8
30 a 36	0 a 14	12
	> 14	8
37 a 44	0 a 7	12
	> 7	8
≥ 45	-	6

Fonte: NEOFAX (REUTERS, 2011).

A Tabela 1 foi elaborada para que os intervalos entre as doses fossem adequados às funções renais e eliminação de drogas dos neonatos, que estão fortemente relacionadas com a idade pós-menstrual (equivalente à idade gestacional) mais a Idade pós-natal. Exemplo de aplicação da tabela: Um bebê nasceu com 28 semanas e tem agora 21 dias de idade. No momento ele se encontra na coluna de 30 a 36 semanas gestacional, pois está a 31 semanas de idade pós-menstrual equivalente a idade gestacional. O intervalo entre as doses dele será de 8 horas (> 14 dias de idade pós-natal).

A Ampicilina injetável é encontrada na apresentação frasco-ampola contendo 500 ou 1000 mg. Para a utilização em neonatos, reconstitui-se com 5ml de água destilada e dilui-se em Soro Fisiológico ou Glicosado a 5%. A solução final para administração intravenosa direta não deve exceder a concentração de 100mg/ml e deve ser infundida de 3 a 5 minutos, em bolus, ou em 30 minutos. A solução de

ampicilina se mantém estável até 1 hora depois da sua reconstituição (HFE, 2015; SCHVARTSMAN *et al.*, 2014).

No estudo de Menezes (2005), os antibióticos representaram 88% de soluções infundidas por via venosa em 255 neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do município do Rio de Janeiro, perdendo apenas para a hidratação venosa com 99,6%, resultando em um levantamento dos antibióticos mais utilizados nessas unidades de saúde. A ampicilina, foi identificada como um antibiótico amplamente utilizado para tratar infecções neonatais. Apesar disso, ainda hoje existem várias lacunas de conhecimento sobre sua farmacocinética e segurança, principalmente em recém-nascidos de baixo peso, como mostra *The National Institutes of Health - NIH* (2014), na lista de prioridade na terapêutica pediátrica.

Grande parte dos antibióticos administrados por via intravenosa podem acarretar alterações locais e/ou sistêmicas (PEDREIRA, 2004). Porém, não há estudos que demonstrem de que forma ocorrem as alterações no nível celular em diluições específicas para os recém-nascidos, justificando a necessidade de pesquisas na área, uma vez que a terapia intravenosa é rotineira no cotidiano das UTIN e a produção científica sobre o assunto é escassa em nosso meio, fazendo desse campo de saber um importante alvo de pesquisa na saúde da criança (RODRIGUES *et al.*, 2012).

De acordo com Kuppala *et al.* (2011), a maioria dos neonatos prematuros nos Estados Unidos, recebem tratamento empírico com antibióticos durante os primeiros dias de vida quando apresentaram qualquer sinal de possível infecção. A escolha do antibiótico é arbitrária, pois não é baseada em cultura positiva, e sim na percepção dos médicos para o risco de infecção, sendo a ampicilina e a gentamicina os antibióticos iniciais universalmente prescritos.

Alexander *et al.* (2011) observou que a ampicilina e a gentamicina foram os antibióticos empiricamente usados para suspeita inicial de sepse (≤ 72 horas de vida), seguido de vancomicina e gentamicina para suspeita de sepse após as 72 horas de vida, e de ampicilina combinada com gentamicina e clindamicina para suspeita ou confirmação da Enterocolite Necrozante.

No estudo de Kuppala *et al.* (2011), foi observado que quanto menor a idade gestacional, o peso do prematuro, o índice de Apgar aos 5 minutos de idade inferior

a 6, intubação endotraqueal e tratamento com surfactante, maior era o tempo da antibioticoterapia.

2.3 O ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio vascular é uma camada única e contínua de células endoteliais dispostas em forma de fuso, servindo como barreira entre o sangue, a parede vascular e o interstício (Figura 4). Tem como função a manutenção da homeostase vascular, e para isso produz componentes da MEC como o colágeno e uma variedade de mediadores químicos com atividade de vasodilatação (óxido nítrico e prostaciclina) e vasoconstrição (angiotensina II e endotelina). Além disso, libera fatores antioxidantes (enzima superóxido dismutase), anti-inflamatórios (heparinas, prostaciclina e peptídeos natriuréticos), ativadores do plasminogênio (evita trombose local), fator de *Von Willebrand* (atua na adesão e agregação plaquetária e transportador do fator VIII da coagulação) e moléculas de adesão (BAHIA, 2006; VELASCO, 2012; LOPES, 1998).

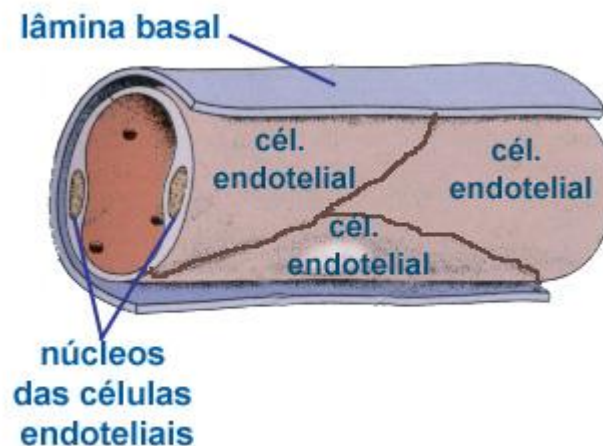


Figura 4. Imagem ilustrativa da camada íntima da veia.

Fonte: <http://www.icb.usp.br/mol/11-17-circ.html>

Ao redor das células endoteliais tem a MEC, que é uma estrutura secretada pelas próprias células endoteliais. A MEC favorece a sobrevivência dos tecidos por ser constituída de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e de glicoproteínas alongadas como a FN, LN e TN, que têm como função proporcionar adesão célula-

matriz, além de glicosaminoglicanos e proteoglicanos que formam um leito constituído por um gel, onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz (ALBERTS, 1997; ALBERTS *et al.*, 2010).

O Colágeno tipo IV (COL IV) é um colágeno não fibrilar que compõem cerca de 50% de toda membrana basal. Sua função compreende a filtração de substâncias para o interstício e a resistência, pois junto com a LN, promove uma forte malha estabilizada por glicoproteínas como o nidogênio e proteoglicanos como o perlecan (MANON-JENSEN *et al.*, 2016; ROBERTSON *et al.*, 2014; LEBLEU *et al.*, 2007).

A LN é uma glicoproteína de matricial de alto peso molecular (800 kDa) composta por três cadeias diferentes (α , β e γ) unidas por ponte dissulfeto e dispostas em forma de cruz (LJUBIMOVA *et al.*, 2006). Está associada à membrana basal que funciona como adesina, ligando as células basais do epitélio ao colágeno IV. Tem sido relacionada diretamente a estágios avançados de diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas, por interagir com as integrinas e outros componentes da superfície celular assim como controlar a migração celular, polarização, proliferação e apoptose (KOSMEHL *et al.*, 1999; ENGBRING e KLEINMAN, 2003).

A FN é uma glicoproteína dimérica de alto peso molecular (400 KDa) unida por ponte dissulfeto que está relacionada com adesão celular e aderência a matriz celular (SCHWARZBAUER, 1992). Alguns domínios da FN parecem ter papel importante nas interações com colágeno, heparina e outras superfícies celulares, como os glicosaminoglicanos. A FN é considerada a maior glicoproteína mesenquimal da MEC envolvida na adesão célula-matriz, migração celular, morfogênese, diferenciação e transformação do oncogene (IOACHIM *et al.*, 2002). Além disso, serve para potencializar a sensibilidade de certas células, como as endoteliais, aos efeitos proliferativos dos fatores de crescimento (LOCHTER e BISSEL, 1995). TN e FN são glicoproteínas da membrana basal que possuem funções competitivas (IOACHIM *et al.*, 2002).

As interações das células endoteliais com a MEC circundante permitem que as mesmas se organizem em vasos sanguíneos. Durante a angiogênese, as células endoteliais devem aderir à MEC, proliferar, migrar, estabelecer polaridade, formar tubos e manter um contato celular apropriado a angioarquitetura. Além disso, a adesão endotelial à MEC é essencial à sobrevivência e estabilização endotelial. A importância dessa adesão pode ser ilustrada pelo trabalho de Re e colaboradores

(1994) que mostraram que as células endoteliais impedidas de aderir ao substrato entram em apoptose.

3. EVIDÊNCIAS ATUAIS

Diante do exposto, foi realizada uma revisão integrativa com o objetivo de analisar a produção científica sobre a avaliação *in vitro* dos efeitos em células endoteliais por exposição a antibióticos.

Foi realizado uma pesquisa eletronicamente e atemporal que incluiu literaturas primárias em português, inglês e espanhol, que tratam do uso de antibióticos e células endoteliais de veias. As literaturas que utilizaram células endoteliais de vasos linfáticos e artérias foram excluídas. As etapas de revisão integrativa propostas por Mendes (2008) foram utilizadas nessa revisão, à saber: estabelecimento da questão norteadora, formulação dos critérios de inclusão e exclusão, definição das informações a serem extraídas das pesquisas selecionadas, avaliação dos estudos incluídos na revisão integrativa, interpretação dos resultados, apresentação da revisão e síntese do conhecimento. A seguinte questão norteou a busca nas bases de dados: O que tem de produção científica sobre os efeitos da infusão de antibióticos em células endoteliais *in vitro*?

O levantamento bibliográfico foi realizado de março a agosto de 2015, isoladamente, por duas avaliadoras. A busca ocorreu em cinco bases de dados, na seguinte sequência: Publicações Médicas (PubMed); Portal de Pesquisa da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS); e SCOPUS.

Para a busca na base de dados, foram utilizados os descritores controlados no MeSH (Medical Subject Headings) e DECS (Descritores em Ciências da Saúde) combinados com a ajuda dos operadores booleanos “OR” e “AND” expostos no quadro 1.

Quadro 1

Relação dos descritores utilizados nas estratégias de busca nas bases de dados.

DESCRITOR	QUALIFICADOR
Anti-Bacterial Agents	-
Phlebitis	-
Endothelium	Injuries drug effects cytology
injections, intravenous	adverse effects

A busca resultou em 263 artigos encontrados. Destes, foram selecionados 29 após a leitura dos resumos, e com a retirada dos artigos repetidos, foram selecionados 14 artigos para avaliação.

Todos os artigos selecionados para o estudo estão listados no Quadro a seguir, com o autor, ano de publicação, título e objetivos.

Quadro 2

Estudos que analisaram, *in vitro*, os efeitos de antibióticos em células endoteliais, selecionados para a revisão integrativa, de acordo com os critérios de inclusão.

Autor/Ano	Título	Objetivos
Lanbeck e Paulsen, 1995	<i>Cytotoxic Effects of Four Antibiotics on Endothelial Cells</i>	Investigar a toxicidade de antibióticos comumente utilizados na clínica em três tipos diferentes de células endoteliais em cultura.
Vorbach <i>et al.</i> 1998	<i>Endothelial cell compatibility of clarithromycin for intravenous use.</i>	Testar a tolerância de claritromicina aplicada por via intravenosa em veias marginais da orelha de coelhos e em HUVEC, como modelo alternativo.

<p>Robibaro <i>et al.</i> 1998a</p>	<p><i>Influence of glycopeptide antibiotics on purine metabolism of endothelial cells.</i></p>	<p>Testar os efeitos da vancomicina e teicoplanina em células endoteliais.</p>
<p>Robibaro <i>et al.</i> 1998b</p>	<p><i>Endothelial cell compatibility of glycopeptide antibiotics for intravenous use.</i></p>	<p>Investigar se os antibióticos glicopeptídicos são diretamente tóxicos para as células endoteliais, resultando em flebite subsequente.</p>
<p>Armbruster <i>et al.</i> 2000</p>	<p><i>Endothelial cell compatibility of trovafloxacin and levofloxacin for intravenous use.</i></p>	<p>Testar a tolerância intravenosa de trocafloxacina e Levofloxacino, em um sistema <i>in vitro</i>, usando HUVEC.</p>
<p>Togna <i>et al.</i> 2001</p>	<p><i>Beta-lactam antibiotic-mediated changes in platelet reactivity and vascular endothelial functions.</i></p>	<p>Testar e comparar <i>in vitro</i> os efeitos induzidos por concentrações sanguíneas terapêuticas de ceftriaxona, aztreonam, ceftazidima na reatividade de plaquetas. E avaliar a atividade <i>in vitro</i> das funções endoteliais selecionadas: ADP, prostaciclina (PGI₂) e de produção de Ativador do plasminogênio tecidual (t-PA).</p>
<p>Lanbeck e Paulsen. 2001</p>	<p><i>Short-term effects of four antibiotics on DNA synthesis in endothelial cells.</i></p>	<p>Estudar o efeito citotóxico da curta exposição a quatro antibióticos em três tipos de células endoteliais em cultura.</p>

<p>Vorbach <i>et al.</i> 2002</p>	<p><i>Endothelial cell compatibility of azithromycin and erythromycin.</i></p>	<p>Investigar os efeitos da azitromicina e eritromicina, disponíveis para aplicação intravenosa, em cultura de HUVEC.</p>
<p>Lanbeck <i>et al.</i> 2004</p>	<p><i>Dicloxacillin and erythromycin at high concentrations increase ICAM-1 expression by endothelial cells: a possible factor in the pathogenesis of infusion phlebitis.</i></p>	<p>Analisar os efeitos pró-inflamatórios e pró-coagulantes em moléculas de superfície, após exposição a antibióticos.</p>
<p>Kilic <i>et al.</i> 2006</p>	<p><i>The in vitro effects of quinupristin/dalfopristin, erythromycin and levofloxacin at low concentrations on the expression of different cell adhesion molecules on the surface of endothelial cells (Eahy926).</i></p>	<p>Identificar mudanças nos marcadores de superfície celular após exposição de células endoteliais a antibióticos clinicamente relevantes.</p>
<p>Kruse <i>et al.</i> 2007</p>	<p><i>Effect of quinupristin/dalfopristin on 3t3 and Eahy 926 cells in vitro in comparasion to other antimicrobial agents with the potential to induce infusion phlebitis.</i></p>	<p>Investigar entre 3 testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>, quais são adequados para estimar o potencial de três agentes antimicrobianos conhecidos para induzir a flebite.</p>

Millrose <i>et al.</i> 2009	<i>Effects of macrolides on proinflammatory epitopes on endothelial cells in vitro.</i>	Comparar o efeito inflamatório da eritromicina, claritromicina e azitromicina.
Drouet <i>et al.</i> 2015a	<i>Influence of vancomycin infusion methods on endothelial cell toxicity.</i>	Determinar fatores associados a toxicidade local da vancomicina sob condições <i>in vitro</i> que simulam o uso clínico do antibiótico.
Drouet <i>et al.</i> 2015b	<i>Endothelial Cell Toxicity of Vancomycin Infusion Combined with Other Antibiotics.</i>	Avaliar a toxicidade da vancomicina quando em combinação com outros medicamentos nas mesmas condições de simulação clínica <i>in vitro</i> , a fim de determinar quando uma infusão simultânea aumenta a toxicidade endotelial da vancomicina.

3.1 CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células utilizadas pelos pesquisadores para estudar os efeitos dos antibióticos foram: HUVEC (LANBECK E PAULSEN, 1995; VORBACH *et al.*, 1998; ROBIBARO *et al.*, 1998a; ROBIBARO *et al.*, 1998b; ARMBRUSTER *et al.*, 2000; LANBECK e PAULSEN, 2001; VORBACH *et al.*, 2002; LANBECK *et al.*, 2004; KRUSE *et al.*, 2007; MILLROSE *et al.*, 2009; DROUET *et al.*, 2015a; DROUET *et al.*, 2015b); Célula híbrida de HUVEC com linha de célula de carcinoma de pulmão A549 - EA.hy 926 (LANBECK E PAULSEN, 1995; LANBECK *et al.*, 2004; KILIC, *et al.*, 2006; KRUSE *et al.*, 2007; MILLROSE *et al.*, 2009); Célula endotelial de aorta de bovino (LANBECK E PAULSEN, 1995; TOGNA *et al.*, 2001; LANBECK e PAULSEN., 2001); e ECV 304, que é derivado a partir de células endoteliais da veia umbilical humana mutada espontaneamente a uma linha celular (LANBECK e PAULSEN, 2001).

3.2 METODOLOGIA APLICADA NOS ESTUDOS

O endotélio tem como função a manutenção da homeostase vascular, por meio de propriedades sintéticas e metabólicas, as quais promovem a regulação da trombose e trombólise, adesão plaquetária, modulação do tônus vascular e da corrente sanguínea, regulação da resposta imune e inflamatória pelo controle das interações dos leucócitos, monócitos e linfócitos com a parede do vaso. Sintetiza assim, componentes da MEC como o colágeno e mediadores químicos com atividade de vasodilatação (óxido nítrico e prostaciclina) e vasoconstrição (angiotensina II e endotelina), fatores antioxidantes (enzima superóxido dismutase), anti-inflamatórios (heparinas, prostaciclina e peptídeos natriuréticos), ativadores do plasminogênio (evita trombose local), fator de *Von Willebrand* (atua na adesão e agregação plaquetária e transportador do fator VIII da coagulação) e moléculas de adesão (VELASCO, 2012; BAHIA, 2006; SUMPIO *et al.*, 2002; LOPES, 1998).

No processo de lesão vascular, as plaquetas e os fatores de coagulação, antes inativos, entram em ação para manter a hemostasia. Com isso, foi realizado uma análise dos marcadores endoteliais utilizados pelos diversos pesquisadores dessa revisão integrativa, a fim de identificar a melhor técnica utilizada que pode prevenir danos endoteliais com a utilização de fármacos. Além disso, várias técnicas de avaliação de citotoxicidade e do metabolismo celular também foram testadas. Dos fatores que promovem a coagulação, e são chamados de pró-coagulantes, temos o Fator tecidual (FT), que é uma glicoproteína de membrana, e funciona como receptor do fator VII da coagulação. Sua exposição em caso de lesão vascular dá início a cascata de coagulação, sendo o principal ativador da coagulação do sangue (DRAKE *et al.*, 1989; FRANCO *et al.*, 2000). Lanbeck *et al.* (2004) avaliou, dentre vários fatores, o fator tecidual após exposição de células endoteliais a dois antibióticos, dicloxacilina e eritromicina. No entanto, não pode confirmar que a expressão do FT foi ativada pelos antibióticos.

A formação de fibrina, resultante da cascata de coagulação, precisa ser regulada, a fim de evitar excessos que levam a oclusão vascular e para isso existem os fatores anticoagulantes que são: o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), que regula a geração de plasmina, uma enzima ativa, produzida a partir do plasminogênio e tem a função de degradar a fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular (COLLEN, 1999). O fator de plasminogênio (t-PA) determinado no

estudo do Togna *et al.* (2001), apresentou-se reduzido a partir do tratamento com ceftriaxona. Os antibióticos ceftazidima e aztreonam não induziram alterações.

As células endoteliais apresentam dois tipos de selectinas, que são as E-selectinas e as P-selectinas, proteínas responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. As E-selectinas são expressas após serem ativadas por citocinas inflamatórias. As P-selectinas são armazenadas nos corpos de *Weibel-Palade* (vesículas intra-citoplasmáticas) das células endoteliais e também em alfa-grânulos nas plaquetas, sendo expressas após estimulação específica. Os linfócitos interagem com o endotélio através do receptor L-selectina, que não é expresso nas células endoteliais. Os linfócitos e leucócitos, quando ativados, expressam integrinas que interagem com a moléculas de adesão endotelial, a molécula de adesão intercelular-1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2) e molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1) (BUTCHER, 1991).

Kilic *et al.* (2006) analisou a expressão das moléculas de adesão endotelial após o contato com antibióticos. A expressão de ICAM-1 aumentou significativamente em células endoteliais proporcionalmente ao aumento das concentrações de quinupristina/dalfopristina. VCAM-1, E-selectina, L-selectina e CD34 (glicoproteína de adesão celular), apresentaram um aumento significativo, com a concentração de 100 mg/L. Células expostas a eritromicina também apresentaram aumento na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 a partir de 100mg/L. Não houve mudanças relevantes de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, L-selectina e CD34 com o uso de Levofloxacino. PECAM-1 no grupo controle apresentou alta expressão e, no entanto, quando em contato com quinupristina/dalfopristina, eritromicina e Levofloxacino, tendeu a uma baixa expressão, sendo mais significativo no tratamento com Levofloxacino em 30 e 100mg/L. Curiosamente em alta concentração (100mg/L) de quinupristina/dalfopristina e eritromicina, não teve alteração em PECAM-1. Esses resultados foram realizados com 24 horas de exposição aos antibióticos. Kilic *et al.* (2006) sugeriu que, uma irritação local no endotélio pela infusão de quinupristina/dalfopristina, desencadeante da flebite, é decorrente da ativação do endotélio, em especial, pela elevada expressão de ICAM-1 e E-selectina, tanto em alta quanto em baixa concentração. A regulação positiva desses dois marcadores superficiais permite a ligação do leucócito ao endotélio e

sua posterior migração através da parede do vaso, causando a resposta inflamatória.

Lanbeck *et al.* (2004) utilizou altas concentrações de dicloxacilina e eritromicina em cultura de células endoteliais, e constatou que houve aumento significativo no número de células que expressavam ICAM-1. Em contraste, não houve aumento da expressão de ICAM-1 com a infusão de cefuroxima e benzilpenicilina. A E-selectina não foi afetada pelos antibióticos utilizados.

A prostaciclina (PGI_2), uma prostaglandina produzida pelo endotélio, é responsável pela vasodilatação vascular e inibição da agregação plaquetária. No caso de danos do vaso, sua produção diminui, podendo ser um importante desencadeante da tromboflebite. Os resultados da produção de prostaciclina, no estudo de Lanbeck e Paulsen (1995), variou bastante, tendo diminuição da produção mesmo em baixas concentrações de cefuroxima e aumento em algumas concentrações de eritromicina. Nos experimentos feitos por Togna *et al.* (2001), altas concentrações de ceftriaxona reduziram a produção PGI_2 . No entanto, não teve modificação nas células cultivadas quando em contato com ceftazidima e aztreonam. Robibaro *et al.* (1998b) determinou a concentração de produtos de degradação estáveis de PGI_2 e TXA_2 , 6-cetoprostaglandina F_{1a} (6-ceto- PGF_{1a}) e tromboxano B_2 (TXB_2) respectivamente, por técnica de radioimunoensaios diretos. No entanto, a síntese de 6-ceto- PGF_{1a} e TXB_2 em células endoteliais não foi significativamente diferente das células do controle, mesmo com a variação da concentração do antibiótico vancomicina. Em contraste, a teicoplanina induziu um aumento da liberação de PGI_2 e TXA_2 , em concentrações de 5 e 10 mg/mL.

Alguns artigos quantificaram os níveis de purinas, uns utilizaram a técnica da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), que separa compostos químicos em misturas para análise ou purificação, enquanto outros, a técnica da bioluminescência, mensurando assim, os níveis de ATP, ADP, GTP e/ou GDP (VORBACH *et al.*, 1998; ROBIBARO *et al.*, 1998a; ROBIBARO *et al.*, 1998b; ARMBRUSTER *et al.*, 2000; VORBACH *et al.*, 2002).

A atividade da adenosina difosfatase endotelial, responsável pela degradação do difosfato de adenosina (ADP) e inibição da agregação plaquetária, foi avaliada após exposição aos antibióticos, ceftriaxona, ceftazidima e aztreonam, e apresentou variação, de acordo com cada um deles. A adição de ceftriaxona ao meio de incubação em concentrações de 125-500 mg/mL diminuiu significativamente a taxa

de degradação do ADP do endotélio. De um modo semelhante, a ceftazidima foi ativa nas concentrações de 250 e 500 mg/mL, enquanto que o aztreonam não alterou a atividade adenosina difosfatase (TOGNA *et al.*, 2001).

Outros métodos utilizados foram o ensaio de incorporação do vermelho neutro, o método de coloração Cristal Violeta (KRUSE *et al.*, 2007), o teste de citotoxicidade pelo método direto – MTT (MILLROSE *et al.*, 2009; DROUET *et al.*, 2015a), o ensaio colorimétrico do *Alamar Blue* (DROUET *et al.*, 2015b), e o ensaio de incorporação do radioisótopo ^3H -timidina em células proliferativas (LANBECK e PAULSEN, 1995 e LANBECK e PAULSEN, 2001). Esses testes permitem a avaliação da viabilidade celular. No ensaio de incorporação do vermelho neutro ocorre a passagem do corante através da membrana plasmática com concentração nos lisossomos de células vivas. Danos nas membranas celulares e lisossomais diminuem a captação e ligação do vermelho neutro, resultando na distinção de células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final. No método cristal violeta, o corante se liga ao DNA, podendo ser medido por espectrofotometria. O MTT baseia-se na redução do sal tetrazolato pela enzima hidrogenase succínica presente nas mitocôndrias das células, as quais adquirem uma coloração violácea, que também é medida por espectrofotometria. O ensaio Alamar Blue baseia-se na capacidade que as células metabolicamente ativas tem para reduzir o reagente em um indicador fluorescente e colorimétrico.

A técnica de coloração cristal violeta no estudo de Kruse *et al.* (2007), mostrou ser mais sensível para medir a viabilidade celular do que o teste de incorporação do vermelho neutro. Os resultados do ensaio de citotoxicidade pelo MTT, no estudo de Millrose *et al.* (2009), corresponderam com as mudanças na expressão de marcadores de superfície pró-inflamatórias analisadas por citometria de fluxo. Assim, conclui que marcadores da superfície celular envolvidos nas interações entre as células endoteliais e leucócitos provaram ser marcadores importantes para estudar as diferenças no potencial pró-inflamatório dos antibióticos estudados, além de ser útil para prever riscos de flebites de outras drogas com esses ensaios *in vitro*.

O teste de incorporação do radioisótopo ^3H -timidina em células proliferativas, o qual avalia a viabilidade celular, por meio da síntese de DNA, mostrou ser um modelo importante para demonstrar diferenças de toxicidade de diferentes antibióticos, nos estudos de Lanbeck e Paulsen (1995) e Lanbeck e Paulsen (2001).

Seu resultado pode ser comparado com os resultados da quantificação proteica, em um ensaio que mede a massa celular remanescente na cultura, após agressão tóxica. Como desvantagem do método, a avaliação da síntese de DNA não diferencia efeitos citostáticos de efeitos citotóxicos. Já o método de quantificação de proteínas das células é mais insensível que a ^3H -timidina, uma vez que pode detectar a proteína a partir de células inviáveis ainda aderidas a monocamada, e ainda assim serem contabilizadas.

Quadro 3

Resumo dos fatores investigados nos estudos e suas funções

MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR (CAM)		LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
Imunoglobulinas	ICAM-1	Células Endoteliais	Adesão e Migração celular
	ICAM-2	Células Endoteliais	
	VCAM-1	Células Endoteliais	
	PECAM-1	Plaquetas, leucócitos e células endoteliais	
Integrinas		Membrana das células	Adesão
Selectinas	E-Selectina	Células endoteliais	Receptores de adesão celular.
	L-Selectina	Leucócitos	
	P-Selectina	Plaquetas e corpos de Weibel-Palade (vesículas intra-citoplasmáticas) das células endoteliais.	

COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE		
Fator tecidual (FT)	Fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular	Glicoproteína de membrana, sua exposição em caso de lesão vascular dá início a cascata de coagulação, sendo o principal ativador da coagulação do sangue.
Ativador do Plasminogênio Tecidual (t-PA)	Sintetizado pelas células endoteliais	Regula a produção de plasmina, uma enzima ativa, produzida a partir do plasminogênio e tem a função de degradar a fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular.
Prostaciclina PG ²	Sintetizado pelas células endoteliais	Promove vasodilatação vascular e inibição da agregação plaquetária.

3.3 ANTIBIÓTICOS

Os resultados referentes aos antibióticos encontrados nos artigos foram agrupados em 3 quadros, de acordo com o potencial citotóxico identificado.

Quadro 4

Relação dos efeitos encontrados, *in vitro*, nas células endoteliais, de acordo com a metodologia e os antibióticos utilizados. Antibióticos com baixo potencial citotóxico.

Antibiótico	Achados
Aztreonam	<p>Não alterou a atividade adenosina difosfatase nas células endoteliais, nem a produção PGI². Dos β-lactâmicos, o aztreonam deve ser o de primeira escolha para tratamento clínico, devido à ausência de alteração nos marcadores de adesão endotelial, mostrando ser mais compatível (Togna <i>et al.</i>, 2001).</p>
Benzilpenicilina	<p>De acordo com a experiência clínica de Lanbeck e Paulsen (1995), a benzilpenicilina raramente causa tromboflebite após administração intravenosa, sendo considerada atóxica. Em seus experimentos, esse antibiótico apresentou toxicidade apenas quando utilizada em alta concentração, 2300 mg/L, valor acima do comumente utilizado na clínica, 100 mg/L. Esse resultado só foi encontrado em HUVEC, apesar de testado também em EA.hy 926 e células endoteliais de aorta de bovino. Os resultados não dependem do pH ou da pressão osmótica nas soluções antibióticas.</p> <p>Não exerceu efeito na síntese de DNA em HUVEC e células endoteliais de aorta de bovino (LANBECK e PAULSEN, 2001). Não afetou a expressão de ICAM-1 (LANBECK <i>et al.</i>, 2004).</p>
Levofloxacino	<p>Solução injetável pronta para uso na concentração de 5mg/mL. Considerado atóxico por Kruse <i>et al.</i> (2007), através dos resultados dos ensaios de viabilidade celular pelo teste de incorporação do vermelho neutro e coloração cristal violeta na concentração de 1mg/L. No estudo de Armbruster <i>et al.</i> (2000) foi identificado um decréscimo no ATP intracelular na concentração de 5mg/mL e nenhum declínio importante de purinas com a contração de 1mg/mL.</p> <p>No estudo de Kilic <i>et al.</i>, (2006), a exposição ao antibiótico levofloxacino, tendeu a baixa regulação dos marcadores de adesão endotelial.</p>

Quadro 5

Relação dos efeitos encontrados, *in vitro*, nas células endoteliais, de acordo com a metodologia e os antibióticos utilizados. Antibióticos com médio potencial citotóxico.

Antibiótico	Achados
Cefuroxima	<p>De acordo com a experiência clínica de Lanbeck e Paulsen (1995), a cefuroxima raramente causa tromboflebite após administração intravenosa. No entanto, após experimentos com cultura de células endoteliais concluíram que a toxicidade é dependente de concentração e do tempo de exposição. Em curtos períodos de exposição das células ao antibiótico não há manifestação dos efeitos. Os resultados não dependem do pH ou da pressão osmótica nas soluções antibióticas.</p> <p>Não exerceu efeito na síntese de DNA em HUVEC. Nas células endoteliais de aorta bovino, apresentou alguma redução na síntese de DNA na concentração de 12,500mg/L (LANBECK e PAULSEN, 2001). Não afetou a expressão de ICAM-1 (LANBECK <i>et al.</i>, 2004).</p>
Dicloxacilina	<p>Toxicidade dependente da concentração do antibiótico. Os resultados não dependem do pH ou da pressão osmótica nas soluções antibióticas (LANBECK e PAULSEN, 1995).</p> <p>A exposição à docloxacilina, resultou na diminuição da síntese de DNA em células endoteliais de aorta de bovino e HUVEC de acordo com a concentração e tempo de infusão (LANBECK e PAULSEN, 2001).</p> <p>A incubação por 60 minutos, com 6250mg/L de dicloxacilina, resultou em um aumento da expressão de ICAM-1, mas não alterou a E-selectina e o fator tecidual (LANBECK <i>et al.</i>, 2004).</p>
Eritromicina	<p>A eritromicina apresentou um efeito citotóxico dependente da concentração em ambas as células investigadas no estudo de Kruse <i>et al.</i> (2007), células 3T3 de fibroblastos e células endoteliais (EA.hy 926).</p> <p>De acordo com estudo de Lanbeck e Paulsen (1995; 2001), a exposição de células endoteliais a eritromicina apresentou diminuição da síntese de DNA. Refere também os resultados não dependentes do pH ou da pressão osmótica das soluções antibióticas.</p> <p>A incubação das células endoteliais com eritromicina na concentração de 2mg/mL resultou em um rápido declínio de ATP intracelular e extensa</p>

	<p>depleção de ADP, no estudo de Vorbach <i>et al.</i> (2002). Na concentração de 0,5 mg/mL não apresentou declínio significativo nos níveis intracelular de fosfato de alta energia. Baseado nesses resultados, Vorbach <i>et al.</i> (2002) concluiu que a solução de eritromicina não é bem tolerada e pode causar reações adversas locais quando diluído conforme a recomendação do fabricante.</p> <p>Na concentração de 200mg/L de eritromicina não foi observado efeito nas células endoteliais em comparação ao grupo controle, já a EC50 foi de 310mg/L, no estudo de Millrose <i>et al.</i> (2009). Além disso, a eritromicina induziu repostas significativas em todos os marcadores superficiais pró-inflamatórios na concentração de 800mg/L.</p> <p>A incubação por 60 minutos com 6250mg/L de eritromicina resultou em um aumento da expressão de ICAM-1, mas não alterou a E-selectina e o fator tecidual (LANBECK <i>et al.</i>, 2004).</p> <p>No estudo de Kilic <i>et al.</i> (2006), as células expostas a eritromicina também apresentaram aumento na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 a partir de 100mg/L.</p>
Quinupristina/ Dalfopristina	<p>Quinupristina/Dalfopristina apresentou um efeito citotóxico dependente da concentração em ambas as células investigadas no estudo de Kruse <i>et al.</i> (2007), células 3T3 de fibroblastos e células endoteliais (EA.hy 926).</p> <p>A expressão de ICAM-1 aumentou de forma significativa e proporcionalmente ao aumento da concentração de quinupristina/dalfopristina. VCAM-1, E-selectina, L-selectina e CD34 apresentaram um aumento significativo, somente com a concentração de 100 mg/L (KILIC <i>et al.</i>, 2006).</p> <p>No estudo de Millrose <i>et al.</i> (2009), Quinupristina/Dalfopristina induziu um significativo aumento de CD34, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 nas concentrações testadas, 400, 600 e 800mg/L.</p>
Vancomicina	<p>As soluções de vancomicina afetam diretamente as células endoteliais, resultando em flebite local subsequente a infusão venosa, sem grandes efeitos sistêmicos. Soluções com concentração abaixo de 5mg/mL são bem toleradas pelo endotélio. No entanto, soluções com 5 e</p>

	<p>10mg/mL resultaram em um rápido decréscimo de ATP após 120 minutos de exposição a células endoteliais (Robibaro <i>et al.</i>, 1998a; Robibaro <i>et al.</i>, 1998b).</p> <p>Nos estudos de Drouet <i>et al.</i> (2015a) a toxicidade é dependente da concentração e do tempo de exposição, e 50% da dose letal para HUVEC é alcançado com 5mg/mL. Foram contestados estudos anteriores que indicam o pH como um fator responsável pela toxicidade, através do teste da solução de NaCl 0,9% com pH 7,14 e vancomicina com o mesmo pH na concentração de 5mg/mL. NaCl não induziu toxicidade nas células, ao contrário da vancomicina. A administração de vancomicina de forma contínua aumenta a toxicidade endotelial em comparação a infusão intermitente. Alguns cuidados são importantes ao infundir vancomicina no vaso sanguíneo, como usar uma solução salina antes e após o procedimento, a fim de evitar o contato com outras medicações incompatíveis de serem administradas juntas, que são inúmeras. Drouet <i>et al.</i> (2015b), experimentou a exposição da vancomicina com outros antibióticos frequentemente infundidos conjuntamente, através do “conector y”. Além disso, identificou que algumas medicações aumentam as complicações celulares, como é o caso da eritromicina, gentamicina.</p>
--	---

Quadro 6

Relação dos efeitos encontrados, *in vitro*, nas células endoteliais, de acordo com a metodologia e os antibióticos utilizados. Antibióticos com alto potencial citotóxico.

Antibiótico	Achados
Azitromicina	<p>Incubação de células endoteliais com azitromicina na concentração de 2mg/mL resultou em um rápido declínio de ATP intracelular e extensa depleção de ADP. Na concentração de 0,5 mg/mL, não apresentou declínio significativo nos níveis intracelular de fosfato de alta energia. Baseado nesses resultados, Vorbach <i>et al.</i> (2002) concluiu que a solução de azitromicina não é bem tolerada e pode causar reações adversas locais, se diluído conforme a recomendação do</p>

	<p>fabricante.</p> <p>No estudo de Millrose <i>et al.</i> (2009), não foi observado efeito nas células endoteliais em comparação ao grupo controle com 10mg/L. Já a concentração do fármaco que induziu metade do efeito máximo (EC50) foi de 40mg/L. Em 100mg/L causou um declínio significativo nos marcadores pró-inflamatórios da superfície, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e CD34. O máximo efeito foi encontrado na concentração de 600mg/L.</p>
Ceftazidima	<p>A ceftazidima diminui a taxa de degradação do ADP das células endoteliais nas concentrações de 250 e 500 mg/mL. Não alterou a produção de PGI² (TOGNA <i>et al.</i>, 2001).</p>
Ceftriaxona	<p>A adição de ceftriaxona ao meio de incubação em concentrações de 125-500 mg/mL diminuiu significativamente a taxa de degradação do ADP nas células endoteliais. Além disso, as altas concentrações também diminuíram a produção de PGI² (TOGNA <i>et al.</i>, 2001).</p>
Claritromicina	<p>A exposição de células endoteliais a 2 mg/mL de claritromicina resultou em um rápido decréscimo no nível de ATP intracelular, enquanto a concentração de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL não apresentaram redução significativa nos níveis de purina (Vorbach <i>et al.</i>, 1998). Na concentração de 10mg/L de claritromicina não foi observado efeito nas células endoteliais em comparação ao grupo controle, já a EC50 foi de 30mg/L. Claritromicina induziu repostas significativas em todos os marcadores superficiais pró-inflamatórios na concentração de 400 e 600mg/L (MILLROSE <i>et al.</i>,2009).</p> <p>Maior potencial citotóxico de três antibióticos estudados por Millrose <i>et al.</i> (2009), seguido da azitromicina e por último a eritromicina.</p>
Teicoplanina	<p>As soluções de teicoplanina afetam diretamente as células endoteliais, resultando em flebite local subsequente a infusão venosa, sem grandes efeitos sistêmicos (ROBIBARO <i>et al.</i>,1998a; ROBIBARO <i>et al.</i>, 1998b).</p>

Trovafloracina	A incubação de células endoteliais por 20 e 60 minutos com 2mg/mL de trovafloracina resultou em um rápido decréscimo do ATP intracelular no estudo de Armbruster <i>et al.</i> (2000), além da diminuição também de ADP, GTP e GDP. Já a concentração de 0,5mg/mL não apresentou alteração no nível de purinas.
----------------	---

A maioria dos estudos utilizaram HUVEC nos seus experimentos. As HUVEC são comumente utilizadas devido a facilidade na obtenção de grandes quantidades de células (SCHIMEK *et al.*, 2013). Lanbeck e Paulsen (1995), com o intuito de criar um modelo *in vitro* capaz de avaliar a toxicidade de drogas, testaram as células HUVEC, EA.hy 926 e a célula endotelial de aorta de bovino. A exposição dessas células a diferentes antibióticos, apresentou resultados variados entre as células híbridas e as células primárias. O trabalho concluiu que as células primárias são as mais representativas das condições naturais de um organismo.

Millrose *et al.* (2009) realizou seus experimentos com EA.hy 926 e para que os resultados fossem mais próximos do modelo biológico, simulou situações *in vivo*, também testando algumas concentrações de antibióticos em HUVEC. Lanbeck e Paulsen, em 2001, realizaram outro estudo, comparando resultados da exposição de antibióticos a HUVEC e a ECV 304. Os resultados indicaram que a validade do modelo proposto não é reduzida pela utilização de células ECV 304. Porém, deve-se ter cuidado ao trabalhar com estas linhagens celulares, pois não se concluiu serem elas representantes fidedignas das células endoteliais primárias. Por outro lado, as desvantagens citadas da utilização de HUVEC são que as células primárias têm de ser obtidas em um curto período de tempo antes da realização dos experimentos, além de terem uma vida útil limitada (LIDINGTON *et al.*, 1999; LANBECK *et al.*, 2004).

Com base nos estudos avaliados, pode se dizer que a avaliação das moléculas de adesão se mostrou eficaz para avaliar o potencial de flebite de um antibiótico. A avaliação do fator tecidual não apresentou ser um bom método, já que não sofreu alteração nos experimentos, e o t-PA não apresentou um bom padrão de regulação. Os ensaios de citotoxicidade são importantes para a avaliar a viabilidade celular, porém, não conseguem explicar o fisiopatogênese da flebite.

Em relação as células endoteliais, as células primárias se mostraram mais representativas da realidade clínica da punção venosa periférica, mas as linhagens apresentam maior facilidade na manutenção e obtenção.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO METODOLÓGICO

O método utilizado para a pesquisa é o experimental, que segundo Prodanov e Freitas (2013), consiste em submeter objetos de estudo a influência de certas variáveis para analisar a resposta perante a situação exposta.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Morfogênese Celular, do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, coordenado pelo Prof. Titular Vivaldo Moura Neto.

4.3 DINÂMICA

4.3.1 Cultura de Células Endoteliais de Veia de Cordão Umbilical Humano (HUVEC)

As células endoteliais utilizadas no estudo foram obtidas a partir de veia de cordão umbilical humano oriundas da Maternidade Carmela Dutra, em parceria com o Laboratório da Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese (LabAngio) da Universidade do Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), coordenado pela Prof. Dra. Verônica Morandi. Apenas foram recolhidos cordões umbilicais de RN sabidamente saudáveis, com até 24 horas após o parto. As células endoteliais foram isoladas conforme descrito por Jaffe *et al* (1973). Em suma, as HUVEC foram recolhidas após

a canulação da veia umbilical e posterior tratamento com solução estéril de colagenase IV 0,1% (Sigma) em PBS rico em glicose (Merk).

4.3.1.1 MEIO DE CULTURA

O Meio 199/HEPES é uma solução nutritiva em cultivo celular. O conteúdo em forma de pó tem 14,7 gramas e foi diluído em 1 litro de Água Milli-Q, acrescido de 2,2g de Bicarbonato, filtrado e armazenado na geladeira entre 2 e 8°C, conforme orientação do fabricante. O Meio199/HEPES tem 24 meses de validade e depois de reconstituído, o prazo de utilização não deve ultrapassar 12 meses. Outros suplementos como o Soro Fetal Bovino (SFB) e a Glutamina, foram acrescentados no momento do uso, pois perdem seu efeito a longo prazo. Conforme a necessidade de uso, portanto, a solução foi colocada em garrafas menores com capacidade de aproximadamente 100ml, sendo 90ml de Meio199/HEPES, 10ml de SFB e 1ml de L-glutamina. A penicilina e o Fugison não foram acrescentados no meio, para que não interferissem no resultado.

As HUVEC foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, até que atingiram a confluência, para posteriormente serem repicadas com tripsina-EDTA 0,025% e, assim, estarem disponíveis para os experimentos.

4.3.1.2 PLAQUEAMENTO

Com a finalidade de minimizar o estresse do deslocamento entre os laboratórios da UERJ e UFRJ, as HUVEC ao chegarem ao LMC, permaneceram por 24 horas na estufa e tinham seu meio trocado a cada dois dias até seu plaqueamento.

Para o plaqueamento, foram seguidas as seguintes etapas: primeiro, o Meio199/HEPES contido nos garrafões foi descartado e colocado PBS para lavar; acrescentou-se assim, 3ml de tripsina e observamos o descolamento das células no microscópio. Dependendo da necessidade, os garrafões eram colocados na estufa por 3 minutos para ajudar na ação da tripsina. Após essa etapa, a tripsina foi inativada com Meio199/HEPES e o conteúdo do garrafão colocado em um tubo falcon e levado à centrifuga por 10 minutos a 1100 rotações por minuto (rpm). No tubo falcon, a solução apresentou-se, após a centrifugação, heterogênea, sendo a

fase líquida descartada e a parte sólida, formada pelas células, resuspendida com 1200µl de Meio199/HEPES mais SFB e plaqueadas 50µl por poço, nos 24 poços da placa de cultura. A placa de cultura ao término desse processo, foi colocada na estufa para adesão das células na lamínula. A placa de cultura previamente, recebeu 1 lamínula em cada poço e 300µl de gelatina 2% que foi colocada por 30 minutos e retirou-se o excesso e deixamos secar no fluxo naturalmente até o plaqueamento das HUVEC.

4.3.2 Padronização de doses e diluições da ampicilina

4.3.2.1 RECONSTITUIÇÃO:

O antibiótico Ampicilina se apresenta em forma de pó que precisa ser reconstituído com água para injeção e depois diluído. Na clínica a diluição é feita com soro glicosado 5% ou com soro fisiológico. No LMC, 1g de Ampicilina foi reconstituído em 5ml de água para injeção, resultando na concentração de 200mg/ml e a diluição se deu no próprio meio de cultura.

4.3.2.2 DILUIÇÃO:

Do produto da reconstituição foram estabelecidas as seguintes condições para diluição:

Concentração mg/mL	Volume de ampicilina utilizado da solução reconstituída (μ l)	M199 +SFB (μ l)	Solução Final (μ l)
7	35	965	1000
14	70	930	1000
21	105	895	1000
28	140	860	1000
40	200	800	1000
60	300	700	1000
80	400	600	1000
100	500	500	1000

Foi utilizada como diluente do antibiótico em questão a água destilada, na tentativa de reproduzir *in vitro* o que é rotineiro na prática da terapia intravenosa em âmbito hospitalar. O antibiótico testado foi a ampicilina (Cilnon® ampicilina sódica – Blau) em concentrações crescentes de 7, 14, 21, 28, 40, 60, 80 e 100mg/mL.

4.3.3 Análise morfológica das células endoteliais

Foram plaqueadas 10^5 HUVEC sobre lamínulas estéreis em Meio199/HEPES com 10% de SFB, antes do contato com o antibiótico. Após lavagem da cultura com meio sem soro, as HUVEC sofreram tratamento com ampicilina na concentração de 7, 14, 21, 28, 40, 60, 80 e 100mg/mL por 30 minutos. As células foram observadas no microscópio óptico invertido da marca Nikon, modelo Eclipse, TE 300 por

microscopia de contraste de fase e as imagens foram capturados em câmera digital CCD, marca DFC310FX.

4.3.4 Análise citológica das células endoteliais

As células em monocamadas, apresentam-se sem cor, portanto, para evidenciar melhor suas estruturas usamos a coloração Hematoxilina e Eosina (HE), principal coloração da histologia. A Hematoxilina, ajuda a visualizar melhor os detalhes internos dos núcleos, por apresentarem componentes ácidos (azul), a eosina cora os citoplasmas que compõem estruturas básicas (rosa). Em nosso experimento, utilizamos células HUVEC cultivadas sobre lamínulas, tratadas e não tratadas seguindo os seguintes procedimentos: Fixação com PA 4% por 10 min., seguindo de lavagens com água destilada 3x5 min.; Hematoxilina 7 a 10 min.; lavando 3X5 min. com água destilada; Eosina 5 a 8 min., parando a reação com água destilada 3X5 min.; seguida de desidratação com álcool 80, 90 e 100% PA. Após secagem à temperatura ambiente, as lamínulas foram montadas sobre lâminas com substância selante Entellan (Merck, USA). Após secagem, as lâminas foram observadas em microscópio de luz Nikon TE 300®. As áreas selecionadas de cada lâmina foram capturadas utilizando-se o software Image-Pro Express®.

4.3.5 Quantificação de adesão das células HUVEC

Após 30 minutos das células HUVEC em cultura foi realizada a quantificação de adesão celular do grupo controle e do grupo exposto ao antimicrobiano ampicilina nas concentrações de 07, 14, 21, 28, 40, 60, 80 e 100mg/mL e observadas no microscópio óptico invertido da marca Nikon, modelo Eclipse, TE 300 por microscopia de contraste de fase. Foram capturados em câmera digital CCD, marca DFC310FX, 8 campos aleatórios de cada condição. As células aderidas foram contadas e fragmentos celulares foram excluídos da contagem.

4.3.6 Análise de matriz extracelular das células HUVEC por técnica de imunocitoquímica (células do grupo controle e células do grupo tratado com ampicilina)

As células HUVEC (sem tratamento e tratadas com ampicilina) aderidas às lamínulas de vidro que foram fixadas com formaldeído 3,7% + sacarose 4% por 3 minutos e depois lavadas com PBS. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-BSA-5% durante 1h. Após novas lavagens com PBS, as células foram incubadas por 1h, com os anticorpos policlonais anti-fibronectina humana (1:400 Sigma) e anti-colágeno IV humano (1:250 Abcam), e monoclonal anti-laminina humana (1:250 Abcam). A incubação com anticorpo secundário foi realizada à temperatura ambiente, por 1h. Foram usadas imunoglobulinas anti- IgG de coelho conjugadas ao fluorocromo rodamina (1:400) e anti-IgG de coelho conjugada a fluoresceína (1:300). Controles negativos foram obtidos com a omissão de anticorpos primários e não foram observadas imunoreações inespecíficas. Os núcleos foram marcados com DAPI (40,6-Diamidino-2-phenyindole dilactato; Sigma Chemical). Após a incubação as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas com líquido de montagem SouthernBiotech Fluoromount-G®. As células foram observadas e imagens capturadas em câmera digital CCD, marca DFC310FX.

4.3.7 Densitometria por fluorescência

As imagens de fluorescência foram capturadas por microscópio confocal e quantificadas através do Programa *ImageJ*. Foi realizada a medida de intensidade de fluorescência cujo resultado foi dividido pelo número de núcleos marcados com Dapi.

4.3.8 Modelo Matemático

O modelo matemático utilizado com a colaboração do Professor Dr. Cosme Ferreira da Ponte Neto, foi baseado no modelo de morte celular proposto por Palsson & Bhatia (2004). O ajuste do parâmetro do modelo matemático foi feito a

partir da contagem das células HUVEC sujeitas à ação do antibiótico durante um determinado tempo. As células foram contadas, plaqueadas e logo depois, colocado o antibiótico na cultura. Após um intervalo de tempo fixo, as células foram novamente contadas. Esse processo foi repetido com as diversas concentrações do antibiótico utilizadas. O conjunto destes dados experimentais possibilitou o cálculo do parâmetro do modelo.

O modelo é representado pela equação abaixo, que relaciona o número de células vivas com a concentração do antibiótico num intervalo de tempo pré-determinado.

$$X = 1 + \ln\left(1 - \frac{C}{K}\right)$$

Sendo:

X – número de células vivas após a colocação do antibiótico

C – concentração do antibiótico

K – parâmetro do modelo que corresponde a concentração que causa a morte de 100% das células no tempo considerado. Este parâmetro é uma característica do antibiótico utilizado no trabalho.

4.3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com médias de 3 experimentos independentes e analisadas pelo *Teste U de Mann-Whitney*.

4.4 QUESTÕES ÉTICAS

Essa pesquisa utilizou Linhagem de células humanas de cordão umbilical neonatal (HUVEC), sendo pautada nas diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos preconizadas pela Resolução 466/12.

As HUVEC são oriundas da Maternidade Carmela Dutra, em parceria com o Laboratório da Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese (LabAngio) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), coordenado pela Prof. Dra.

Verônica Morandi. Os experimentos preliminares foram realizados até março de 2015, prazo final de cobertura da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da EEAN/HESFA em 30 de março de 2010 – Protocolo nº 024/2010, CAAE – 0008.0.226.000-10 (anexo A).

Foi solicitado um novo parecer no comitê de ética da EEAN/UFRJ em Junho de 2015, com a aprovação concedida em Julho do mesmo ano. Em Abril de 2016 foi solicitada a inclusão de uma emenda e aprovada no mesmo mês, CAAE – 46890415.3.0000.5238 (anexo B).

4.4.1 Riscos e benefícios

Os riscos biológicos relacionados a esse estudo podem ocorrer por meio de contaminação por microorganismos como bactérias, fungos, parasitas, vírus, que quando em contato com o homem, podem provocar inúmeras doenças.

A pesquisa se fundamenta na aplicação das boas práticas de laboratório (BPL) baseadas nas diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos, que preconizam a utilização de equipamentos de proteção e a adequação das instalações, com ênfase em indicadores de Biossegurança (BRASIL, 2010). Os pesquisadores obrigatoriamente devem utilizar Equipamento de Proteção Individual (EPI) e Coletivo (EPC), tais como: jaleco, luvas de procedimento, touca, máscara, sapatos fechados e manipulação das células dentro de uma capela de fluxo laminar, que garante a proteção do operador e do ambiente contra agentes biológicos de risco, protegendo os materiais de estudo de contaminações externas.

Após os experimentos, o material biológico sofre tratamento químico com hipoclorito para que possa ser descartado de forma a proteger o meio ambiente e os seres humanos. São descartados em sacos brancos marcados com o logotipo de risco biológico e a palavra “INFECTANTE”, na lixeira de cor branca destinada a lixos infectantes.

Em caso de contato acidental com o material biológico a conduta será lavar com água corrente em abundância as membranas mucosas e a pele, podendo ser usado soro fisiológico 0,9%, repetindo a operação por várias vezes. O laboratório fará o encaminhamento para o atendimento médico necessário e acompanhará o caso até sua resolução.

Os benefícios de estudar as lesões em células endoteliais, a partir de HUVEC, são: a reprodução *in vitro* dos fenômenos biológicos que ocorrem *in vivo*, sem comprometer os seres vivos; a contribuição para o conhecimento de novos saberes sobre o antimicrobiano ampicilina e o aumento da segurança do paciente na realização da TIV.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS HUVEC

A Figura 5 mostra uma panorâmica da cultura de células HUVEC com grupo controle, e após tratamento com antimicrobiano ampicilina. No grupo controle (Figura 5A), as células HUVEC cultivadas em lamínula apresentaram em sua maioria células espalhadas, aderentes, uninucleadas e dispostas em monocamada. A partir da concentração de 40mg/mL, algumas células apresentaram diminuição do volume celular com alteração de morfologia (Figuras 5F e 5G). Os efeitos citotóxicos ficaram bem visíveis, em 30 minutos, nas células HUVEC quando tratadas com antimicrobiano ampicilina a partir na concentração de 80mg/mL (Figuras 5H e 5I). Essas células sofreram alterações morfológicas apresentando forma de fuso, com células alongadas e projeções citoplasmáticas irregulares, além de diminuição do citoplasma e do volume celular. Além disso observou-se uma perda de adesão celular, à medida que a concentração do antimicrobiano ampicilina aumentava, o que culminou com uma diminuição do número de células em cultura.

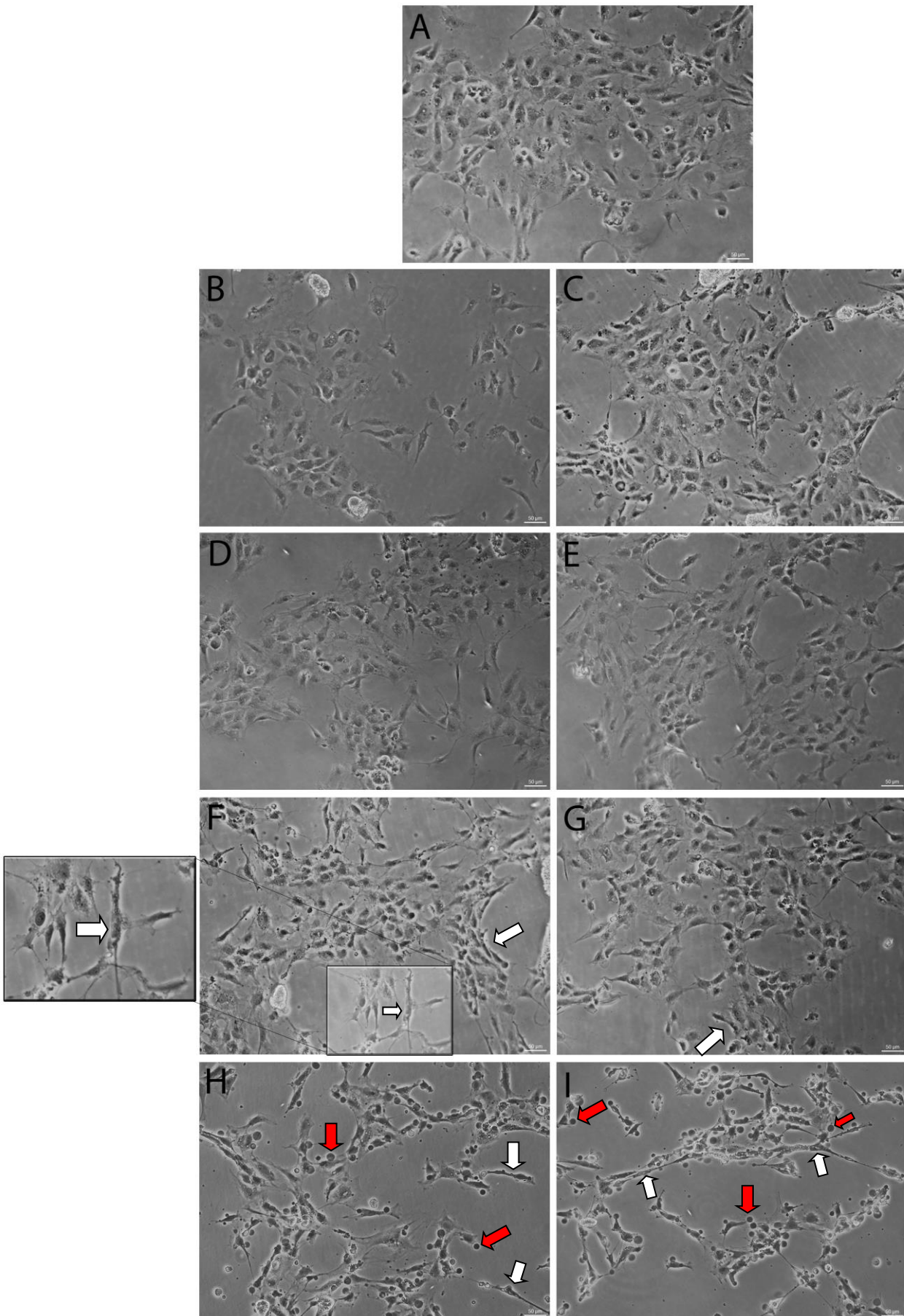


Figura 5. Avaliação morfológica das células endoteliais em concentrações crescentes de ampicilina por 30 minutos. A: Controle; B: 7 mg/mL; C:14 mg/mL; D:21mg/mL; E:28mg/mL; F:40mg/mL; G:60mg/mL; H:80mg/mL; I:100mg/mL. Seta branca- Diminuição do volume celular. Seta vermelha- Célula em processo de desadesão.

5.2 ANÁLISE CITOLÓGICA DAS CÉLULAS HUVEC

As HUVEC foram colocadas em cultura e submetidas à coloração por HE após tratamento com o antimicrobiano ampicilina, comparando-as com células não tratadas, utilizadas como controle. Na coloração pela HE os núcleos são corados pela hematoxilina, sendo evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizados em rosa. Observou-se que as HUVEC tratadas a partir da concentração de 40mg/mL (Figura 6F) exibiram alterações morfológicas como a diminuição do citoplasma e do volume celular e um acentuado decréscimo do número de células em cultura que se tornou mais evidente a medida que a concentração do antimicrobiano aumentava (Figuras 6G, 6H e 6I).

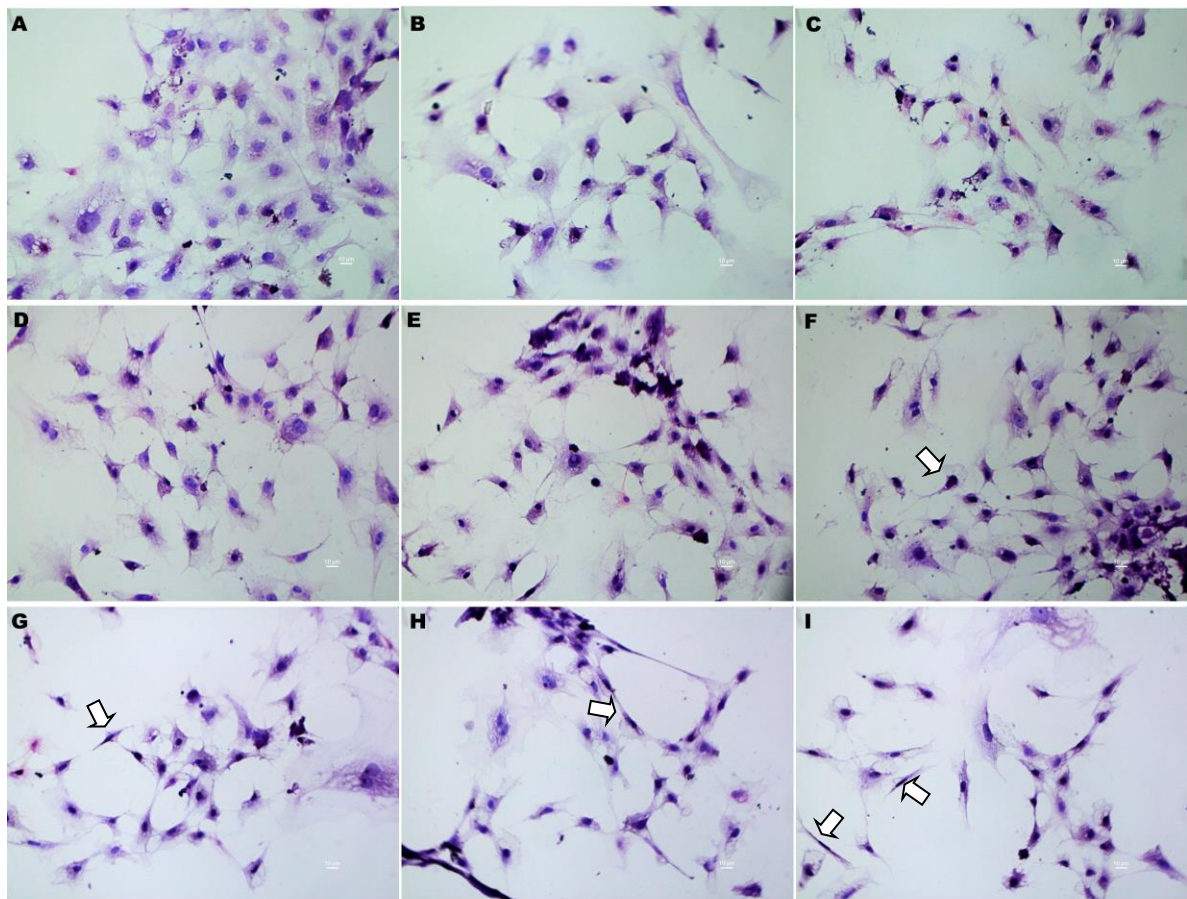


Figura 6. Avaliação citológica das células endoteliais em concentrações crescentes de ampicilina por 30 minutos. A: Controle; B: 7 mg/mL; C: 14 mg/mL; D: 21 mg/mL; E: 28 mg/mL; F: 40 mg/mL; G: 60 mg/mL; H: 80 mg/mL; I: 100 mg/mL. Seta branca- Diminuição do volume celular.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS HUVEC

Foi realizada quantificação das células HUVEC para verificação da adesão celular no grupo controle e no grupo das células tratadas com o antimicrobiano ampicilina nas concentrações de 07, 14, 21, 28, 40, 60, 80 e 100mg/mL. O resultado foi dado em números absolutos. Observou-se que a partir de 60mg/mL, ocorreu uma acentuada diminuição do número de células aderidas (Gráfico 1).

O teste estatístico *U Mann-Whitney* indicou que para o nível de significância de 0,05 a concentração na qual efetivamente as células morrem é igual ou maior do que 60mg/mL.

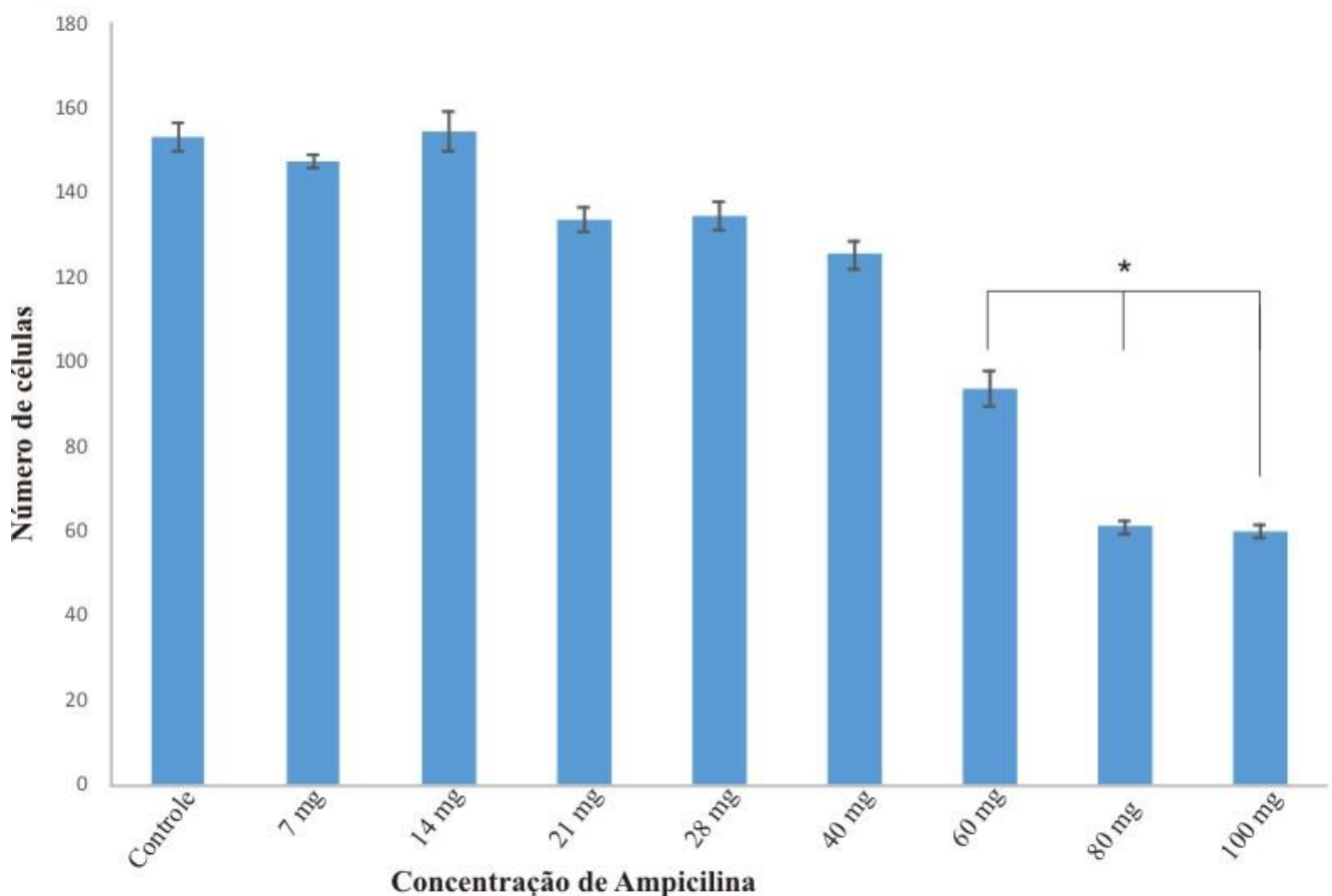


Gráfico 1. Quantificação de adesão das células HUVEC visualizadas por microscopia de contraste de fase no grupo controle e nas concentrações de 07, 14, 21, 28, 40, 60, 80 e 100mg/mL de ampicilina por 30 minutos. Análise estatística feita pelo *Teste U de Mann-Whitney*; * indica $p < 0,05$.

5.4 ANÁLISE DE MATRIZ EXTRACELULAR DAS CÉLULAS HUVEC (CÉLULAS DO GRUPO CONTROLE E CÉLULAS DO GRUPO TRATADO COM AMPICILINA)

Após a infusão do antibiótico ampicilina nas concentrações de 07, 14, 21, 28, 40, 60 e 100mg/mL por 30 minutos, foi feita a marcação com anti-fibronectina humana, anti-colágeno humano e anti-laminina humana, e realizada a comparação com a mesma marcação no grupo controle.

A imunomarcação nas células HUVEC no grupo controle para Fibronectina apresentou intenso arranjo fibrilar no entorno das células (Figura 7A). No grupo tratado com ampicilina na concentração de 40mg/mL mostrou importante diminuição da síntese desta proteína (Figura 7B), se intensificando com 80mg/mL (Figura 7C).

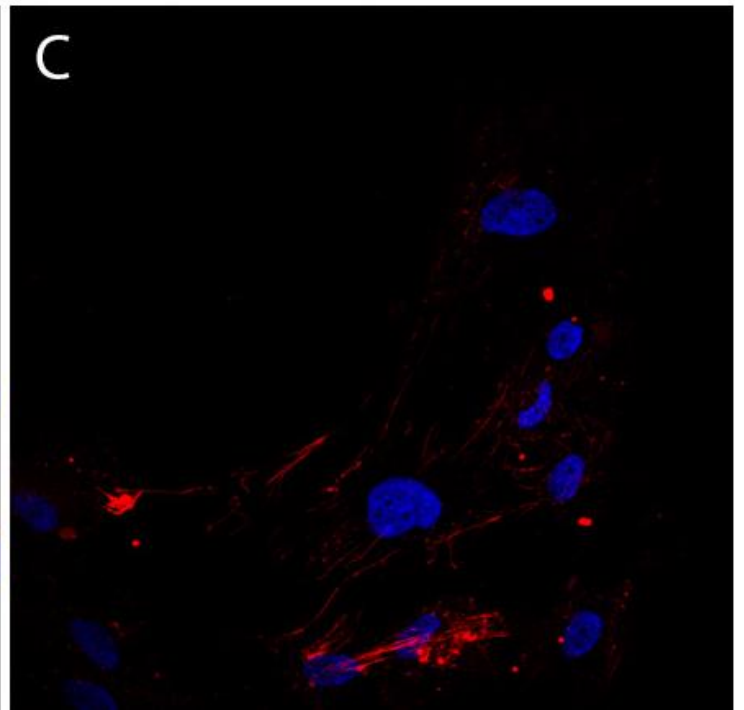
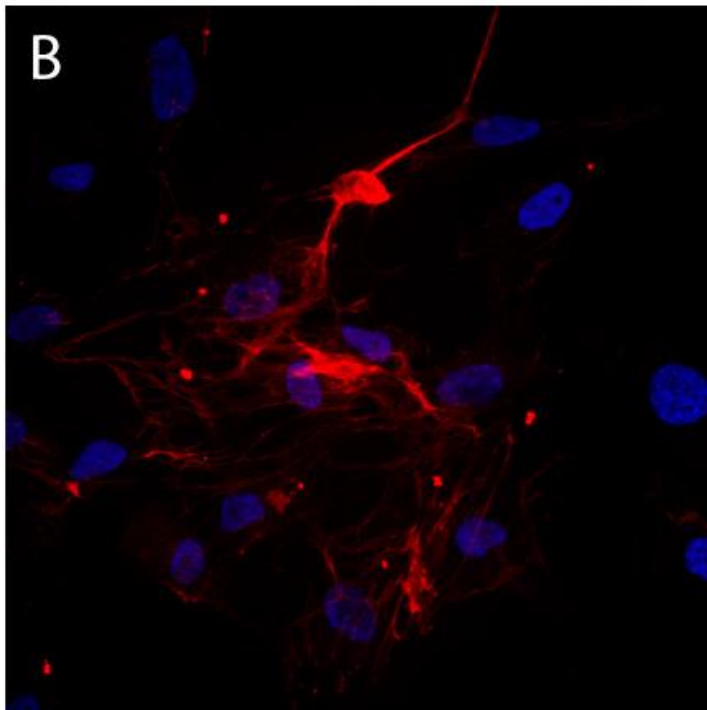
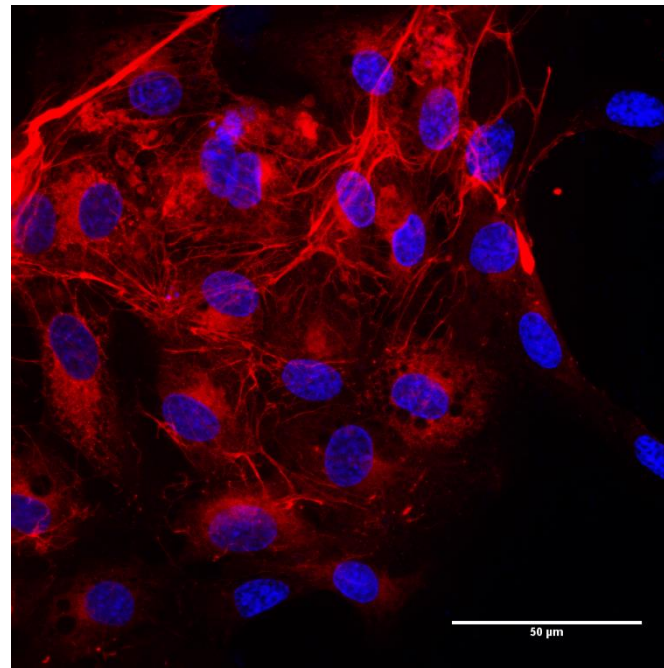


Figura7. Análise da distribuição de Fibronectina nas células HUVEC. A: HUVEC do grupo controle. B: HUVEC tratadas com 40mg/mL de ampicilina por 30 minutos. C: HUVEC tratadas com 80mg/mL de ampicilina por 30 minutos.

As células HUVEC no grupo controle apresentaram intensa distribuição do Colágeno IV com aspecto fibrilar e pontual percorrendo a superfície das células (Figura 8A). No grupo tratado com 28mg/mL as células apresentaram um rearranjo da distribuição fibrilar com aspecto entrelaçado e desorganizado (Figura 8B), embora se perceba uma diminuição da síntese desta proteína, na concentração de 60mg/mL (Figura 8C).

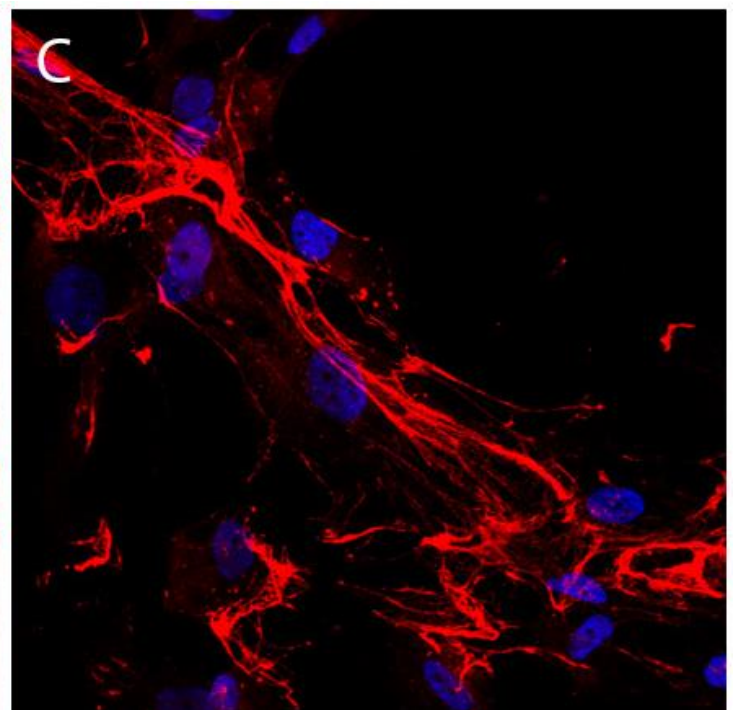
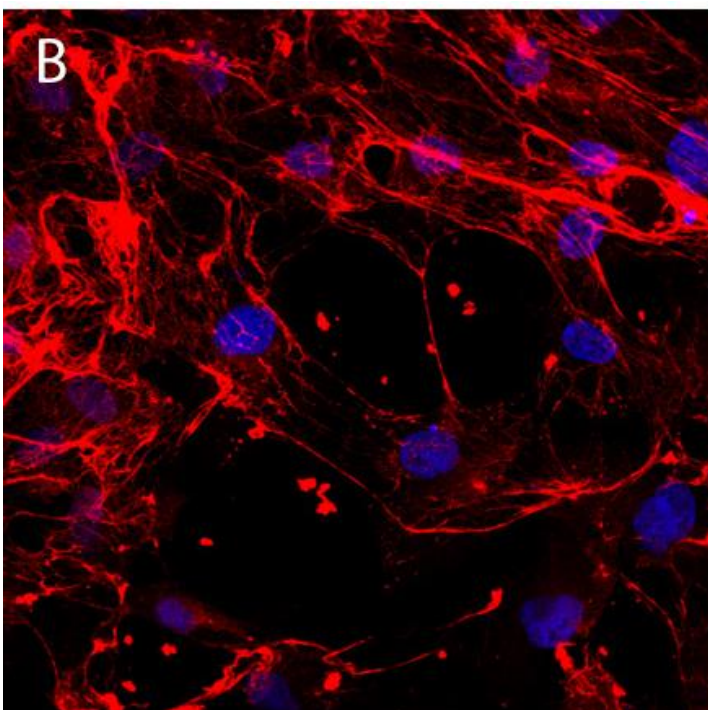
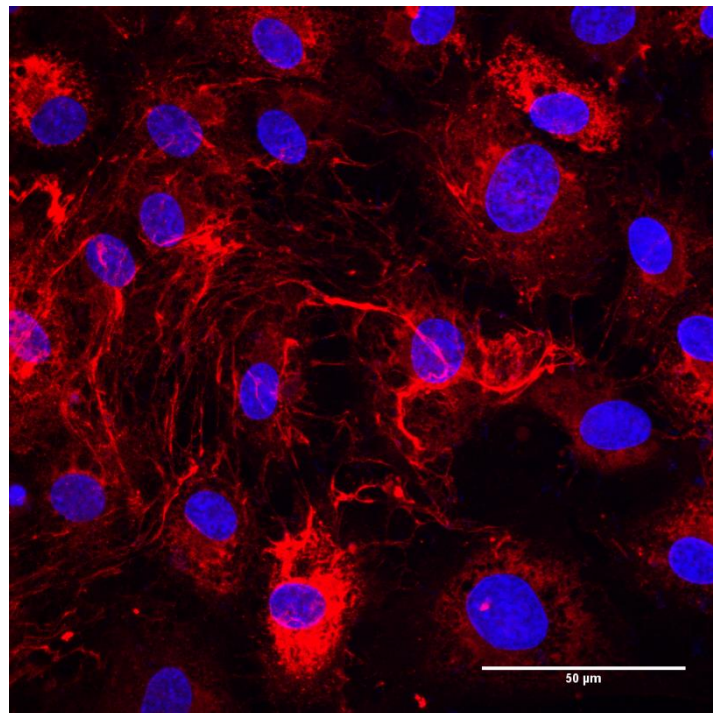


Figura 8. Análise da distribuição de Colágeno IV nas células HUVEC. A: HUVEC do grupo controle. B: HUVEC tratadas com 28mg/mL de ampicilina por 30 minutos. C: HUVEC tratadas com 60mg/mL de ampicilina por 30 minutos.

A imunomarcação das células HUVEC para Laminina apresentou um arranjo pontual no grupo controle (Figura 9A). Já a partir da concentração de 21mg/mL houve uma grande diminuição na expressão da glicoproteína (Figura 9B), se tornando bastante escassa a partir de 100mg/mL (Figura 9C).

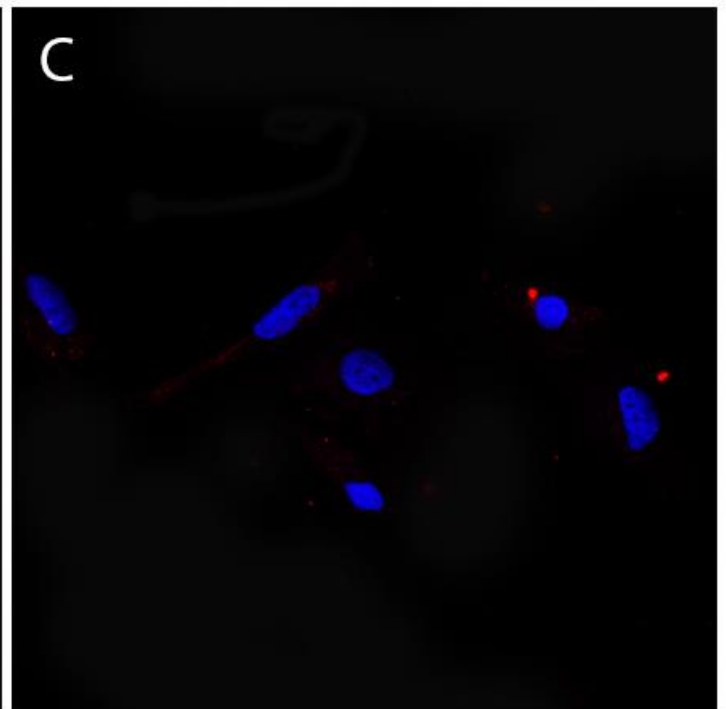
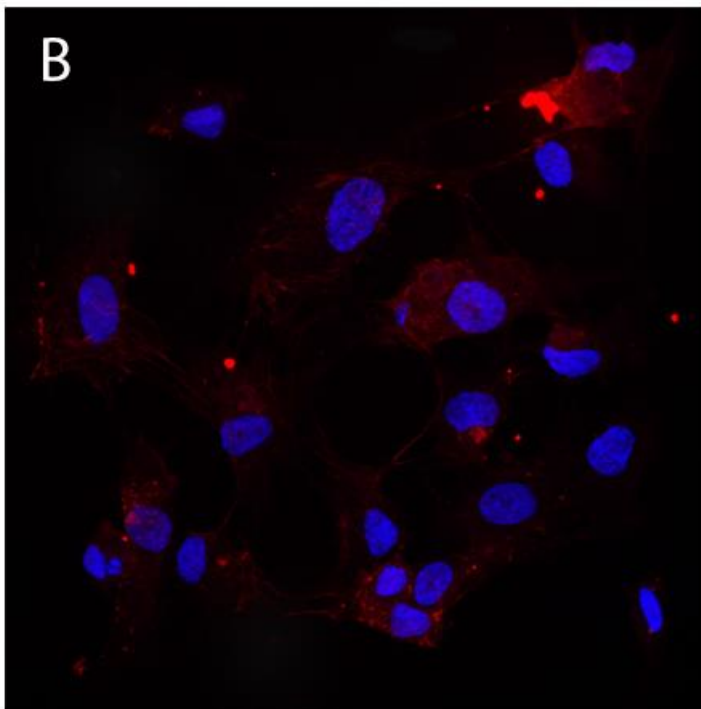
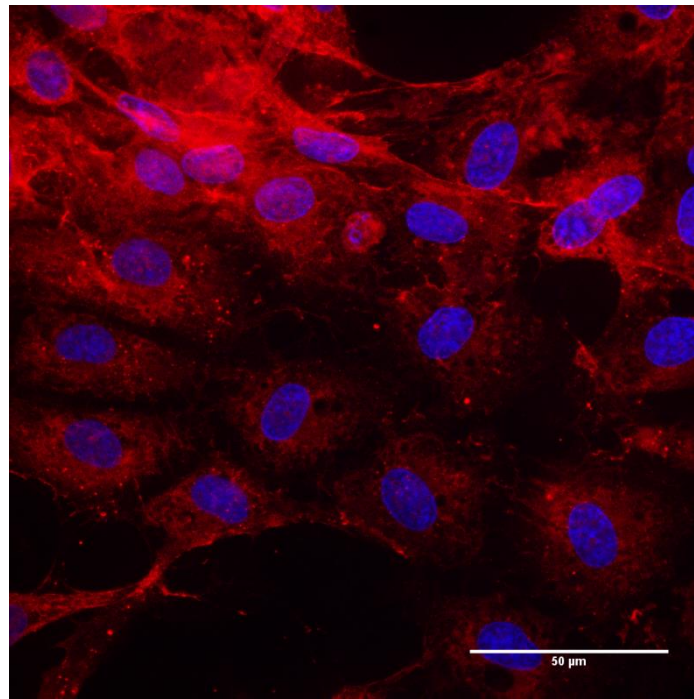


Figura 9. Análise da distribuição de Laminina nas células HUVEC. A: HUVEC do grupo controle. B: HUVEC tratadas com 21mg/mL de ampicilina por 30 minutos. C: HUVEC tratadas com 100mg/mL de ampicilina por 30 minutos.

Em todas as condições é possível perceber que o antimicrobiano ampicilina parece exercer uma influência sobre o arranjo das glicoproteínas da MEC da célula HUVEC.

5.5 DENSITOMETRIA POR FLUORESCÊNCIA

5.5.1 Fibronectina

Os resultados demonstraram que a glicoproteína de matriz extracelular FN, apresentou 100% de expressão nas células endoteliais do grupo controle. Nas células do grupo tratado com o antimicrobiano ampicilina, as concentrações de 40 e 80mg/mL mostraram uma maior diminuição da expressão e da FN como pode ser visualizado no gráfico 2. Este resultado sugere que as proteínas de matriz extracelular FN quando em contato com a ampicilina apresentaram alterações importantes na sua organização, com diminuição das interações celulares e da ancoragem apropriada da célula endotelial, provocando desadesão das células e destruição do endotélio.

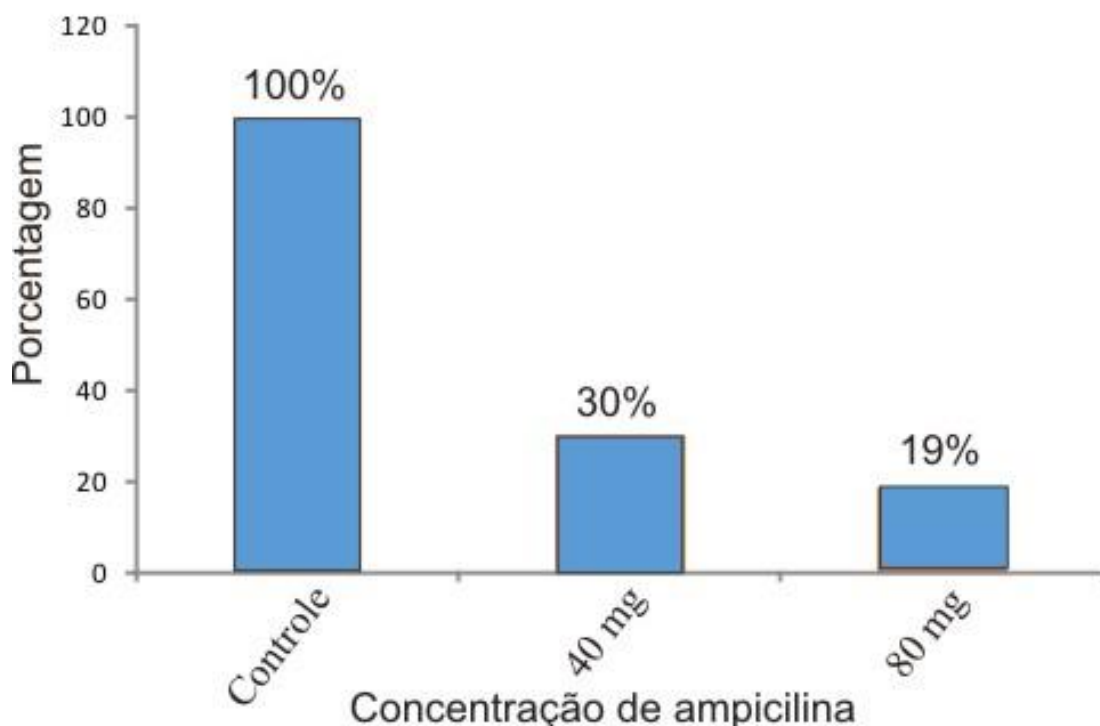


Gráfico 2. Densitometria de fluorescência da glicoproteína de matriz extracelular Fibronectina do controle e células do grupo tratado com concentrações de 40 e 80mg/mL do antimicrobiano ampicilina por 30 minutos.

5.5.2 Colágeno IV

Os resultados demonstraram que a glicoproteína de matriz extracelular COL IV, apresentou 100% de expressão nas células endoteliais do grupo controle. Nas células do grupo tratado com o antimicrobiano ampicilina, as concentrações de 28 e 60mg/mL mostraram uma maior diminuição da expressão e do COL IV como pode ser visualizado no gráfico 3. Este resultado sugere que a proteína de matriz extracelular COL IV quando em contato com a ampicilina apresentaram alterações importantes na sua organização, com diminuição das interações celulares e da ancoragem apropriada da célula endotelial, provocando desadesão das células e destruição do endotélio.

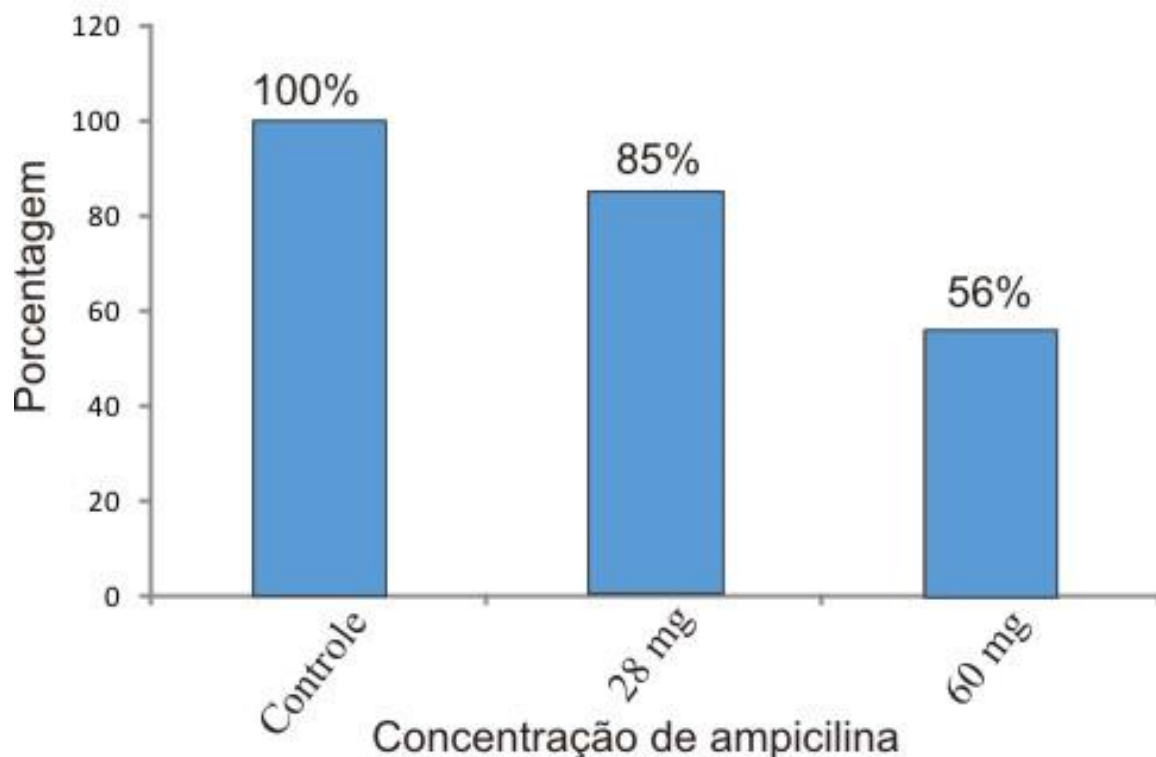


Gráfico 3. Densitometria de fluorescência da proteína de matriz extracelular e membrana basal Colágeno IV do controle e células do grupo tratado com concentrações de 28 e 60mg/mL do antimicrobiano ampicilina por 30 minutos.

5.5.3 Laminina

Os resultados demonstraram que a glicoproteína de matriz extracelular FN, apresentou 100% de expressão nas células endoteliais do grupo controle. Nas células do grupo tratado com o antimicrobiano ampicilina, as concentrações de 21 e 100mg/mL mostraram uma maior diminuição da expressão e da FN como pode ser visualizado no gráfico 4. Este resultado sugere que a proteína de matriz extracelular LN quando em contato com a ampicilina apresentaram alterações importantes na sua organização, com diminuição das interações celulares e da ancoragem apropriada da célula endotelial, provocando desadesão das células e destruição do endotélio.

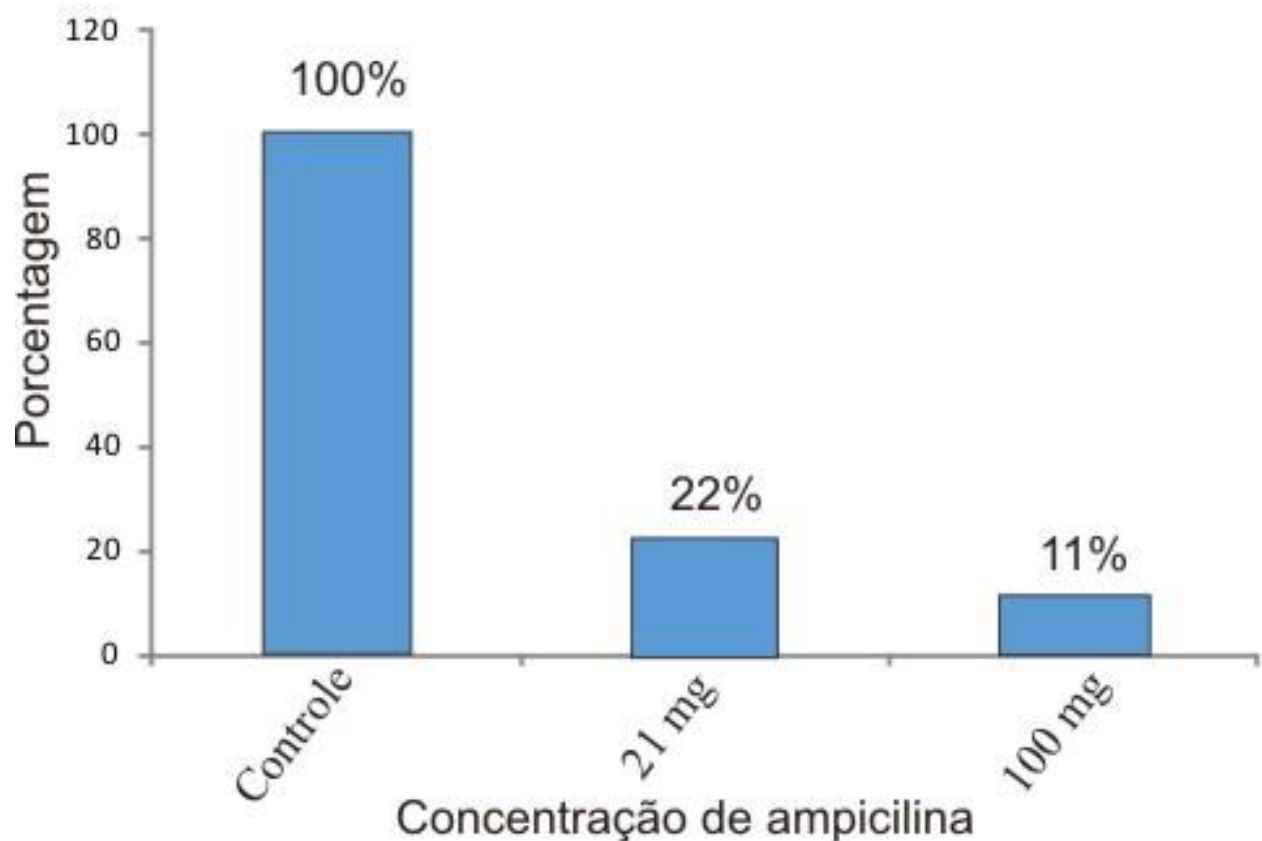


Gráfico 4. Densitometria de fluorescência da glicoproteína de matriz extracelular Laminina do controle e células do grupo tratado com concentrações de 21 e 100mg/mL do antimicrobiano ampicilina por 30 minutos.

5.6 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA VIABILIDADE COM A QUANTIFICAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DE MODELAGEM MATEMÁTICA

Os testes de viabilidade celular foram comparados com os resultados da pesquisa “Estudo experimental *in vitro* das Lesões endoteliais em recém-nascidos utilizando modelagem matemática: contribuições para a Enfermagem Neonatal” (SOARES, 2013) que originou este estudo. Como podemos observar nos gráficos 5 e 6, tanto o comportamento da viabilidade quanto o comportamento da quantificação se ajustam a curvas exponenciais muito semelhantes, no caso do ajuste feito para os dados da viabilidade celular, o parâmetro de ajuste $k=180$ enquanto na quantificação o mesmo parâmetro vale 200. Esta diferença justifica-se pelo fato de serem experimentos diferentes com tempos de exposição ao antimicrobiano também diferentes, onde no primeiro caso o tempo é de 2 horas e no segundo o tempo é de 30 minutos. Devido a semelhança dos resultados das modelagens matemáticas o experimento de quantificação se mostra como uma boa referência para os resultados que seriam obtidos com o experimento de viabilidade.

Os estudos de Soares (2013) mostram uma diminuição do número de células em cada condição, após quantificação (gráfico 5) e comparado com o que foi observado no experimento de viabilidade celular através de MTT. Observa-se a diminuição do número de células concomitante ao aumento da concentração de ampicilina. Com isso, evidencia-se que a partir da faixa concentração de 60mg/mL de ampicilina a viabilidade celular diminui por um período de 2 horas de exposição ao antimicrobiano. Da mesma forma, há diminuição do número de células em cada condição, após quantificação (gráfico 6). Observa-se a diminuição do número de células conforme aumentos da concentração de ampicilina. Esses dados sugerem que, a partir da faixa concentração de 60mg/mL de ampicilina, a viabilidade celular diminui por um período de 30 minutos de exposição ao antimicrobiano.

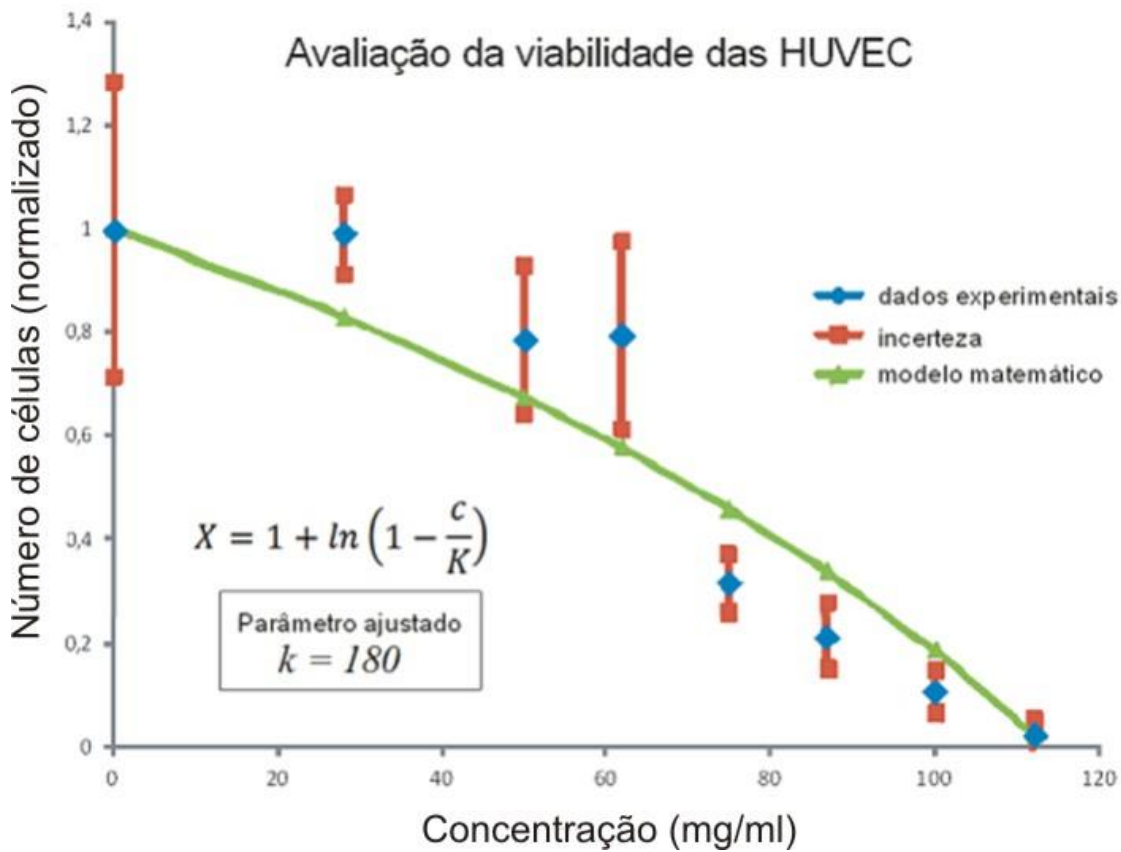


Gráfico 5. Avaliação da viabilidade das HUVEC por modelagem matemática (SOARES,2013).

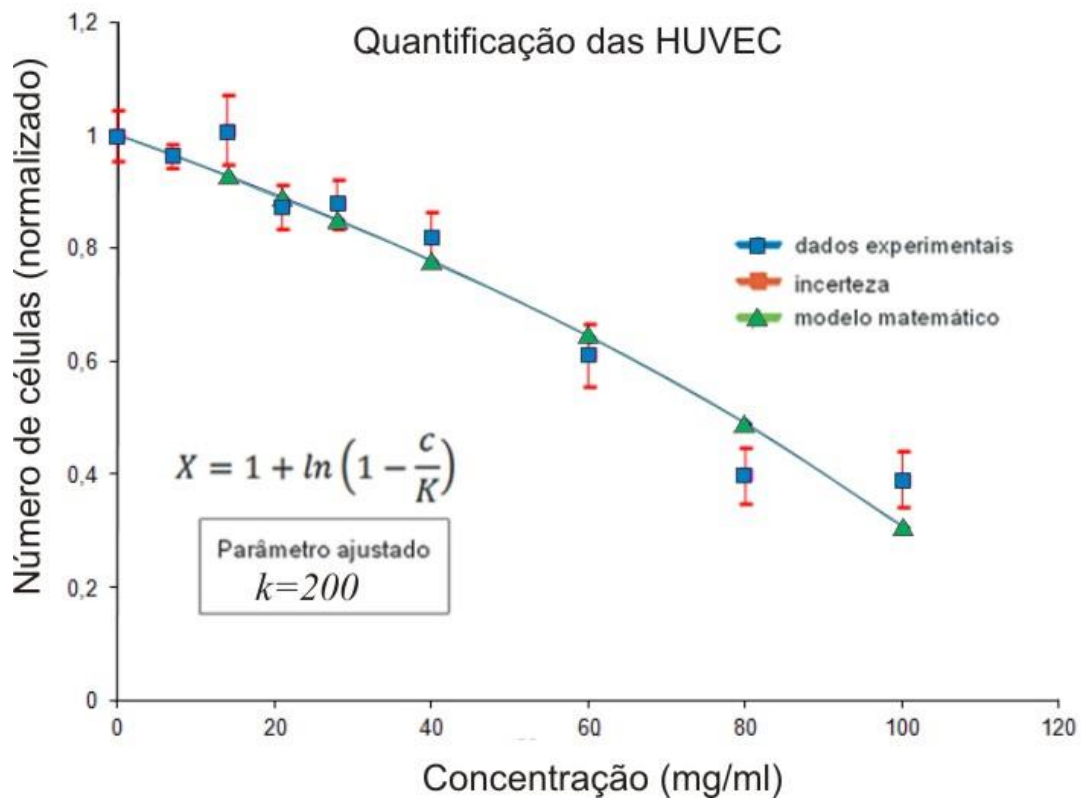


Gráfico 6. Quantificação das HUVEC por modelagem matemática.

Ambos os gráficos 5 e 6 mostram os dados experimentais e os resultados do modelo matemático. O resultado da modelagem, em cor verde, apresenta um bom ajuste com os dados experimentais, ou seja, os dados experimentais (pontos azuis) estão próximos da curva (linha verde). O ajuste sugere que as incertezas dos dados experimentais foram levemente sub-estimadas. O parâmetro K foi determinado através do método dos Mínimos Quadrados Não Lineares (Cunha, 2003). Este método determina o parâmetro K de modo que o erro quadrático do dado real e do dado modelado seja minimizada.

Todos os resultados apresentados nesta dissertação foram realizados em triplicata.

6 DISCUSSÃO

Como o objetivo de analisar a ação do antimicrobiano ampicilina e os seus efeitos nas células endoteliais humanas, *in vitro*, este estudo foi realizado com células de cordão umbilical humano (HUVEC), cultivadas como previamente descrito por ALVES *et al.* (2011).

As células HUVEC tem sido um dos modelos mais frequentemente utilizados para estudar a angiogênese *in vitro*. Estas células proliferam ativamente e mantêm a sua morfologia, além de serem de obtenção e manutenção relativamente fáceis (GIFFORD *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (BEHRENDT e GANZ, 2002). Em condições normais, as células endoteliais aderem umas às outras e interagem com células circulantes do sangue. Citocinas pró-inflamatórias, vírus, bactérias e fatores de crescimento podem alterar a função de barreira do endotélio (BOGATCHEVA, GARCIA & VERIN, 2002). Além disso, devido a sua disposição e função que se assemelham a um epitélio (RISAU, 1995), também atuam como barreira semipermeável entre a circulação sanguínea e a parte tecidual, mantidas por interações célula-célula e célula-matriz.

Jaffe e colaboradores (1973) realizaram trabalho com células endoteliais de cordão umbilical humano, para identificação celular por critérios morfológicos e imunológicos e mostraram que, após cultivo, as células apresentavam crescimento em monocamada, com células poligonais, com núcleo centralizado e bordas celulares indistinguíveis.

Os resultados apresentados neste trabalho de morfologia celular e histologia foram visualizados por microscopia de contraste de fase e também por marcação celular com hematoxilina e eosina, que são corantes adequados para evidenciar características estruturais. As células HUVEC, antes do tratamento com ampicilina, apresentaram-se aderentes, em formato espreado, uninucleadas e em monocamada. Após o tratamento com a ampicilina, no período de 30 minutos, as células demonstraram variações importantes na sua arquitetura tais como

diminuição do citoplasma e do volume celular. Além disso, as células HUVEC em cultura, a partir do aumento de concentração da ampicilina, diminuíram abruptamente em número, como verificado através de quantificação celular em que a partir da concentração de 60mg/mL do antimicrobiano, apresentou significância estatística para desadesão das HUVEC ($p < 0,05$), sugerindo que o medicamento atua como um potente causador de injúria celular *in vitro*.

Lesões observadas na clínica, dependendo do potencial vesicante da droga, podem levar a um quadro de flebite, caracterizando-se por apresentar células endoteliais da parede venosa, que apresentam processo inflamatório e com aspecto irregular, permitindo aderência de plaquetas e predispondo a veia à flebite (HARRIGAN, 1984). Silva (1992) descreveu que as drogas podem ser classificadas em vesicantes, se causarem danos gerados no sítio de inserção, desencadeando necrose tecidual, após extravasamento. Essas informações estão diretamente relacionadas com a concentração e com o pH dos medicamentos utilizados nesse estudo. Risau (1995) mostrou que a célula endotelial é sensível a sinais variáveis, seja em um estado quiescente, não proliferativo ou em um estado dito ativado, típico dos processos angiogênico e inflamatório. Trabalho realizado por Drouet *et al.* (2015a), faz a recomendação de novas formas de utilização do antimicrobiano vancomicina por via periférica para prevenção de irritação venosa e flebite localizada.

A MEC é uma rede complexa de macromoléculas importantes para as funções celulares e arquitetura dos tecidos, proporcionando suporte e resistência. Proteínas, polissacarídeos e fatores de crescimento são componentes da MEC. As células endoteliais precisam aderir a matriz extracelular para proliferar, migrar, estabelecer polaridade, formar tubos e manter um formato celular apropriado a angioarquitetura. A adesão endotelial a MEC é essencial à sobrevivência e estabilização endotelial. A adesão a matriz extracelular é uma das condições que regulam a sobrevivência da célula endotelial que quando impedida de aderir ao substrato entra em apoptose (RE *et al.*, 1994). Sinalizações químicas e biofísicas do microambiente circundantes à célula são necessárias para a manutenção da homeostase celular, em que as células permanecem íntegras funcional e morfológicamente (MURPHY-ULRICH, 2001). Em caso de desestabilização do contato célula-matriz, ocorre uma retração da célula, o que provoca perda da aderência com a matriz extracelular e a células

vizinhas. Neste caso, é possível que se inicie o processo de apoptose (ALVES *et al.*, 2011) dependente de caspases e com isso levar a uma rápida involução das estruturas vasculares (MERIDITH *et al.*, 1993). Caso a diminuição das adesões intercelulares ou adesões a matriz da célula seja suficiente para impedi-la de interagir com as células vizinhas e/ou com o substrato, a célula se destaca e morre por apoptose (MURPHY-ULRICH, 2001).

Dentre os constituintes da MEC referenciam-se vários tipos de macromoléculas (proteoglicanas e glicosaminoglicanas) além das proteínas fibrosas como colágeno e elastina, ambas com função estrutural e as glicoproteínas adesivas como, laminina, tenascina e fibronectina (POTTS e CAMPBELL, 1996). Neste trabalho podemos observar que tanto o Colágeno IV quanto as glicoproteínas Fibronectina e Laminina em células HUVEC foram expressas em abundância no grupo controle. Entretanto, após à exposição ao antimicrobiano ampicilina, verificou-se um decréscimo da síntese dessas proteínas a medida que a concentração do antibiótico aumentava. As células foram visualizadas por fluorescência e quantificadas por densitometria. Este resultado sugere que as proteínas de MEC Fibronectina, Colágeno IV e Laminina quando em contato com a ampicilina apresentaram alterações importantes na sua organização, com diminuição das interações celulares e da ancoragem apropriada da célula endotelial, provocando desadesão das células e destruição do endotélio.

A interação entre esse complexo protéico e fibroso, proteínas solúveis e receptores de superfície influencia muitas propriedades das células (BORNSTEIN, 2002). A Laminina é uma glicoproteína associada à membrana basal que funciona como adesina, ligando as células basais do epitélio ao Colágeno IV. Tem sido relacionada diretamente a estágios avançados de diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas, por interagir com as integrinas e outros componentes da superfície celular assim como controlar a migração celular, polarização, proliferação e apoptose (KOSMEHL *et al.*, 1999).

Sendo assim, as células endoteliais são os primeiros componentes do sistema vascular expostos aos fatores de risco, que podem levar a consequências celulares drásticas tais como a injúria vascular e a outras patologias decorrentes

desse processo, como câncer, por exemplo, discutido pelo nosso grupo em Lima *et al* (2012).

Nesse trabalho a modelagem matemática foi utilizada como argumento qualitativo na comparação de dois experimentos: viabilidade celular e quantificação. A modelagem matemática de fenômenos biológicos não é capaz de prever ou fornecer resultados milimetricamente precisos, mas pode fazer a avaliação qualitativa. Especialmente no sentido de se simularem fenômenos que estabelecem cenários que iriam resultar de estratégias adotadas. Estes cenários não vão ser exatamente precisos, mas são suficientes para indicarem possíveis situações que podem ser adotadas ou evitadas.

Nesse estudo, a modelagem matemática poderá colaborar no sentido de ser possível prever, entre as concentrações já estudadas, que em determinada concentração de ampicilina, qual o número de células por condição, pela aplicação da equação $X=1+\ln(1-c/K)$, sem que haja necessidade de novos experimentos, que demandaria em tempo e custo.

6.1 IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA DE ENFERMAGEM NEONATAL

O planejamento dos cuidados aos recém-nascidos que necessitam de terapia intravenosa deve ser baseado em diretrizes que englobem a escolha do melhor tipo de acesso e dispositivos intravasculares, considerando a duração da terapia, as características e compatibilidade entre os fármacos e avaliação das condições da rede venosa. A qualidade na terapia intravenosa é alcançada quando conseguimos reduzir as complicações relacionadas, o número de punções, custos, a otimização o trabalho e a segurança. Contudo, se a prática da terapia intravenosa é desenvolvida através de procedimentos técnicos isolados, sem diretrizes que norteiem toda a equipe, os índices de complicações tendem a aumentar, comprometendo a segurança do paciente e do profissional de saúde (RODRIGUES, 2008). As características físico-químicas dos fármacos administrados nos recém-nascidos, através das veias periféricas, são um dos fatores determinantes para ocorrência dos efeitos adversos relacionados à terapia intravenosa e a perda do acesso venoso. Os níveis de pH, osmolaridade e a compatibilidade entre os fármacos contribuem

para a ocorrência de flebite, infiltração e extravasamento (RODRIGUES, 2008; GOMES *et al.*, 2011).

Os antimicrobianos estão entre os principais fármacos utilizados em recém-nascidos e quando infundidos por veias periféricas ocasionam efeitos adversos como o desgaste da rede venosa e falhas de infusão.

Estudos demonstraram que antibióticos tais como vancomicina, anfotericina B e β -Lactam aumentam o risco de flebite e são capazes de induzir uma resposta inflamatória e apoptose celular (CAMPBELL, 1998). O endotélio controla a permeabilidade e o tônus vascular, regula a coagulação e trombose e direciona a passagem de leucócitos para as áreas de inflamação. Desarranjos nas funções normais do endotélio podem contribuir para uma resposta inflamatória falha levando a inflamação sistêmica e falha múltipla dos órgãos (HACK e ZEERLEDER, 2001). Células endoteliais exercem um papel importante nos estágios iniciais da inflamação, uma vez que regulam o recrutamento de células inflamatórias através da expressão de receptores de superfície, produção de quimiocinas e alteração da permeabilidade vascular (POBER e COTRAN, 1990; MANTOVANI, BUSSOLINO & DEJANA, 1992). Drouet e colaboradores (2015b) demonstraram a necessidade de mais pesquisas na prevenção da flebite, quando do uso de vancomicina associada a outros medicamentos e maior conhecimento dos mecanismos de incompatibilidade de drogas.

Os achados deste estudo *in vitro* sugerem que na concentração de 40mg/mL, a ampicilina já ocasiona lesões em nível celular, o que poderia levar ao entendimento do processo de desgaste da rede venosa observado nos recém-nascidos que utilizam esse antimicrobiano por via periférica. No entanto, deve-se ter cautela em relação a extrapolações de trabalhos *in vitro* para o *in vivo* o que poderia gerar resultados que não representam a realidade em indivíduos. Estudos adicionais são necessários para que possamos avaliar a relação tempo de infusão/concentração e a viabilidade celular.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo, tivemos como foco a administração do antimicrobiano ampicilina e os seus efeitos nas células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), na tentativa de aproximar um modelo *in vitro*, com o que é encontrado na prática clínica. Concluímos que:

- As células HUVEC em cultura sofreram alterações morfológicas a partir da concentração de 40mg/mL de ampicilina.
- O tratamento das células em cultura com ampicilina apresentou uma diminuição celular significativa a partir de 60mg/mL, sendo intensificada pelo aumento da concentração.
- A glicoproteína de MEC Fibronectina, quando em contato com a ampicilina na concentração de 40mg/mL mostrou importante diminuição da síntese desta proteína, se intensificando com 80mg/mL.
- A proteína de MEC Colágeno IV quando em contato com a ampicilina na concentração de 28mg/mL apresentou um rearranjo da distribuição fibrilar para um aspecto entrelaçado e desorganizado, embora se perceba uma diminuição da síntese desta proteína, na concentração de 60mg/mL.
- A glicoproteína de MEC Laminina quando em contato com a ampicilina na concentração de 21mg/mL apresentou uma grande diminuição na expressão da glicoproteína, se tornando bastante escassa a partir de 100mg/mL.

Com esse estudo, pretendemos gerar evidências para a prática clínica, contribuindo para a evolução da Enfermagem Neonatal e áreas afins.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar os efeitos do antimicrobiano ampicilina nas HUVEC de cordão umbilical de RN prematuro.
- Ilustrar o processo de morte celular através do efeito dinâmico por vídeomicroscopia, no decorrer do tempo de exposição ao antimicrobiano ampicilina nas HUVEC.
- Analisar a ação dos glicosaminoglicanos (GAGs) na expressão de proteínas da MEC das células HUVEC em contato com o antimicrobiano ampicilina.
- Estudar as possíveis vias de sinalização envolvidas na morte das HUVEC expostas ao antimicrobiano ampicilina.
- Contribuir com o levantamento de novos saberes na Enfermagem Neonatal e áreas afins, com dados inéditos sobre a ação do antimicrobiano ampicilina sobre as HUVEC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLFOTOUH, M. A.; SALAM, M.; BANI-MUSTAFA. Prospective study of incidence and predictors of peripheral intravenous catheter-induced complications. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 10:993-1001, 2014.

ACRED, P, BROWN, D. M.; TURNER, D. H.; WILSON, M. J. Pharmacology and chemotherapy of ampicillin--a new broad-spectrum penicillin. *Br J Pharmacol Chemother*. 18:356–369. 1962.

ALBERTS, M. J. Hyperacute stroke therapy with tissue plasminogen activator. *Am J Cardiol.*, 28; 80(C):29D-34D, 1997.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2010.

ALEXANDER, V. N.; NORTHRUP, V. B.; MATTHEW J. Antibiotic Exposure in the Newborn Intensive Care Unit and the Risk of Necrotizing Enterocolitis. *J Pediatr*. September. 159(3), 2011.

ALVES, Ivanize Almeida Lino. Incidência de flebite em recém-nascidos de um berçário de um hospital de ensino: um constituinte da qualidade da assistência de enfermagem. Monografia. *São Paulo; s.n; 2009*.

ALVES, T.; da FONSECA, A.C.; NUNES S.S.; da SILVA A.O.; DUBOIS L.G.F.; KAHN S.A.; VIANA N.B.; MARCONDES, J.; LEGRAND, C.; MOURA NETO, V.; MORANDI, V. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental Cell Research*. v. 317, p. 2073-2085, 2011.

AMERICAN NURSES ASSOCIATION. The National Database of Nursing Indicators (NDNQI), 2007..

ARMBRUSTER, C.; ROBIBARO, B.; GRIESMACHER, A.; VORBACH, H. Endothelial cell compatibility of trovafloxacin and levofloxacin for intravenous use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45, 2000.

BAHIA, L. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 50, n. 2, Apr. 2006.

BAKKEN, S. e JONES, D. A. Contributions to translational research for quality health outcomes. *Nursing Research*. Mar-Apr; 55(2):S1-2. 2006.

BASTOS. M. L. A. Pesquisa Básica Experimental em Enfermagem. *Rev enferm UFPE on line.*, Recife, 7(esp), mar., 2013.

BATALHA, L. M. C.; COSTA, L. P. S.; ALMEIDA, D. M. G.; LOURENÇO, P. A. A.; GONÇALVES, A. M. F. M.; TEIXEIRA, A. C. G. Fixação de cateteres venosos periféricos em crianças: estudo comparativo. *Esc. Anna Nery (impr.)* 14(3). 2010.

BEHRENDT, D. e GANZ, P. Endothelial function: from vascular biology to Clinical applications. *Am J Cardiol*. 90(10C): 40L-8. 2002.

BOHONY, Jo. 9 Common IV complications and what to do about them. *American Journal of Nursing*. October, 1993.

BOGATCHEVA, N. V.; GARCIA, J. G. N.; VERIN, A. D. Molecular Mechanisms of Thrombin-Induced Endothelial Cell Permeability. *Biochemistry (Moscow)*. 67(1):75-84, 2002.

BORMAN, H.; TUNCALI, D.; APAK, A.; KOSTAKOGLU, N. Progressive gangrene of hand following extravasation of antibiotics associated with hereditary resistance to activated protein C. *Ann Plast Surg*, 41(2), 1998.

BORNSTEIN, P. e SAGE, E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opin of Cell Biol*. 14:608-16, 2002.

BRASIL. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos / Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 3ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde. Brasília, 2012.

BUTCHER, E. C. Leukocyte-Endothelial Cell Recognition: Three (or More) Steps to Specificity and diversity. *Cell*, Vol 67, 1991.

CAMPBELL, L. - Related phlebitis, complications and length of hospital stay:1. *Br J Nur.* 7:1305-1311, 1998.

CARDOSO, Juliana Maria Rêgo Maciel. RODRIGUES, Elisa da Conceição. RODRIGUES, Benedita Maria Rêgo Deusdará. PACHECO, Sandra Teixeira de Araújo. FARIA, Jane Cristina de Oliveira. Escolhas de veias periféricas para terapia intravenosa em recém-nascidos pela equipe de enfermagem. *Rev Rene*, Fortaleza, abr/jun; 12(2):365-73. 2011.

CLARK, E, *et al.* Reducing risk of harm from extravasation. A 3-Tiered Evidence-Based List of Pediatric Peripheral Intravenous Infusates *Journal of Infusion Nursing*, 36(1), 2013.

COLLEN, D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost* 82: 259-270, 1999.

CUNHA, M., C. Métodos Numéricos para as Engenharias e Ciências Aplicadas,, Editora da UNICAMP, Campinas, 2ª edição, 2003.

DANSKI, M. T. R. MINGORANCE, P. JOHANN, D. A. VAYEGO, S. A. LIND, J. Incidência de complicações locais e fatores de risco associados ao cateter intravenoso periférico em neonatos. *Rev Esc Enferm USP* , 50 (1), 2016.

DRAKE, T. A.; MORRISSEY, J. H.; EDGINGTON, T., S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134: 1087-1097, 1989.

DROUET, M.; CHAI, F.; BARTHÉLÉMY, C.; LEBUFFE, G.; DEBAENE, B.; DÉCAUDIN, B.; ODOU, P. Influence of Vancomycin Infusion Methods on Endothelial Cell Toxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 2015a.

DROUET, M.; CHAI, F.; BARTHÉLÉMY, C.; LEBUFFE, G.; DEBAENE, B.; DÉCAUDIN, B.; ODOU, P. Endothelial cell toxicity of vancomycin infusion combined with other antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 2015b.

ENGBRING, J. A.; KLEINMAN, H.K. The basement membrane matrix on malignancy. *J Pathol*, 200: 465-470. 2003.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, X(3), 1929.

FRANCO, R. F. et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation *BLOOD*, Vol. 96, N. 2, 2000.

GALLOTTI, Renata Mahfuz Daud. Eventos adversos: o que são?. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo , v. 50, n. 2, p. 114, Apr. 2004 .

GIFFORD, E. V.; KOHLENBERG, B. S.; HAYES, S. C.; ANTONUCCIO, D. O.; PIASECKI, M. M.; RASMUSSEN-HALL, M. L.; PALM, K. M.. Acceptance theory-based treatment for smoking cessation: An initial trial of Acceptance and Commitment Therapy. *Behavior Therapy.*, 35:689-705, 2004.

GOFF, D. A.; LARSEN, P.; BRINKLEY, J.; ELDRIDGE, D.; NEWTON, D.; HARTZOG, T.; REIGART, J. Resource Utilization and Cost of Inserting Peripheral Intravenous Catheters in Hospitalized Children. *Hospital Pediatrics*. 3;85, 2013.

GOMES A. C .R.; da SILVA, C. A. G.; GAMARRA, C. J.; FARIA, J. C. O.; AVELAR, A. F. M; Elisa RODRIGUES, E. Assessment of phlebitis, infiltration and extravasation events in neonates submitted to intravenous therapy. *Escola Anna Nery*, v. 15, p. 472-479, 2011.

HACK, C., E.; ZEERLEDER, S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 29: 521-527, 2001.

HARRIGAN, C. A. A cost-effective guide for the prevention of chemical phlebitis caused by the pH of the pharmaceutical agent. *Nit A*. Nov-Dec. 7(6):478-82, 1984.

HFE. Manual de Medicamentos Injetáveis Padronizados. 2015. Disponível em: <<http://www3.ghc.com.br/PROT/PAHF/files/Manual%20de%20Dilui%C3%A7%C3%A3o%20de%20Medicamentos%20UTI%20Neonatal%20HF.pdf>>

INFUSION NURSES SOCIETY. Infusion nursing standards of practice. J Infus Nurs [Internet]. 34(1S), 2011.

IOACHIM, E.; CHARCHANTI, A.; BRIASOULIS, E.; KARAVASILIS, V.; TSANOU, H.; ARVANITIS, D.L.; AGNANTIS, N.J.; PAVLIDIS, N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. European Journal of Cancer, v. 38, p. 2362-2370, 2002.

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. Nov;52(11):2745-56, 1973.

KILIC, B.; KRUSE, M.; STAHLMANN, R. The in vitro effects of quinupristin/dalfopristin, erythromycin and levofloxacin at low concentrations on the expression of different cell adhesion molecules on the surface of endothelial cells (Eahy926). Toxicology 218, 2006.

KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; STRASSBURGER, S.; BORSI, L.; ROUSSELLE, P.; MANDEL, U.; HYCKEL, P.; ZARDI, L.; KATENKAMP, D. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer. Nov;81(6):1071-9, 1999.

KREIMER, F., AGUIAR, J. L. DE A., CASTRO, C., M., M., B., LACERDA, M., C., REIS, T., LISBOA, JUNIOR, F. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. Acta Cirúrgica Brasileira , 20 (1), 2005.

KRUSE, M.; KILIC, B.; FLICK, B. Effect of quinupristin/dalfopristin on 3T3 and Eahy926 cells in vitro in comparison to other antimicrobial agents with the potential to induce infusion phlebitis Arch Toxicol, 81, 2007.

KUPPALA, V. S.; MEINZEN-DERR, J.; MORROW, A. L.; SCHIBLE, K. R. Prolonged Initial Empirical Antibiotic Treatment is Associated with Adverse Outcomes in Premature Infants. *J Pediatr.* 159(5), 2011.

LANBECK, P.; ODENHOLT, I.; RIESBECK, K. Dicloxacillin and erythromycin at high concentrations increase ICAM-1 expression by endothelial cells: a possible factor in the pathogenesis of infusion phlebitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 2004.

LANBECK, P.; PAULSEN, O. Cytotoxic effects of four antibiotics on endothelial cells. *Pharmacology & Toxicology*, 77, 1995.

LANBECK, P.; PAULSEN, O. Short-Term Effects of Four Antibiotics on DNA Synthesis in Endothelial Cells. *Pharmacology & Toxicology* 88, 2001.

LEAPE, L. L. et al. The nature of adverse events in hospitalized patients. *The New England Journal of Medicine*, 324(6), 1991.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)*. Oct;232(9):1121-9, 2007.

LIDINGTON, E. A. MCCORMACK, A. M. ROSE, M. L. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *TransplantImmunology* 7:239-246, 1999.

LIMA, F. R. S. ; KAHN, S. A. ; SOLETTI, R. ; BIASOLI, D. ; ALVES, T. ; da FONSECA, A. C. C. ; GARCIA, C. ; ROMAO, L. ; BRITO, J. ; HOLANDA-AFONSO, R. ; FARIA, J. C. O.; BORGES, H. ; MOURA-NETO, V. . Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta, CR. Reviews on Cancer*, v. 1826, p. 338-349, 2012.

LJUBIMOVA, J.L.; FUJITA, M.; KHAZENZON, N. M.; LJUBIMOV, A. V.; BLACK, K. Changes in laminin isoform associated with brain tumor invasion and angiogenesis. *Frontiers in Biosci.* 11:81-88, 2006.

LOCHTER, A.; BISSEL, M. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Cancer Biology*, v. 6, p. 165-173, 1995.

LOPES, A., A., B.; MAEDA, N. Y.; BYDLOWSKI, S., P. Fator von Willebrand e disfunção endotelial pulmonar. Implicações prognósticas. Arq. Bras. Cardiol, São Paulo, v. 70, n. 3, Mar. 1998.

MANON-JENSEN, T.; KJELD N. G.; KARSDAL M. A. Collagen-mediated hemostasis. J Thromb Haemost. 14: 438–48,. 2016.

MANTOVANI, A.; BUSSOLINO, F.; DEJANA, E. Cytokine regulation of endothelial cell function. FASEB J. 6(8):2591-9, 1992.

MENDES KDS, SILVEIRA RCCP, GALVÃO CM. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. Texto contexto - enferm. Out-Dec; 17(4):758-64, 2008.

MENEZES, S.O. de. Avaliação do acesso vascular em neonatos com menos de 1500 g internados em unidades neonatais da SMS do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Pós-graduação em Saúde da Criança e da Mulher, Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

MERIDITH, J.; E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M., A. The extracellular matrix as a cell survivor factor. Mol. Biol. Cell. 4:953-961, 1993.

MILLROSE, M.; KRUSE, M.; FLICK, B.; STAHLMANN, R. Effects of macrolides on proinflammatory epitops on endothelial cells in vitro. Arch Toxicol 83, 2009.

MODES, P.; dos ANJOS S. S. *et al.* Cuidados de Enfermagem nas complicações da punção venosa periférica em recém-nascidos. Rev Rene, Fortaleza, 12(2), 2011.

MURPHY-ULRICH, J. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptative state? The J Clin Investigation. 107: 785-790. 2001.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Best Pharmaceuticals for Children Act. Priority List of Needs in Pediatric Therapeutics. 2014.

PALSSON, B. e BHATIA, S. N. Tissue Engineering, Prentice Hall, 2004.

PEDREIRA, M. L. G.; CHAUD, M. N. Terapia intravenosa em pediatria: subsídios para a prática da enfermagem. *Acta Paul. Enf.*, São Paulo, 17(2), 2004.

PÉREZ, J. M. J. RODRIGYEZ, L. R. VILLANUEVA, S. G. LLAREN, R. M. R. Utilización y mantenimiento de los catéteres venosos periféricos en la unidad de neonatología del Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid. *Rev. enfrm. Cyl.* Vol 7 - nº 1, 2015.

PERLMAN, S. E.; SAIMAN, L.; LARSON, E. L. Risk factors for late-onset health care associated bloodstream infections in patients in neonatal intensive care units. *Am. J. Infect. Control.*, 35 (3), 2007.

POBER, J., S.; COTRAN, R., S. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiological Reviews.* 70:427-51, 1990.

POTTS, J. R.; CAMPBELL, I. D. Structure and functions of fibronectin modules. *Matrix Biol.*; 15: 313-20, 1996.

PRODANOV, C., C.; FREITAS, E., C. Metodologia do trabalho científico [recurso eletrônico]: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico – 2. ed. – Novo Hamburgo: Feevale, 2013.

RAO, C. H. R.; ARUNKUMAR, L. C.; SAMBASIVARAO, K. R. S. Qualitative and quantitative analysis of ampicillin in milk and dairy products. *Review for Science.* 1(2), 2011.

RE, F.; ZANETTI, A.; SIRONI, M.; POLENTARUTTI, N.; LANFRANCONE, L; DEJANA E.; COLOTTA, F. Inhibition of Anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *The J. Cell Biol.* 127: 537-546. 1994.

REIGART, J. Routt. et al. Peripheral Intravenous acess in pediatric inpatients. *Clinical Pediatrics* 51(5), 2012.

Resolução RDC/ANVISA Nº 45 de 12 de março de 2003.

RESTIEAUX, M. et al. Neonatal extravasation injury: prevention and management in Australia and New Zealand-a survey of current practice. *BMC Pediatric* 13:34, 2013.

REUTERS, T., S. Neofax. 24th Edition. 2011.

RISAU, W. Differentiation of the endothelium. *FASEB J.* 9:926–933. 1995.

ROBERTSON, W. E.; ROSE, K. L.; HUDSON, B. G.; VANACORE, R. M. Supramolecular Organization of the α 121- α 565 Collagen IV Network. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 37, pp. 25601–25610, September 12, 2014.

ROBIBARO, B.; VORBACH, H.; WEIGEL, G.; WEIHS, A.; HLOUSEK, M.; PRESTERL, E.; GEORGOPOULOS, A.; GRIESMACHER, A.; GRANINGER, W. Influence of glycopeptide antibiotics on purine metabolism of endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 431, 1998a.

ROBIBARO, B.; VORBACH, H.; WEIGEL, G.; WEIHS, A.; HLOUSEK, M.; PRESTERL, E.; GEORGOPOULOS, A.; GRIESMACHER, A.; GRANINGER, W. Endothelial cell compatibility of glycopeptide antibiotics for intravenous use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 1998b.

RODRIGUES, E. C. "Perdeu a Veia" - Os significados da prática da terapia intravenosa numa unidade de terapia intensiva neonatal do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Instituto Fernandes Figueira (FIOCRUZ) 145p. 2008.

RODRIGUES, E. C.; CUNHA, S. R.; GOMES, R. "Perdeu a veia": significados da prática da terapia intravenosa na unidade de terapia intensiva neonatal. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, 17(4), Apr. 2012.

RODRÍGUEZ, M. S.; GALINDO, L.; LAMAZARES, A. S. C. F.; HERCE, J. L.; GÓMEZ, M. R.; MARTÍNEZ, L. E.; ÁLVAREZ, A. C.; SAEZ, M. S. Preparation of Intravenous Drug Administration Guidelines for a Pediatric Intensive Care Unit. *Journal of Infusion Nursing* 37(1). 35-43, 2014.

SANTOS, L. M.; HOLTZ, T. R. G.; SANTANA, D. M.; SANTANA, R C .B.; LOPES, D. M.; SANTO, L .F. N. Critérios para a fixação de acessos venosos periféricos em

recém-nascidos prematuro. *Revista de Pesquisa: Cuidado Fundamental Online*. 5(1), 2013.

SCHIMEK, K.; BUSEK, M.; BRINCKER, S.; GROTH, B.; HOFFMANN, S.; LAUSTER, R.; LINDNER, G.; LORENZ, A.; MENZEL, U.; SONNTAG, F.; WALLES, H.; MARXA, U.; HORLAND, R. Integrating biological vasculature into a multi-organ chip microsystem. *Lab Chip*, 13. 3588-3598, 2013.

SCHVARTSMAN, C.; LEWI, D. S.; MORGULIS, R.; Naum FRANCO, N.; de ALMEIDA, S. M.; FILHO, W. M. B. *Manual Farmacêutico*. Albert Einstein. Sociedade Beneficente Israelita Brasileira, 2014. Disponível em: <<https://aplicacoes.einstein.br/manualfarmaceutico/Paginas/Termos.aspx?filtro=Tabelas&itemID=96#detalheTermo>>

SCHWARZBAUER, J. E. Fibronectin: from gene to protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:780, 1992.

SILVA, A., C., P. Extravasamento de drogas vesicantes: relato de experiência. *Rev Paul Enferm.* 11(1): 27-9, 1992.

SIVANANDAN, S.; SORAISHAM, A.; SWARNAM, K.; Choice and duration of antimicrobial therapy for neonatal sepsis and meningitis. *International Journal of Pediatric*. October, 2011.

SOARES, M. M. V. Estudo experimental *in vitro* das Lesões endoteliais em recém-nascidos utilizando modelagem matemática: contribuições para a enfermagem neonatal. Monografia, Escola de Enfermagem Anna Nery, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

SUMPIO, B. E.; RILEY, T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 2002.

TOGNA, G.; TOGNA, A. R.; CAPRINO, L. b-Lactam Antibiotic-Mediated Changes in Platelet Reactivity and Vascular Endothelial Functions. *Pharmacology & Toxicology* 88, 2001.

URZEDO, J. E. *et al* . Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit during 16 years: 1997-2012. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba , 47(3), June, 2014.

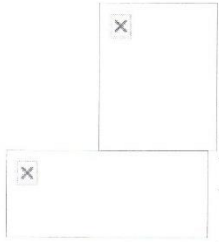
VELASCO. R. C. Disfunción endotelial. Rev. Diagnostico. v.51, n.1, 2012.

VORBACH, H.; ARMBRUSTER, C.; ROBIBARO, B.; GRIESMACHER, A.; EL MENYAWI, I.; DAXECKER, M. R.; MÜLLER, M. M. Endothelial cell compatibility of azithromycin and erythromycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 49, 2002.

VORBACH, H.; WEIGEL, G.; ROBIBARO, B.; ARMBRUSTER, C.; SCHAUMANN, R.; HLOUEK, M.; REITER, M.; GRIESMACHER, A.; GEORGOPOULOS, A. Endothelial Cell Compatibility of Clarithromycin for Intravenous Use. Clinical Biochemistry. Vol. 31, No. 8, 1998.

WALLIS, M. C.; MCGRAIL, M.; WEBSTER, J.; MARSH, N.; GOWARDMAN, J.; PLAYFORD, E. G.; RICKARD, C. M. Risk factors for Peripheral Intravenous Catheter Failure: A Multivariate Analysis of Data from a Randomized Controlled Trial. Infection Control and hospital epidemiology. 25(1), 2014.

ANEXO A

 <p>EEAN</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO</p> <p>CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE</p> <p>Escola de Enfermagem Anna Nery</p> <p>Comitê de Ética em Pesquisa da EEAN/HESFA</p>	
---	---	--

Protocolo nº 024/2010

Título do Projeto: Lesões endoteliais produzidas por ampicilina em recém-nascidos: um estudo experimental in vitro e as contribuições para a enfermagem neonatal.

Pesquisadora Responsável: Jane Cristina de Oliveira Faria

Instituição onde a pesquisa será realizada: EEAN

Data de Entrega do Protocolo ao CEP: 22/03/2010

Parecer

O Comitê de Ética em Pesquisa da EEAN/HESFA atendendo o previsto na Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde **APROVOU** o referido projeto na reunião realizada pelos membros do Comitê de Ética e Pesquisa, em 30 de março de 2010.

Caso a pesquisadora altere a pesquisa é necessário que o projeto retorne ao CEP para

https://mail.anato.ufrj.br/src/printer_friendly_bottom.php?passed_ent_id=0&mailbox=INB... 5/4/2010

uma futura avaliação e emissão de novo parecer.

Lembramos que a pesquisadora deverá encaminhar o relatório da pesquisa daqui a **01 (HUM) ANO E/OU AO TÉRMINO DA MESMA, COM UM CD, INDICANDO O NÚMERO DO PROTOCOLO ATUAL**, como um compromisso junto a esta Instituição e o CONEP.

Rio de Janeiro, 31 de março de 2010.

Maria Aparecida Vasconcelos Moura
Coordenadora do Comitê de Ética EEAN/HESFA/UFRJ

--
Profª. Maria Aparecida Vasconcelos Moura
Coordenadora do Comitê de Ética e Pesquisa – EEAN/HESFA
[Baixar como um arquivo](#)

ANEXO B



ESCOLA DE ENFERMAGEM
ANNA NERY - EEAN/
HOSPITAL ESCOLA SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Os efeitos da ampicilina nas células endoteliais humanas: um estudo experimental in vitro e as contribuições para o saber da Enfermagem Neonatal.

Pesquisador: Maureen Meira Vieira Soares

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46890415.3.0000.5238

Instituição Proponente: Escola de Enfermagem Anna Nery

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.499.642

Apresentação do Projeto:

As Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) contam com uma evolução farmacêutica e tecnológica significativa nos dias atuais, e isso tem promovido uma maior sobrevivência nos recém-nascidos pré-termo de idades gestacionais cada vez menores. No entanto, o tempo de internação tem sido maior, o que acarreta no aumento de infecções, e conseqüentemente o uso de antibiótico, incluindo, majoritariamente, a ampicilina. As complicações oriundas da punção venosa e da administração de antibióticos por essa via, já são conhecidas e citadas em várias literaturas, mas pouco se tem de informação sobre essas lesões a nível celular.

Este estudo experimental avaliará a ação de componentes da matriz extracelular frente ao tratamento com ampicilina utilizando modelo de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a ação do antimicrobiano ampicilina e seus efeitos nas células endoteliais humanas, in

Endereço: Rua Afonso Cavalcanti, 275

Bairro: Cidade Nova

CEP: 20.211-110

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2293-8148

E-mail: cepeeanhesfa@gmail.com



ESCOLA DE ENFERMAGEM
ANNA NERY - EEA/
HOSPITAL ESCOLA SÃO



Continuação do Parecer: 1.499.642

vitro.

Objetivo Secundário:

Analisar a morfologia das células endoteliais antes e após o tratamento com o antibiótico ampicilina em diferentes concentrações e em tempos variados. Analisar a organização da matriz extracelular (MEC) da célula endotelial, após tratamento com ampicilina, em tempos variados, com especial atenção para as glicoproteínas laminina, fibronectina e tenascina, como elementos importantes de adesão celular. Estudar a ação dos Proteoglicanos (PGs), como o heparan sulfato proteoglicano, e suas interações com os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e de crescimento e transformação (TGF).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos biológicos relacionados a esse estudo podem ocorrer por meio de contaminação por microorganismos como bactérias, fungos, parasitas, vírus, que quando em contato com o homem, podem provocar inúmeras doenças. Com a finalidade de minimizar os riscos biológicos que o pesquisador se expõe ao manipular células humanas, as células endoteliais adquiridas comercialmente (HUVEC) que serão utilizadas nesse trabalho são testadas previamente contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) 1 e 2; o vírus da Hepatite B (HBV) e C (HCV) pelo fornecedor.

Além disso, o pessoal do laboratório deve ser apropriadamente imunizado. A pesquisa se fundamenta na aplicação das boas práticas de laboratório (BPL) baseadas nas diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos, que preconizam a utilização de equipamentos de proteção e a adequação das instalações, com ênfase em indicadores de Biossegurança (BRASIL, 2010). Os pesquisadores obrigatoriamente devem

utilizar Equipamento de Proteção Individual (EPI) e Coletivo (EPC), tais como: jaleco, luvas de procedimento, touca, máscara, sapatos fechados e manipulação das células dentro de uma capela de fluxo laminar, que garante a proteção do operador e do ambiente contra agentes biológicos de risco, protegendo os materiais de estudo de contaminações externas. Após os experimentos, o material biológico sofre tratamento químico com hipoclorito para que possa ser descartado de forma a proteger o meio-ambiente e os seres humanos. São descartados em sacos brancos marcados com o logotipo de risco biológico e a palavra "INFECTANTE", na lixeira de cor branca destinada a lixos infectantes. Em caso de contato acidental

Endereço: Rua Afonso Cavalcanti, 275

Bairro: Cidade Nova

CEP: 20.211-110

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2293-8148

E-mail: cepeeanhesfa@gmail.com



ESCOLA DE ENFERMAGEM
ANNA NERY - EEA/
HOSPITAL ESCOLA SÃO



Continuação do Parecer: 1.499.642

com o material biológico a conduta será lavar com água corrente em abundância as membranas mucosas e a pele, podendo ser usado soro fisiológico 0,9%, repetindo a operação por várias vezes. Como as células são previamente testadas, não há indicação de quimioprofilaxia.

Entretanto, o laboratório fará o encaminhamento para o atendimento médico necessário e acompanhará o caso até sua resolução.

Benefícios:

Os benefícios de estudar as lesões em células endoteliais, a partir de HUVEC, são: a reprodução in vitro dos fenômenos biológicos que ocorrem in vivo, sem comprometer os seres vivos; a contribuição para o conhecimento de novos saberes sobre o antimicrobiano ampicilina e o aumento da segurança do paciente na realização da TIV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de grande relevância para a compreensão do papel dos agentes microbianos em uma perspectiva celular e molecular.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: adequado
- 2) Projeto de Pesquisa: apresentado
- 3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado
- 4) Requerimento da Liberação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: adequado
- 5) Cronograma: adequado
- 6) Anuência da Instituição cenário: adequado
- 7) Instrumentos de coleta de dados: adequado

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa encontra-se apto a ser executado em consonância com toda a normativa

Endereço: Rua Afonso Cavalcanti, 275

Bairro: Cidade Nova

CEP: 20.211-110

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2293-8148

E-mail: cepeeanhesfa@gmail.com



ESCOLA DE ENFERMAGEM
ANNA NERY - EEA/
HOSPITAL ESCOLA SÃO



Continuação do Parecer: 1.499.642

ética que envolve a pesquisa com seres humanos, sendo dispensada a apresentação do TCLE.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da EEA/HESFA/UFRJ atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto ad referendum em 14 de abril de 2016. Caso o(a) pesquisador(a) altere a pesquisa é necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o(a) pesquisador(a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_698995 E1.pdf	14/04/2016 00:32:13		Aceito
Outros	EMENDACEP Maureen Soares.pdf	14/04/2016 00:26:57	Maureen Meira Vieira Soares	Aceito
Outros	ORCAMENTO FINANCEIRO DO PROJETO ODE PESQUISA DETALHADO.pdf	14/04/2016 00:26:21	Maureen Meira Vieira Soares	Aceito
Outros	TERMO DE PARCERIA.pdf	14/04/2016 00:25:19	Maureen Meira Vieira Soares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetosubCEP com EMENDA.pdf	14/04/2016 00:24:54	Maureen Meira Vieira Soares	Aceito
Outros	Encaminhamento CEP Maureen.pdf	19/06/2015 18:48:46		Aceito
Outros	Cronograma Maureen.pdf	19/06/2015 18:48:16		Aceito
Outros	Carta Anuência Maureen.pdf	19/06/2015 18:47:24		Aceito
Outros	Liberação TCLE Maureen.pdf	19/06/2015 18:46:57		Aceito
Folha de Rosto	CEP_Maureen.pdf	19/06/2015 16:04:35		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Afonso Cavalcanti, 275

Bairro: Cidade Nova

CEP: 20.211-110

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2293-8148

E-mail: cepeeanhesfa@gmail.com



ESCOLA DE ENFERMAGEM
ANNA NERY - EEA/
HOSPITAL ESCOLA SÃO



Continuação do Parecer: 1.499.642

RIO DE JANEIRO, 14 de Abril de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Vasconcelos Moura
(Coordenador)

Endereço: Rua Afonso Cavalcanti, 275

Bairro: Cidade Nova

CEP: 20.211-110

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2293-8148

E-mail: cepeeanhesfa@gmail.com