

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

NÍVEL DOUTORADO

SARAH WINCK DE ALMEIDA

**ESTUDO DA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DA KOMBUCHA E AVALIAÇÃO DE
BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE**

PORTO ALEGRE

2021

SARAH WINCK DE ALMEIDA

**ESTUDO DA TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DA KOMBUCHA E AVALIAÇÃO DE
BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE**

Projeto de Tese de Doutorado,
apresentado como requisito parcial para
ingresso no Programa de Pós-Graduação
em Biociências da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre -
UFCSPA

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Seixas

Coorientadora: Prof^a Dra. Graziela Brusch Brinques

Porto Alegre

2021

LISTA DE SIGLAS

ABKOM	Associação Brasileira de Produtores de Kombucha
ABTS	Ácido 2,2 -azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico)
ABV	<i>Alcohol by Volume</i>
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	<i>Antimicrobial Pharmacodynamics and Therapeutics</i>
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CG-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG-MS	Cromatografia gasosa com detector de massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTBA	Contagem Total de Bactérias Acéticas
CTBAL	Contagem Total de Bactérias Ácido Láticas
CTL	Contagem Total de Leveduras
DAD	Detector por Arranjo de Diodo
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNS	Ácido dinitrossalicílico
DPPH	2,2- difenil-1-picrilhidrazila
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector por Arranjo de Diodos
HS-SPME	<i>Headspace - Solid Phase Micro-Extraction</i>

IN	Instrução Normativa
KBI	<i>Kombucha Brewers Association</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIR	<i>Near Infra-red</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
QIIME2	<i>Quantitative Insights Into. Microbial Ecology</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SCFAs	<i>Short-chain fatty acids</i>
SCOBY	<i>Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
WHO	<i>World Health Organization</i>
16s rRNA	RNA ribossomal 16S

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Objetivos	9
1.1.1 Objetivo Geral.....	9
1.1.2 Objetivos Específicos.....	9
1.2 Justificativa.....	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Alimentos e bebidas fermentados	14
2.2 A bebida Kombucha.....	16
2.2.1 História.....	16
2.2.2 Tecnologia de produção, composição físico-química e microbiota.....	22
2.2.3 Kombucha e saúde	32
3 METODOLOGIA	37
3.1. Padronização do cultivo e manutenção do SCOBY	38
3.1.1. Amostras, armazenamento e manutenção do SCOBY	38
3.2. Caracterização da Microbiota.....	40
3.3. Análises físico-químicas	42
3.3.1 Pré-processamento das amostras.....	42
3.3.2. pH	42
3.3.3. Açúcares.....	42
3.3.4. Acidez total	43
3.3.5. Acidez volátil.....	43
3.3.6. Acidez fixa por diferença.....	44
3.3.7. Ácidos orgânicos	44
3.3.8. Etanol.....	44
3.3.9. Ésteres.....	45
3.4. Análises microbiológicas.....	45
3.4.1. Contagem Total de Bactérias Acéticas (CTBA) e Contagem Total de Bactérias Ácido Láticas (CTBAL)	45
3.4.2. Contagem Total de Leveduras (CTL)	46
3.5. Isolamento de Microrganismos	46
3.6. Estudo cinético e otimização do processamento da bebida kombucha	46
3.7 Estudo do potencial antioxidante da kombucha <i>in vitro</i>	47

3.7.1. Avaliação dos compostos fenólicos presentes na kombucha	48
3.7.2 Determinação da atividade antioxidante por ABTS	49
3.7.3 Determinação da atividade antioxidante por DPPH.....	49
3.7.4 Ensaio antioxidante do poder de redução do ferro - FRAP	50
3.8. Avaliação do efeito antitumoral em células <i>in vitro</i>	51
3.8.1. Cultivo celular	51
3.8.2. Cálculo Amostral	51
3.8.3. Avaliação da viabilidade e proliferação celular	51
3.8.4. Avaliação de morte e ciclo celular	52
3.8.5. Ensaio de migração celular.....	53
3.8.6. Ensaio de formação de colônias (Clonogênico).....	53
3.8.7. Ensaio de Wash-out.....	53
3.8.8. Análise estatística	54
3.9. Estudo da atividade antimicrobiana de kombucha	54
3.9.1. Obtenção do sobrenadante livre de células	54
3.9.2. Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células.....	55
3.10. Atividade probiótica da kombucha em testes <i>in vitro</i>	55
3.10.1 Viabilidade probiótica e ensaio	56
3.10.2 Cálculo e expressão dos resultados.....	57
3.11. Análise Estatística.....	57
4 RESULTADOS ESPERADOS.....	58
5 CRONOGRAMA.....	59
6 DISPONIBILIDADE DE INFRAESTRUTURA E DE APOIO TÉCNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO	61
7 RECURSOS	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A contemporaneidade tem evidenciado a preocupação crescente com a qualidade e origem dos alimentos consumidos, bem como o impacto deste consumo para a saúde e para o meio ambiente. Essas reflexões têm estimulado a população a buscar alimentos mais naturais e artesanais (ou menos industrializados) (SCHMITT *et al.*, 2017; SELHUB *et al.*, 2014).

Segundo a publicação *Evolving Trends in Food and Nutrition*, da *Euromonitor International*, as novas crenças alimentares têm impulsionado e moldado os hábitos dos consumidores, deixando-os cada vez mais atentos aos alimentos que consomem, buscando os mais naturais, menos processados e *clean label* (BAGUL; KOERTEN; REES, 2020). Segundo a *Brasil Food Trends 2020*, publicada no ano de 2010, na qual foi feita uma previsão para o momento que estamos vivendo, a tendência denominada “saudabilidade e bem-estar” estaria estimulando vários segmentos de consumo, com destaque para a busca por alimentos funcionais (ITAL, 2010), considerando que alimentos e bebidas com propriedades bioativas podem trazer benefícios à saúde, além de suprirem as necessidades nutricionais básicas do indivíduo (KAUR; SINGH, 2017).

Mais recentemente, os alimentos e bebidas fermentados têm ganhado destaque no mercado internacional, pelo sabor característico, e essencialmente pelo seu perfil nutricional, resultante das mudanças bioquímicas causadas pela ação de microrganismos ou enzimas. A publicação *Innovation in the drink sector*, do *Top Trends* da feira de alimentos SIAL do ano de 2018, uma das maiores feiras do mundo do setor de alimentação, que ocorre bianualmente em Paris, alertou para a demanda dos consumidores por naturalidade e desejo de descobrir novos sabores, destacando os produtos fermentados lassi, kombucha e kefir. Na mesma feira, o júri da SIAL *Innovation* elegeu a bebida kefir de água, da marca grega Papadopoulos Iordanis/Namastê, como a grande vencedora, ressaltando seus benefícios graças à presença de probióticos (SIAL, 2018).

Segundo uma matéria publicada no site da *Forbes* em 6 de fevereiro de 2019, uma pesquisa realizada pela *Upserve* (plataforma de gerenciamento de restaurantes com base em tecnologia) mostrou que no ano de 2018 o consumo de alimentos fermentados cresceu 149%, com destaque para o crescimento no consumo da

kombucha, explicando que esta é uma bebida popular já a alguns anos nos grupos de pessoas preocupadas com a saúde (SAXE, 2019).

Dentro desse contexto de saudabilidade e bem estar, a bebida kombucha tem se destacado tanto no que diz respeito a ampliação de produção como de aumento na adesão de consumidores. Embora sua produção e consumo sejam milenares, a origem desta bebida ainda não foi totalmente esclarecida. Acredita-se que tenha surgido no continente asiático, mais especificamente na China, sendo conhecida historicamente por seus atributos curativos e funcionais, levemente ácida e carbonatada, tem se popularizado como uma bebida funcional, alternativa saudável aos refrigerantes (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014).

Tecnicamente, a kombucha é uma bebida produzida originalmente a partir da fermentação de chá *Camellia sinensis*, por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast* – SCOBY), acomodadas em uma matriz de celulose e dispersas no líquido iniciador (denominado *starter*). Até chegar ao consumidor final, a bebida passa por duas fermentações, sendo a primeira aeróbia, onde sofre acidificação e a segunda anaeróbia, onde sofre carbonatação (KATZ, 2012; CRUM; LAGORY, 2016; BRASIL, 2019; CARVALHAES; ANDRADE, 2020).

A saudabilidade da kombucha tem sido atribuída empiricamente à presença dessa cultura simbiótica de microrganismos (SCOBY) responsável pela fermentação da bebida, aos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação e também às propriedades antioxidantes do chá utilizado (ALOULOU *et al.*, 2012; BHATTACHARYA *et al.*, 2011; KOZYROVSKA *et al.*, 2012), que podem permanecer ou até mesmo serem intensificadas no produto final (BELLASSOUED *et al.*, 2015).

Jayabalan *et al.* (2014) e Crum e LaGory (2016) relatam que a popularidade Kombucha oscilou mundialmente desde a Segunda Guerra Mundial. Porém após a chamada “Crise da Kombucha” no ano de 2010, marcada pela retirada voluntária da bebida por parte dos fornecedores dos pontos de venda nos Estados Unidos da América (EUA), após a descoberta de que o produto continha níveis elevados de álcool, acima do permitido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (LEBLANC, 2010; CRUM; LAGORY, 2016), o mercado voltou a crescer conforme relatou Watson (2018), quando em 2016 a PepsiCo comprou a KeVita, uma popular fabricante da bebida funcional e probiótica kombucha, e em 2017 as vendas no varejo de kombucha e outras bebidas fermentadas aumentaram 37,4%.

Embora seja considerada uma bebida muito antiga, devido ao apelo de possível saudabilidade, sua comercialização e consumo ganharam dimensão mundial na última década (TROIINO, 2017). Segundo dados da *Kombucha Brewers International* (KBI), associação comercial sem fins lucrativos comprometida em promover e proteger os fabricantes de kombucha em todo o mundo, até o ano de 2018 esta bebida apresentou um crescimento contínuo de 30% no setor natural e de 50% (ou mais) no setor convencional ano após ano, sendo a categoria de bebidas funcionais que apresentou o crescimento mais rápido, cuja previsão era de que até o ano de 2020 a comercialização da kombucha nos Estados Unidos atingisse US\$ 1,8 bilhões além de mais de 5 mil empregos gerados. Ainda, conforme dados obtidos no site, até o ano de 2018 a KBI contava com mais de 180 empresas associadas (KBI, 2018).

No Brasil o mercado da kombucha ainda é emergente, porém estima-se que este movimento atualmente R\$ 11 milhões de faturamento e 500 mil litros mensais. Além disso é um mercado que já conta com algumas contribuições importantes para o desenvolvimento do setor, como a fundação da Associação Brasileira de Kombucha (ABKOM) (ABKOM, 2020).

Esse aumento no consumo e produção da bebida alertou os produtores e órgãos reguladores, evidenciando a necessidade da criação de padrões que guiassem o setor. Entretanto, mesmo com o Padrão de Identidade e Qualidade (PIC) estabelecido no ano de 2019 (BRASIL, 2019), a produção da kombucha ainda é historicamente artesanal e com isso observam-se dificuldades de padronização de processo e de produto, por parte das empresas produtoras, que resulta em uma variação considerável nos parâmetros de processo entre as indústrias e características das bebidas comercializadas (LEAL *et al.*, 2018; ANSARI *et al.*, 2019).

A comunidade científica tem atentado para essa temática, e estudos realizados nos últimos anos, objetivando a caracterização físico-química e da microbiota da kombucha, tem evidenciado variação considerável da população microbiana e dos demais parâmetros analíticos, afetando a composição e concentração dos metabólitos em bebidas produzidas por diferentes empresas. Estes estudos mostram que *starters* e SCOBYS de diferentes origens possuem variações em suas composições de microbiota (em número e espécies), e isso ocorre em função das variações nos parâmetros de controle de processo (fatores intrínsecos e extrínsecos), bem como em função dos ingredientes utilizados como tipo de chá e açúcar (MARSH *et al.*, 2014;

CHAKRAVORTY *et al*, 2016; COTON *et al.*, 2017; ANSARI *et al*, 2019; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2020).

Essa dificuldade de padronização se torna um ponto de atenção importante, considerando-se que seja necessário um controle rígido de processo de produção e caracterização da kombucha, de modo a compreender melhor sua cinética, para que seu consumo possa ser associado a benefícios para a saúde humana.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem por objetivo estudar a tecnologia e ciência envolvidas na produção da kombucha, através da aplicação de um processo padronizado e controlado, buscando posteriormente avaliar benefícios da bebida para a saúde humana.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para isso, será realizada a caracterização da microbiota e análises físico-químicas em diferentes pontos do processo de produção, buscando estabelecer a cinética do processo fermentativo, e com essas informações avaliar os possíveis benefícios da bebida, conforme descrito nos objetivos específicos:

1. Realizar o levantamento dos principais processos tecnológicos de produção da bebida kombucha.
2. Definir e padronizar as condições ideais de cultivo/manutenção do SCOBY e *starter* para produção e manutenção do estoque.
3. Realizar estudo cinético do processamento da bebida kombucha.
4. Controlar o processo fermentativo buscando minimizar a produção de etanol na bebida kombucha.
5. Analisar os principais parâmetros microbiológicos e físico-químicos que caracterizam a bebida kombucha.
6. Caracterizar a microbiota envolvida nas fermentações da bebida kombucha (primeira e segunda fermentação).

7. Verificar a viabilidade de isolamento de microrganismos presentes na cultura iniciadora para fins tecnológicos.
8. Investigar compostos químicos de interesse em saúde presentes na bebida kombucha.
9. Avaliar o potencial antioxidante da bebida kombucha relacionado a presença de compostos fenólicos.
10. Avaliar atividade probiótica da kombucha *in vitro*.
11. Verificar o potencial antimicrobiano da bebida kombucha.
12. Avaliar o efeito antitumoral da kombucha em células de diferentes linhagens cultivadas *in vitro*.

1.2 Justificativa

Os dados de mercado mostram um aumento considerável no consumo de kombucha por grande parte da população que acredita nos benefícios nutricionais dessa bebida. Atrelado a isso, é evidente a preocupação por parte da comunidade científica sobre as atribuições de saúde a ela vinculadas (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN, *et al.*; 2014; WATAWANA, *et al.*; 2015; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; CRUM; LAGORY, 2016) em função do processo de produção ainda não padronizado (embora já com o PIC regulamentado no Brasil) (BRASIL, 2019) e também pela carência, até o momento, de resultados científicos de pesquisas aplicadas em seres humanos (BHATTACHARYA *et al.*, 2011; ALOULOU *et al.*, 2012; KOZYROVSKA *et al.*, 2012; KATZ, 2012; LEAL *et al.*, 2018; KAPP; SUMNER, 2019).

Propriedades antioxidantes e probióticas são as principais atribuições de saúde vinculadas à kombucha (BHATTACHARYA *et al.*, 2011; ALOULOU *et al.*, 2012; KOZYROVSKA *et al.*, 2012) além de ser popularmente chamada de bebida funcional. (HASLER; BROWN, 2009; WATAWANA *et al.*, 2015). Kaur e Singh (2017) explicam que esse tipo de bebida (quando comprovado cientificamente) pode trazer um ou mais benefícios à saúde, além de apresentar a função básica de nutrição. Coton *et al.* (2017) complementam sobre possível atividade anticarcinogênica, mas ressaltam que ainda há pouca informação sobre os componentes bioativos, bem como a evolução da microbiota durante o processo fermentativo e possíveis atividades farmacológicas. Entretanto, outros autores ressaltam que embora a maioria dos ensaios biológicos no chá de kombucha tenham sido feitos *in vitro*, alguns autores realizaram estudos *in vivo*

utilizando ratos e encontraram resultados promissores (VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Acredita-se que essas propriedades possam estar relacionadas aos polifenóis presentes no chá e a microbiota da bebida. Tem sido evidenciado que a microbiota de kombuchas produzidas em diferentes locais é variada, e depende de parâmetros de processo, como condições de manipulação, temperatura, tipo de chá, fonte de nutrientes e o ambiente (CARVALHAES; ANDRADE, 2020).

Os benefícios probióticos relacionados à kombucha ainda necessitam de estudos científicos mais amplos, já que alegações muitas vezes equivocadas são facilmente encontradas na internet, incentivando o consumo da bebida por parte da população. Todavia, não existem estudos abrangentes que demonstrem por consenso que as diferentes kombuchas apresentam microrganismos probióticos, tampouco, se estes estão nas quantidades mínimas necessárias para tal alegação. A Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO*) definem probióticos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2006). Alguns autores complementam que a presença de microrganismos probióticos deve estar relacionada a estabilidade de produtos alimentícios durante o *shelf life* bem como durante seu consumo (BRINQUES; AYUB; 2011; COGHETTO; BRINQUES; AYUB, 2016). Importante ressaltar que probióticos são alimentos ou bebidas que contêm microrganismos vivos, e no caso da kombucha, estão diretamente relacionados a sua composição de microbiota.

Tão importante quanto caracterizar a composição da microbiota ao longo do processo fermentativo é compreender a cinética de fermentação para produção da bebida. Talebi *et al.*, (2017) relatam que a fermentação da kombucha é um bioprocessamento bastante complexo baseada principalmente na conversão do açúcar em álcool e dióxido de carbono (CO₂) por leveduras (fermentação alcoólica), seguida por uma fermentação bacteriana que transforma o álcool em ácido acético (fermentação acética). Durante esse processo inúmeros metabólitos são formados, sendo importante conhecer suas concentrações, pois elas impactam em possíveis alegações de funcionalidade atribuídas. Além disso, é importante ressaltar que durante o processo fermentativo da kombucha ocorre a produção de álcool, conforme já havia sido verificado na Crise da Kombucha, no ano de 2010, sendo mais recentemente evidenciado em estudos científicos, onde algumas kombuchas apresentaram teores

de álcool acima de 0,5% ABV (*Alcohol by Volume*) (LEBLANC, 2010; CRUM; LAGORY, 2016; EBERSOLE *et al.*, 2017; SUHRE, 2020). No Brasil, de acordo com o PIC da kombucha, esse percentual a caracteriza como uma bebida alcoólica (BRASIL, 2019). Esse é um parâmetro importante considerando que a kombucha sofre um processo de fermentação contínua, que pode ocorrer também durante o transporte e armazenamento, e conseqüentemente resultar em um aumento no nível de etanol no produto comercializado (LEBLANC, 2010; CRUM; LAGORY, 2016; EBERSOLE *et al.*, 2017; SUHRE, 2020).

Com base nesse cenário, o conhecimento das características tecnológicas, físicas, químicas e microbiológicas se faz necessário para que a sua comercialização e consumo que hoje são realizados, possam trazer mais garantias de segurança ao consumidor, principalmente para aqueles que pertencem a grupos de risco, como mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos e crianças (TALEBI *et al.*, 2017). Além disso, é fundamental um maior entendimento de quais compostos efetivamente existem nas bebidas e como devem ser conduzidas as fermentações para se obter um produto com qualidade e com as possíveis alegações de funcionalidade que são atribuídas. Portanto, um estudo que contemple todos esses aspectos é fundamental para agregar material técnico científico a esse tema que ainda possui escasso aprofundamento.

Além disso, o presente projeto pretende simular de forma mais fiel possível o processo utilizado pelas empresas produtoras de kombucha, para que as contribuições resultantes possam ser mais efetivas. Será feito um estudo relacionando a produção de álcool às condições do processo fermentativo a fim de possibilitar ajustes direcionados ao processo de produção da bebida. Importante ressaltar que não foi encontrado, até o momento, nenhum estudo que tenha realizado a análise da microbiota nas diferentes etapas de fermentação da kombucha de modo a compreender sua cinética. Estudos foram conduzidos ou com o *starter* e SCOBY da primeira fermentação, ou com bebidas já engarrafadas e comercializadas por diferentes produtores. Deste modo, este projeto busca, de forma abrangente, gerar mais dados sobre o processo de produção e características do produto final, a fim de contribuir para a orientação dos fabricantes e consumidores. Por outro lado, novos produtos biotecnológicos podem vir a ser gerados a partir da caracterização dos microrganismos cultiváveis presentes na preparação. Galimberti *et al.*, (2021) complementam em seu estudo *Fermented food products in the era of globalization:*

tradition meets biotechnology innovations que conhecer, catalogar e explorar a biodiversidade microbiana natural são fundamentais para a indústria de biotecnologia recuperar genes, vias metabólicas ou até mesmo modificar processos já existentes.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo apresenta a fundamentação teórica e uma revisão de literatura sobre temas relevantes para o desenvolvimento deste projeto.

2.1 Alimentos e bebidas fermentados

Utilizar microrganismos no preparo de alimentos e bebidas remonta a antiguidade, e a diversidade de produtos existentes é reflexo das diferentes culturas alimentares aliadas ao desenvolvimento da ciência e da microbiologia/biotecnologia industrial (AQUARONE *et al.*, 2001). A fermentação é um fenômeno natural, anterior e mais amplo que toda e qualquer prática culinária, e na medida em que a humanidade foi a descobrindo e compreendendo, passou a usá-la amplamente (KATZ, 2012), principalmente quando aprendeu que a fermentação de alimentos também pode oferecer benefícios nutricionais e de saúde.

Alimentos e bebidas fermentados são considerados tendências nos dias atuais, embora a fermentação seja uma tecnologia antiga de conservação dos alimentos, tradicionalmente aproveitada pela população humana para aumentar a vida útil de produtos agrícolas perecíveis (AQUARONE *et al.*, 2001; KATZ, 2012; HUGENHOLTZ, 2013). Pode-se dizer que a fermentação constitui uma das maiores indústrias do mundo e por esta razão, estatísticas no ano de 2012 apontavam, que até um terço dos alimentos consumidos em todo o mundo eram fermentados (KATZ, 2012). Talvez essas estatísticas possam ser justificadas pelo fato de que o processo de fermentação se propagou pelo mundo inteiro em várias categorias de alimentos, e em muitas civilizações as estratégias de fermentação se tornaram patrimônio cultural, pois em geral, os produtos à base de fermentação estão fortemente ligados ao seu território de origem e às tradições do povo. Dentre essas categorias de alimentos, de uma forma geral, podem ser citados pães, cerveja, vinho, produtos lácteos, conservas vegetais, embutidos cárneos, sem considerar os produtos específicos de cada civilização ainda pouco conhecidos e difundidos pelo mundo. Descrições sobre alimentos fermentados foram encontradas em registros muito antigos, datando de 10.000 a 15.000 anos, quando no Oriente Médio foi iniciada a transição entre a prática da caça e a reserva de alimentos (AQUARONE *et al.*, 2001; HUGENHOLTZ, 2013;

MCGOVERN *et al.*, 2017; REZAC *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; NIELSEN, 2019; TAMANG *et al.*, 2020).

Durante a fermentação dos alimentos ocorrem mudanças bioquímicas promovidas essencialmente pela ação de microrganismos e suas enzimas. Nesse processo, ocorre um aumento no valor nutritivo dos alimentos, além de alterações nas características organolépticas como sabor e textura. Entretanto é importante que alguns parâmetros sejam controlados para que não ocorram problemas durante o processo fermentativo (AQUARONE *et al.*, 2001; HUGENHOLTZ, 2013; REDZEPI; ZILBER, 2018; REZAC *et al.*, 2018; NIELSEN, 2019). Katz (2012) complementa que o interesse pelo sabor ácido e azedo característico dos alimentos e bebidas fermentados (kefir, chucrute, cervejas, pães de fermentação natural e kombuchas) é muito antigo. Autores relatam que até mesmo antes de se compreender que as fermentações eram conduzidas por microrganismos, elas já eram realizadas, principalmente nas bebidas, que eram basicamente as únicas fontes de líquidos sem contaminação e com valor medicinal disponíveis (WALTHER *et al.*, 2014). Até o século 18 a fermentação era explicada como uma reação espontânea, cujos microrganismos eram considerados subprodutos (SCHLENK, 1985), e os alimentos nutritivos e saborosos eram considerados algo divino e mágico (MONEY, 2017). Apenas em 1861, a partir dos estudos de Louis Pasteur, que a teoria da geração espontânea ou abiogênese passou a ser desacreditada, compreendendo-se que não era possível surgimento espontâneo de vida (MANCHESTER, 1995).

Alimentos e bebidas fermentadas são, portanto, aqueles que sofrem ação de microrganismos úteis (tecnologicamente interessantes), resultando em mudanças bioquímicas desejadas que causam modificações significativas nos mesmos. Como resultados positivos desse processo, tem-se as alterações sensoriais (essencialmente aroma, sabor e palatabilidade), aumento da digestibilidade bem como melhora do perfil nutricional (AQUARONE *et al.*, 2001). Ao mesmo tempo, Villareal-Soto *et al.* (2018) sugerem que o processo fermentativo contribui para a conservação dos alimentos e bebidas, mais especificamente da kombucha, uma vez que altera o pH (Potencial Hidrogeniônico) do meio, tornando-o mais ácido e consequentemente menos suscetível à contaminação por microrganismos indesejáveis (patogênicos e deteriorantes).

Clearly (2019) complementa que, em alguns casos, o processo fermentativo não é realizado por uma cepa isolada, mas por um trabalho de cooperação entre

bactérias e leveduras (fermentação mista). Neste caso, uma fonte de carboidratos e outros nutrientes é disponibilizada para que estes microrganismos se mantenham vivos e por conseguinte, produzam alimentos ou bebidas fermentados, tornando-os mais digeríveis, menos tóxicos e com atributos sensoriais diferenciados.

Como já mencionado anteriormente, alimentos e bebidas fermentados são tendências nos dias atuais, e as fermentações naturais têm ganhado ainda mais destaque. Fermentações naturais, espontâneas ou selvagens são aquelas que ocorrem em ambientes abertos (KATZ, 2012), e alguns autores complementam que cada alimento ou bebida fermentado naturalmente será único (CAPOZZI *et al.*, 2015; GALIMBERTI *et al.*, 2021). A dificuldade principal relacionada a fermentação natural é o controle do processo, uma vez que a matéria-prima e o ambiente, dentre outros fatores, influenciam diretamente nos parâmetros físico-químicos e consequentemente nas características organolépticas do produto final (MONEY, 2017). Troitino (2017), em uma reportagem publicada na Forbes em 1 de fevereiro de 2017, intitulada *Kombucha 101: Demystifying The Past, Present And Future Of The Fermented Tea Drink*, afirmou que a kombucha era, sem dúvidas, a bebida funcional de crescimento mais rápido no mercado e uma das bebidas fermentadas de baixo teor alcoólico mais populares do mundo (BASCHALI *et al.*, 2017).

2.2 A bebida Kombucha

Dentre os produtos obtidos a partir da fermentação natural, acredita-se que a kombucha possa ser aquela que, até os dias de hoje, apresenta mais incógnitas no que diz respeito à sua origem, bem como às suas propriedades físico-químicas, microbiológicas e nutricionais. Conhecer sua história, mesmo ainda com lacunas, parece ser o primeiro passo para entender como essa bebida se tornou tão discutida e estudada nos dias atuais.

2.2.1 História

Em seu livro *The Big Book of Kombucha*, Crum e LaGory (2016) abordam a kombucha como a bebida do milênio, relatando as possíveis teorias de como surgiu e se alastrou pelo mundo, a partir de informações coletadas em diversas fontes, embora ainda assim os mesmos autores sinalizem incerteza sobre sua origem.

No quadro 1 pode-se visualizar a linha do tempo descrita por Crum e LaGory (2016), em forma sintetizada, destacando momentos importantes para um melhor entendimento dessa bebida milenar.

Quadro 1 – Linha do tempo do surgimento da kombucha, proposta no livro *The Big Book of Kombucha*.

	ANO	ACONTECIMENTOS	REGISTROS IMPORTANTES
Antes da Era Comum (Antes de Cristo)	6000	Frascos na Mesopotâmia mostram sinais de terem sido usados para fermentar vegetais.	O primeiro registro de fermentação.
	1300	Trecho bíblico (Ruth 2:14), onde Boaz encoraja Ruth a tomar sua bebida de vinagre.	
	221	Lenda do Imperador Qin Shi Huang, que supostamente bebeu o “elixir da vida longa”.	Primeira associação da bebida à saúde, Segundo Young (2019), o chá da imortalidade.
Era Comum (Depois de Cristo)	414	Doutor Coreano chamado Komu-ha, supostamente curou com o chá de kombucha o imperador Japonês In-giyō.	Jayabalan <i>et al.</i> (2014) acreditam que o nome “kombucha” esteja associado ao médico Kombu, que teria levado a bebida da China para o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador japonês Inyoko.
	600	Em uma mercearia na costa do mar Bohai, um assistente lavando um pote de mel respingou um pouco da água de enxague em um pote de barro que continha vinho. Ao perceber seu erro, apenas cobriu o pote com um pano para esconder o líquido dentro. Nos dias seguintes um aroma diferente se espalhou pela loja, mas não conseguiam localizar. Só descobriram de onde vinha o aroma quando chegou a hora de vender o vinho, e então verificaram que havia formado um filme branco-leitoso emborrachado selando a boca do vaso.	A teoria mais aceitável de como começou a kombucha, contada por um cervejeiro chinês de kombucha, segundo Crum e LaGory (2016).
	1200	Alguns afirmam que uma bebida fermentada vinagrada preenchia os frascos de Genghis Khan e seus exércitos viajantes. De natureza nômade estavam acostumados a longos períodos de subsistência com uma dieta de leite, carne e vários fermentados, incluindo a kombucha.	Há indícios de que os soldados Genghis Khan e os samurais carregassem kombucha em frascos ao longo de suas viagens. Young (2019) relata que a bebida se tornou popular entre os samurais, que bebiam para aumentar sua força e energia antes de uma batalha.
	1805	Um russo intelectual chamado L. Ryadovsky escreveu sobre beber “vinagre” e consumir um fermentado de ervilhas chinesas viajando pela Mongólia.	Supõe-se que essa vinagres seja a kombucha.
	1852	Robert D. Thompson (químico alemão) realizou os primeiros experimentos documentados do que mais tarde seria chamado de família <i>Acetobacteraceae</i> . Embora falado em vinagre e não kombucha, seus experimentos identificaram uma mãe de vinagre semelhante ao SCOBY, um líquido azedo que a acompanhava, e também a criação de dióxido de carbono e pequenas quantidades de álcool.	Artigo mais antigo conhecido sobre fermentação e produção de celulose bacteriana
	1880	Trabalhadores chineses trazidos para construir ferrovias no norte do México podem ter trazido SCOBYs com eles.	Indícios dos primeiros SCOBYs no Novo Mundo
	1886	Adrian J. Brown, companheiro da Sociedade Real na Grã-Bretanha, isolou e identificou a bactéria <i>xylinum</i> , usada para produzir um novo lote de vinagre de vinho tinto, que desenvolveu uma cultura no seu topo.	Primeira identificação e isolamento da bactéria <i>xylinum</i> . Um dos cerca de 30 produtores de celulose do gênero <i>Acetobacter</i> foi nomeado de

			<i>Gluconacetobacter xylinus</i> (bactéria) (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).
	1890	Dr. Nikolay Vasil'evich Kirilov, etnógrafo russo e estudante de medicina tibetana, realizou ensaios na Sibéria que envolveram o consumo regular de kombucha por pessoas idosas. Ele notou uma redução de sintomas de arteriosclerose, benefícios para digestão e assistência em problemas gastrointestinais.	Primeiro indício de ensaio clínico realizado objetivando avaliar os efeitos de saúde da kombucha
	1896	Dr. Rudolf Kobert, professor e presidentes de vários departamentos, incluindo farmacologia, na Universidade de Rostock na Alemanha, adquiriu um interesse especial na eficácia dos remédios populares russos. Ele publicou um guia de 32 páginas intitulado "Sobre Kvass e suas preparação", em outro em 1913 intitulado "Kvass: bebida nacional, popular, segura e barata".	Acredita-se que o Kvass seja referência ao Sobre o Tea-Kvass (nome russo para a kombucha)
Anos 1900	1904 e 1905	Algumas fontes afirmam a kombucha foi introduzida na Rússia por soldados que voltaram pra casa da Guerra Russo-Japonesa, já que a guerra aconteceu em solo asiático.	O mais provável é que a kombucha já existisse na Rússia, mas os soldados apressaram a propagação.
	Entre 1910 e 1914	Entre 1910 e 1914, uma bióloga russa chamada Dr. A. A. Bachinskaya, do Instituto médico do Laboratório da Mulher em São Petersburgo, conduziu experimentos com culturas de kombucha coletadas pelo país. Ela publicou quatro artigos apresentando a primeira morfologia e biologia da cultura, que compreende, sobre a bactéria <i>xylinum</i> e levedura torula produtoras de ácido acético descrevendo o uso generalizado e os resultados benéficos da bebida. E ainda complementou que essa bactéria foi encontrada em toda a Europa, Ásia e África, e poderia ter sido espalhada por insetos para meios adequados.	Bachinskaya (1914) observou que a bebida é eficaz para a atividade estômago-intestinal. A autora recomendava que se bebesse um pequeno copo antes de cada refeição e aumentasse gradativamente as porções.
	1913	Dr. Gustav Lindau, um micologista e botânico alemão, publicou um artigo sobre o primeiro nome científico amplamente aceito para a cultura de kombucha, <i>Medusomyces Gisevii</i> Lindeau. Ele baseia o nome com a semelhança da cultura com a aparência de uma água-viva e a teoria incorreta de que é uma cultura de apenas leveduras.	No mesmo ano, um pesquisador alemão chamado Dr. P. Linder discorda de Lindau e confirma a teoria de Bachinskaya, identificando a presença de levedura e bactérias acéticas.
	1915	O prof. Stephan Bazarewski relatou na que um remédio popular conhecido como brinum-ssene (cogumelo maravilhoso) era associado a consideráveis capacidades de cura.	Cogumelo maravilhoso ou kombucha? Os cientistas russos dedicaram os próximos 40 anos em pesquisas sobre as propriedades dessa cultura e efeitos na saúde.
	1916	Um químico polonês, chamado Josef Bolshich, provou que culturas de kombucha e kefir são diferentes, cada um com a sua própria estrutura, morfologia e com propriedades de cura inerentes.	Mais indícios de propriedades de cura da kombucha.
	1917	Dr. Rudolf Kobert, divulgou suas descobertas na revista científica <i>Mikrokosmos</i> , relatando que a kombucha é útil para distúrbios intestinais, hemorroidas e reumatismo articular.	
	Entre 1926 e 1935	Entre 1926 e 1935, mais de cem artigos de pesquisa, artigos científicos e pesquisas de médicas, a maioria da Alemanha, Rússia e outros países, discutem os benefícios da kombucha.	Recomendam consumo da kombucha para o tratamento ou alívio de condições como constipação, arteriosclerose, pressão alta, ansiedade, irritabilidade, dor, dores de cabeça, vertigem, gota, angina, diabetes, hemorroidas, disenteria,

			dispepsia, tifo, amigdalite, estomatite, má digestão e até envelhecimento.
1927	Dr. Waldeck publicou em primeira mão o relato de sua introdução à kombucha em 1915, na Rússia, com um químico que ajudou a curar a constipação de Waldeck com um lote de kombucha. O químico afirmou com orgulho que esta “bebida maravilhosa” azeda era boa para o antienvelhecimento e também para combater “todos os tipos e doenças”. Ele afirmou que era a arma secreta russa para curar soldados feridos durante a Primeira Guerra Mundial.	Waldeck voltou para a Alemanha com seu “cogumelo maravilhoso” e começou a fabricar e testar, visando especificamente sua interação com o sistema digestivo.	
1928	Dr. W. Wiechowski, membro do conselho do Instituto de Farmacologia e Farmacognosia da Universidade alemã de Praga, publicou um artigo intitulado “Em que posição um médico deve assumir a questão da kombucha?”. Além de recomendar kombucha para angina grave, constipação leve e diabetes, também defendeu que a kombucha era a defesa mais equilibrada e robusta para a saúde até então.	Primeiros relatos de que a kombucha continha elementos completamente inofensivos, sem que houvesse razão para alertar contra o seu uso.	
1931	Dr. D. Scherbachov, reacendeu o interesse russo em kombucha com um artigo na Farmácia Soviética recontando as pesquisas internacionais que mostraram a utilidade da kombucha na redução de pressão arterial e diminuição de arteriosclerose	Pesquisas sobre a utilidade da kombucha na redução de pressão arterial e diminuição de arteriosclerose	
1938	Estudos publicados estabeleceram o efeito terapêutico da kombucha relacionados a problemas digestivos, como a disenteria e dispepsia.	Estes estudos também afirmaram a segurança do consumo da bebida para crianças	
1940	Dr. Rudolf Sklenar, um alemão que morou na Rússia durante a Segunda Guerra Mundial, trabalhou com fazendeiros locais que o apresentaram o “chá milagroso”. Rudolf trouxe para casa e usou por mais de 40 anos para tratar pacientes, incluindo muitos com câncer.	Indícios de que o consumo de kombucha poderia ser utilizado para o tratamento do câncer.	
Entre 1942 e 1959	Métodos mais avançados foram criados para investigar a kombucha. Na Rússia, pesquisas foram focadas em propriedades antimicrobianas e sua eficácia em tratamentos e alívio de muitas condições, incluindo problemas intestinais, inflamações e infecções.	Indícios de que a kombucha poderia ter propriedades antimicrobianas.	
1950	Durante os anos de 1950, possivelmente os soldados italianos trouxeram de volta a kombucha após a Segunda Guerra Mundial. É conhecida por seus “poderes mágicos” e uma nova tradição começa: repassar SCOBYs para amigos somente nas terças-feiras, se feito de maneira correta, a recompensa são três desejos concedidos por Santo Antônio. kombucha passa a ser destaque em capas de revistas e artigos em toda a Itália, virando inclusive título de música “ <i>Stu fungo cinese</i> ”, de Renato Carosone.	Três médicos em um hospital em Omsk, desenvolveram um programa de pesquisa local com pacientes que beberam kombucha caseira. Os resultados indicaram que aqueles que consumiram kombucha regularmente, em seguida sentiram alívio em várias doenças, incluindo inflamação aguda, angina e problemas digestivos.	
1951	No ano de 1951, Joseph Stalin ordenou uma investigação nos potenciais e propriedades anticancerígenas da kombucha.	União Soviética e pesquisas sobre propriedades anticancerígenas.	
entre 1953 e 1957	Entre 1953 e 1957, estudos detalharam sobre a eficácia da kombucha na cura de feridas e no alívio de sintomas de doenças intestinais e tifo. Estudos russos mostraram alívio em casos de arteriosclerose, pressão alta, amigdalite aguda, estomatite severa, disenteria e outras doenças.		
1959	Estudos confirmam o benefício da kombucha na disenteria em bebês. Outros estudos também mostram que adicionando SCOBYs	Estudos dos benefícios da kombucha na disenteria de bebês.	

		na alimentação de frangos aumentava em 15% o crescimento dos mesmos.	
1960		A Guerra Fria interrompeu as pesquisas sobre kombucha na Rússia e no Leste Europeu.	
1964		Dr. Rudolf Sklenar publicou na Alemanha sua descoberta sobre o uso da kombucha no tratamento de pacientes com câncer.	Alemanha e as descobertas sobre uso da kombucha e o tratamento do câncer.
1970		Artigos científicos chineses descrevem a estrutura da celulose do SCOBY e identificam os componentes do fermento.	Pesquisas chinesas e as primeiras descrições sobre a microbiota.
década de 1980		Há indícios de que Ronald Reagan (presidente dos EUA) ouviu que Aleksandr Solzhenitsyn (escritor russo) supostamente combateu câncer bebendo kombucha durante seu longo tempo de prisão. Os assessores de Reagan adquiriram uma cultura para o presidente quando estava com câncer, e ele consumiu um litro de Kombucha por dia até a sua morte anos depois.	
1983		Kombucha foi listada por Keith Steinkraus (cientista alimentar americano) em seu livro <i>Handbook of Indigenous Fermented Foods</i> .	Kombucha incluída como um alimento fermentado no livro <i>Handbook of Indigenous Fermented Foods</i> .
1985		Dr. Rudolf Sklenar, em colaboração com a sua sobrinha Rosina Fasching, publicaram <i>Tea Fungus Kombucha, The Natural Remedy and Its Significance in Cases of Cancer and Other Metabolic Diseases</i> . O volume inclui seu protocolo de tratamento e também diversos depoimentos de pacientes com diferentes doenças	
1987		Dr. Veronika Carstens, Primeira-Dama da Alemanha, publicou um artigo em revista <i>Help from Nature – My Remedies against Cancer</i> , relatando especificamente o uso de Kombucha em protocolos de tratamento como “desintoxicantes”, “acelerador de metabolismo” e “melhorador de imunidade”.	
1991		Günther Frank, um apaixonado e experiente produtor caseiro de kombucha e contribuinte para a original “listserv” (um método de comunicação com um grupo de pessoas via e-mail), publicou <i>Kombucha: Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East</i> . O livro que destaca a pesquisa publicada desde o final do século dezenove, na Alemanha, Rússia e Europa Oriental, torna-se uma fonte altamente respeitada.	Publicação do livro <i>Kombucha: Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East</i>
1993		Betsy Pryor recebeu a cultura de kombucha de uma freira de um centro de meditação de Los Angeles. Ela começou a vender culturas em seu comércio <i>Laurel Farms</i> , e dois anos depois publicou seu livro <i>Kombucha Phenomenon</i> .	Publicação do livro <i>Kombucha Phenomenon</i> em 1995.
1995		Nesse ano tiveram dois marcos importantes: - Duas mulheres em Iowa (EUA) que fermentavam kombucha em casa ficaram doentes, uma morreu, ocasionando um mito que culpava a kombucha e que persiste até hoje na internet. - Michael Roussin publicou um artigo que mostra os resultados laboratoriais dos componentes da kombucha, baseado em mais de 1100 amostras pelo país. GT Dave começou a fermentar kombucha na cozinha da sua mãe e criou uma marca que gerou o império moderno do sistema comercial.	Além desse caso, a popularidade da kombucha diminuiu após um estudo de caso publicado, no mesmo ano, que vinculava o produto a dois casos de acidose metabólica grave, causando uma morte. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1995). Criação da marca GT's Kombucha, por GT Dave.

	1996	Len Porzio nomeou o SCOBY “A Cultura Simbiótica de Bactéria e Leveduras”, para diferenciar a cultura do chá. Len foi supostamente curado de um crescimento excessivo de cândida após três meses consumindo kombucha.	Definição do SCOBY, por Len Porzio
Anos 2000	2000	O interesse acadêmico em pesquisar sobre as propriedades da kombucha foram retomados em um estudo na Universidade de Cornell e despertou interesse de pesquisadores pelo mundo, desde os EUA até a Sibéria e Índia.	Inicia o chamado Movimento de Pesquisa Moderno
	2001	Em 2001, <i>Wonder Drink Kombucha</i> é fundada e seguida pelo <i>High Country</i> em 2003. São as duas primeiras bebidas engarrafadas depois do GT, marcando o início da expansão da Kombucha.	Criação da marca <i>Wonder Drink Kombucha</i> .
	2003	Em 2003, Sandor Ellix Katz, revivalista de fermentação, inclui kombucha em seu trabalho seminal <i>Wild Fermentation</i>	Kombucha incluída como um alimento fermentado no livro <i>Wild Fermentation</i> . Criação da marca High Country.
	2004	Hannah Crum, cria a <i>Kombucha Kamp</i> e em 2007 cria o site <i>Kombucha Kamp</i> , o primeiro lugar online para aprender sobre kombucha e comprar produtos.	Criação da <i>Kombucha Kamp</i>
	2010	Indústria da kombucha comercial sofre temporariamente um revés quando as garrafas foram tiradas das prateleiras dos mercados por receio sobre os seus níveis de álcool.	A chamada Crise da Kombucha de 2010, foi caracterizada como um <i>recall</i> das bebidas comercializadas nos EUA por algumas apresentarem teor alcoólico superior a 0,5%, quantidade máxima permitida pela FDA sem que seja necessário informar no rótulo. Acima desse percentual, a bebida é caracterizada como alcoólica. Aparentemente, a bebida estava saindo dos fabricantes com níveis de álcool abaixo de 0,5% e foram rotulados como tal, mas devido à fermentação contínua, pode ter ocorrido esse aumento. Essa rotulagem incorreta foi preocupante, porque poderia ter potencialmente causado graves problemas de saúde para consumidores que não poderiam consumir álcool, como crianças, gestantes e aqueles que não podem beber álcool por razões médicas (LEBLANC, 2010).
	2011	Começou um “boom” de kombucha, onde os números de marcas comerciais explodem de uma dúzia para centenas.	O “boom” da kombucha.
	2014	Em 2014, Hannah Crum e Alex LaGory fundaram o <i>Kombucha Brewers International</i> (KBI)	Fundação do KBI, associação comercial sem fins lucrativos comprometida em promover e proteger os fabricantes de cerveja kombucha em todo o mundo.
	2015	No ano 2015, a indústria de kombucha nos EUA gerou de \$500 a \$600 milhões de dólares em vendas.	

Fonte: Adaptado de Crum e LaGory (2016, p. 719 a 738).

Complementar a linha do tempo proposta por Crum e LaGory (2016), descrita no quadro 1, outros autores trazem considerações que vinculam o consumo da

kombucha a momentos históricos importantes. Young (2019) relata que a kombucha voltou a ser consumida após dois momentos importantes da história. O primeiro após a Guerra Fria, ainda na década de 1960, quando os *hippies* experimentavam remédios naturais. O segundo após o desastre de Chernobyl em 1986, quando descobriu-se um grupo de consumidores frequentes de kombucha que sofria menos com os efeitos da radiação.

Já no final dos anos 80 durante a epidemia de HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), nos EUA, a kombucha inicialmente ganhou popularidade pois acreditava-se seu consumo pudesse fortalecer o sistema imunológico comprometido (PETRUZELLO, 2017). Villareal-Soto *et al.* (2018) complementam que a kombucha ressurgiu novamente no início do século 21, tanto nos EUA, como no Canadá e na Austrália, muito em função da tendência de saudabilidade atrelada ao consumo de produtos naturais e funcionais. Após o ano de 2015, último ano referenciado por Crum e LaGory (2016), observa-se uma contínua expansão da bebida pelo mundo, evidenciada pelo aumento no número de novas marcas disponíveis no mercado, dados de impacto econômico bem como material científico gerado, essencialmente nos últimos 10 anos.

2.2.2 Tecnologia de produção, composição físico-química e microbiota

Em 17 de setembro de 2019, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamentou a produção industrial da kombucha, aprovando o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha (PIQ) em todo o território brasileiro. A Instrução Normativa (IN) nº 41 define que “kombucha é a bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia do mosto obtido pela infusão ou extrato de *Camellia sinensis* e açúcares, por cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (SCOBY)”. Ainda complementa que a bebida que contiver álcool acima de 0,5% v/v deve ser denominada de kombucha alcoólica, como rotulagem obrigatória. Já “na rotulagem da kombucha sem álcool somente poderá ser utilizada a expressão “zero álcool”, “zero % álcool”, “0,0%”, ou similares, no produto que contiver até 0,05% v/v de álcool” (BRASIL, 2019).

A Kombucha é tradicionalmente produzida a partir de chá branco, verde ou preto (*Camellia sinensis*), com adição de açúcares, e fermentado por associação simbiótica de bactérias e leveduras presentes no *starter* e no SCOBY (DUFRESNE,

FARNWORTH, 2000; JAYABALAN *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2015). Além destes tipos de chás, o oolong também já foi utilizado em estudos recentes sobre a ação antibacteriana, antioxidante e anticancerígena da kombucha. (KAEWKOD; BOVONSOMBUT; TRAGOOLPUA, 2019). O chá branco é produzido a partir das folhas novas e brotos, parte mais nobre da planta, cujas folhas não passam por nenhum tipo de fermentação. Autores sugerem que chá branco e verde têm níveis comparáveis de catequinas. (UNACHUKWU *et al.*, 2010). O chá verde também é um chá não fermentado, que contém as principais catequinas polifenólicas, como o epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequinas galato (ECG) e epicatequina (EC) (JIGISHA; NISHANT; NAVIN, 2012). Além disso, as catequinas presentes no chá verde também são parcialmente convertidas em teaflavinas (COOPER; MORRE; MORRE, 2005). O chá oolong é classificado como um chá semi-fermentado, com processo de fermentação mais curto do que o do chá preto, sendo, portanto, um período limitado de oxidação, contendo aproximadamente metade da quantidade de catequinas quando comparado ao chá verde (SAJILATA; POONAM; SINGHAL, 2008). Já o chá preto é considerado uma forma de chá totalmente fermentada, pois o processo de produção cria um pequeno tamanho de partícula das folhas tendo assim uma maior área de superficial para oxidação enzimática. Durante a fermentação do chá preto, as quinonas reagem com as catequinas e produzem novos compostos, as teaflavinas e tearubiginas (PETERSON, 2004).

O *starter* e o SCOBY são compostos por bactérias acéticas, lácticas e leveduras, e caracterizam a microbiota da kombucha (LEAL *et al.*, 2018). A presença e concentração destes microrganismos estão diretamente relacionadas as condições de processo de produção (KAPP; SUMNER, 2018). Os microrganismos encontrados na kombucha podem ser achados no *starter* e no SCOBY, podendo variar sua composição e concentração. Crum e LaGory (2016) descrevem o SCOBY como um tapete, também chamado de *zoogleia*, caracterizado por uma massa de bactérias e leveduras unidas por nanofibras de celulose. Os autores relatam que a bactéria *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente chamada de *Acetobacter xylinum*, é a maior produtora de celulose para a formação desse tapete, porém alertam sobre a possível contribuição de várias outras cepas. Por ser uma cultura simbiótica, bactérias e leveduras de um SCOBY dependem uma da outra, e isso ocorre a partir dos

subprodutos gerados nas fermentações, que servem de alimento para a continuidade do processo fermentativo misto.

Da mesma forma, outros autores descrevem o SCOBY como uma película flutuante predominantemente composta por celulose (LEAL *et al.*, 2018). Essa película/tapete protege o chá fermentado contra contaminação por outras bactérias e leveduras, além de reduzir a evaporação do líquido durante o processo (CRUM; LAGORY, 2016). Carvalhaes e Andrade (2020) chamam essa cultura, além de SCOBY, de “Mãe de Kombucha”, cujo nome técnico é *zoogleia*, pelo fato de ela gerar outras camadas culturas com o passar do tempo, à medida que transformam o chá em kombucha, necessitando de tanino, sacarose, frutose, cafeína e oxigênio, em um meio ácido para sobreviver.

Jarrell, Cal e Bennett (2000) definem o SCOBY como uma película gelatinizada formada na superfície do líquido, e a cada fermentação, uma nova camada de SCOBY é formada na parte superior em contato com o ar, que é sempre a mais recente (JARRELL; CAL; BENNETT, 2000). À medida que a fermentação ocorre há um espessamento dessa película flutuante e o desprendimento de microrganismos no caldo de cultivo (JAYABALAN *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2015). Crum e Lagory (2016, p. 29) complementam que “não são todos os SCOBYS que apresentam a mesma qualidade: como resultado, alguns naturalmente produzem uma bebida mais consistente e deliciosa que outros”. E ainda relatam que todos os organismos vivos apresentam variáveis na sua composição, e isso faz com que cada processo fermentativo seja único. Outros autores também relatam que a composição da microbiota é variável entre as fermentações, de acordo com sua origem, o clima, localização geográfica, tipo de chá e meio utilizado para o processo de fermentação (JAYABALAN *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2015; COTON *et al.*, 2017).

Villareal-Soto *et al.* (2018) explicam que a produção da kombucha passa pela combinação das fermentações alcoólica, láctica e acética, em função da coexistência de diversas espécies de microrganismos no meio (inicialmente, a fermentação ocorre a partir de microrganismos osmotolerantes e depois é dominada por espécies tolerantes ao ácido) (JAYABALAN *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2015). O processo de produção da kombucha pode variar entre uma ou duas etapas de fermentação e, conforme Reiss (1994, apud Jayabalan *et al.*, 2014) explica, o SCOBY e uma parte de *starter* são colocados em uma mistura de chá adoçado e deixados fermentar em

temperatura ambiente por 1 a 3 semanas, seguindo de engarrafamento para conter o CO₂ liberado, formando a carbonatação, sob refrigeração a 4°C.

A primeira fermentação consiste em processo aeróbio, no qual o SCOBY e o *starter* são colocados no chá com adição de açúcar (em torno de 10%) e mantidos em condições aeróbias durante alguns dias, que variam de acordo com os parâmetros envolvidos (temperatura, concentração de açúcar, pH do meio). Durante esse processo, leveduras e as bactérias que compõem o SCOBY e o *starter* hidrolisam a sacarose presente na base do chá em frutose e glicose, pela ação da enzima invertase, e produzem CO₂, ácido lático e álcool. O álcool é transformado em ácido acético devido às bactérias aeróbias que metabolizam este, entre diversos outros metabólitos, acidificando o meio. Kombuchas produzidas a partir de chá verde tem maior teor de ácido lático que as produzidas a partir de chá preto (JAYABALAN *et al.*, 2014; LEAL *et al.*, 2018; KAPP; SUMNER, 2018; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; MAY *et al.*, 2019; CARVALHAES; ANDRADE, 2020). Isso faz com que o pH (inicialmente em torno de 5) diminua, não podendo ficar abaixo de 3 (pH do trato digestivo) (LONCAR *et al.*, 2006; NUMMER, 2013; AMARASINGHE, 2018). Importante ressaltar que o pH é um fator intrínseco importante para controle de microrganismos em alimentos, impedindo o desenvolvimento da maioria dos microrganismos patogênicos (HUR *et al.*, 2014; VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018). Em um estudo realizado com kombuchas produzidas a partir de chá verde, oolong e preto, observou-se as colônias de bactérias ácido acéticas foram significativamente maiores nas preparadas com chás verde e preto, em relação a preparada com chá oolong. Consequentemente em relação ao pH, no décimo quinto dia de fermentação foi observado que os valores diferiram, sendo a kombucha de chá preto a mais ácida (pH 2,7), seguida da kombucha de chá oolong (pH 2,89) e depois de chá verde (pH 2,94) (KAEWKOD; BOVONSOMBUT; TRAGOOLPUA, 2019). Dufresne e Farnworth (2000) e Kaewkod, Bovonsombut e Tragoolpua (2019) ressaltam que tanto o ácido acético quanto o etanol apresentam atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogênicos, sugerindo que o ambiente fermentativo da kombucha tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos contaminantes que não resistam a estas condições. Ainda complementam que o tempo de fermentação também influencia nos atributos sensoriais do produto final, quanto mais tempo, mais ácido e sabor de vinagre, consequentemente menos palatável. Mas quando se relaciona com a possível saudabilidade, Chu e Chen (2006) relatam um aumento na atividade

antioxidante com o prolongamento da fermentação, embora não a recomendem em função do acúmulo de ácidos orgânicos que podem atingir níveis prejudiciais para o consumo humano. Velicki *et al.* (2014) sugerem que uma fermentação deve ser finalizada ao atingir acidez total entre 4 e 5 g/L para que se tenha uma bebida sensorialmente agradável. Além dos atributos de sabor e aroma, é possível observar que, durante a fermentação, a coloração do chá fica mais clara, e segundo Jayabalan *et al.* (2014) um dos motivos é devido a ação das enzimas microbianas sobre os polifenóis do chá.

A segunda etapa fermentativa (considerada opcional já que na sua origem histórica a kombucha era consumida após a primeira etapa de fermentação), ocorre de forma anaeróbia, quando a bebida é engarrafada. Nesta fermentação, os microrganismos presentes transformam os açúcares residuais em gás carbônico, ácido lático e álcool (REISS, 1994 apud JAYABALAN *et al.*, 2014; CARVALHAES; ANDRADE, 2020). Carvalhaes e Andrade (2020) explicam que nessa fermentação não ocorre a formação de ácido acético (sabor de vinagre), pois as bactérias que fazem essa conversão são aeróbias, portanto, não atuam em anaerobiose.

Embora atualmente a propagação do consumo da kombucha seja na forma carbonatada, a maioria dos estudos relevantes disponíveis, como Marsh *et al.* (2014), Jayabalan *et al.* (2014), Chakravorty *et al.* (2016), Neffe-Skocińska *et al.* (2017), Coton *et al.* (2017), Vitasa *et al.* (2018), Cardoso *et al.* (2020), Villarreal-Soto *et al.* (2020), que trazem a etapa de preparo da kombucha na sua metodologia, a descrevem somente até a primeira fermentação, seguindo a partir dela, com caracterizações físico-químicas e de microbiota. Historicamente, conforme a linha do tempo de Crum e LaGory (2016), todos os relatos de efeitos benéficos da bebida fazem referência ao consumo da mesma sem estar carbonatada (segunda fermentação). Já no Brasil, a IN nº 41 (BRASIL, 2019), conforme citado anteriormente, define a kombucha comercializada como “bebida fermentada obtida através da respiração aeróbia e fermentação anaeróbia”, ou seja, produzida a partir das duas etapas fermentativas.

Recentemente Suhre (2020), em sua dissertação de mestrado intitulada “Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana” realizou as análises a partir de bebidas engarrafadas (comerciais), que passaram, portanto, pela segunda fermentação, diferenciando de todos os demais estudos anteriormente citados. Porém, o mesmo trabalho não realizou caracterizações a partir de inóculos provenientes da primeira fermentação,

de modo a avaliar a evolução da microbiota e demais metabólitos. Com isso observa-se uma lacuna de estudos que avaliem as propriedades da kombucha ao longo de todo processo fermentativo. Katz (2012, p. 232) sugere que realizar a fermentação em condições estéreis evita uma forma biológica que ele chama de roleta-russa, complementando que se você “conhecer os parâmetros do ambiente seletivo necessários para fermentar bebidas e alimentos, você não estará envolvido em um jogo de roleta-russa”.

2.2.2.1 Composição físico-química

Estudos realizados por Jayabalan *et al.* (2014) e Marsh *et al.* (2014) relataram que a composição e concentração de metabólitos produzidos na kombucha variam de acordo com diversos parâmetros que influenciam na fermentação, como tempo e temperatura de fermentação, substratos usados no chá inicial, tipo de chá, microrganismos presentes no inóculo, etc. Nguyen *et al.* (2015) e Leal *et al.* (2018) enfatizam que a composição da microbiota é um parâmetro importante para a composição metabólica da bebida.

Miranda *et al.* (2016) descrevem a kombucha como um coquetel de componentes químicos, pelo fato de conter açúcares, polifenóis (provenientes do chá utilizado), ácidos orgânicos, fibra, etanol, aminoácidos, minerais essenciais (como Cu, Fe, Mn, Ni e Zn), vitaminas vitamina C e várias vitaminas B; dióxido de carbono além de substâncias antibióticas e enzimas hidrolíticas (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000); JAYABALAN *et al.*, 2014; WATAWANA *et al.*, 2015; KAPP; SUMNER, 2018; VILLAREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Além dos ácidos acético e láctico já mencionados, diversos outros metabólitos podem ser produzidos durante a fermentação da kombucha, cujos mais importantes são o ácido gliurônico, ácido glicônico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fólico, ácido malônico, ácido oxálico, ácido pirúvico e ácido úsnico (NEFFE-SKOCIŃSKA *et al.*, 2017; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Dentre esses ácidos, o que mais se destaca em função de sua vinculação com saúde é o ácido glicurônico, que é produzido na kombucha pela ação microbiana de oxidação da glicose. Em um estudo realizado por Kaewkod, Bovonsombut e Tragoolpua (2019) os autores relataram que a kombucha preparada a partir do chá preto apresentou maiores valores de conteúdo de ácido orgânico em termos de ácido glicurônico, glicônico, ácido D-

Sacarico-1,4-lactona (DSL), ácido ascórbico, acético e succínico, quando comparada ao chá oolong e ao chá verde. O ácido glicurônico tem efeito desintoxicante, porque tem a capacidade de se combinar com xenobióticos (incluindo os fenóis presentes no fígado), de forma que essas substâncias sejam excretadas com maior eficácia pelos rins, além de ser um precursor da biossíntese de vitamina C (JAYABALAN *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2015; LEAL *et al.*, 2018).

Já a produção de etanol durante o processo fermentativo é um parâmetro importante a ser controlado. De acordo como PIC da kombucha (BRASIL, 2019), teores de álcool acima de 0,5% (v/v) a caracterizam como bebida alcoólica. Estudos realizados por Ebersole *et al.* (2017), Talebi *et al.* (2017) e Suhre (2020) algumas kombuchas comercializadas apresentaram teores de álcool acima de 0,5% ABV, variando de 0,58 a 3,02%. Isso pode ser justificado pelo processo de fermentação contínua que pode ocorrer durante o transporte e armazenamento, aumentando assim os níveis de etanol nos produtos comercializados. Talebi *et al.* (2017) complementa que esse aumento nos níveis de etanol também pode estar associado à alta concentração de açúcar, levedura ativa nas bebidas e também à hidrólise de ésteres etílicos na mistura. Troitino (2017) acredita que a falta de controle de temperatura e padronização durante a segunda etapa de fermentação pode ser o principal fator que resulta na dificuldade de controle do teor de álcool durante a produção da bebida nos últimos anos. Vale ressaltar que o teor alcoólico final da bebida determina seu público-alvo de consumo e também enquadramento fiscal do produto produzido e comercializado, sendo contraindicado para mulheres grávidas e provavelmente pessoas com doença renal, pulmonar ou hepática (LEAL *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Composição da microbiota

Kozyrovska *et al.* (2012) relataram em um estudo sobre microbiota da kombucha que, por se tratar de uma cultura selvagem, o SCOBY é composto por mais de 20 tipos de bactérias e leveduras, o que pode justificar a variação entre as microbiotas de diferentes produtos (CARVALHAES; ANDRADE, 2020). Entretanto, em todos os estudos realizados, foram encontrados normalmente microrganismos dos gêneros *Acetobacter*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Gluconacetobacter kombuchae* e *Zygosaccharomyces kombuchaensis*. Esses dois últimos levam o nome de kombucha pois foram isolados primeiramente nessa cultura

(KOZYROVSKA *et al.*, 2012). Os estudos de Marsh *et al.* (2014) e Coton *et al.* (2017) corroboram com os relatos de Kozyrovska *et al.* (2012) e acrescentam sobre os gêneros e espécies de leveduras já encontrados, como *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Dekkera*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces*.

Marsh *et al.* (2014) desenvolveram um estudo objetivando identificar as populações microbianas presentes na kombucha de chá preto, cuja extração foi realizada no líquido de cultivo de 5 SCOBYs diferentes. Como resultado foram identificados 5 filos bacterianos incluindo *Actinobactérias*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* (estas representando abundância acima de 90%). Dentro deste filo as *Gluconacetobacter* representaram abundância acima de 85% na maioria das amostras e as *Acetobacter* menos de 2%. Além disso, verificaram proporções consideráveis de *Lactobacillus* e *Lactococcus*. Com relação às leveduras, estes autores verificaram predomínio de *Zygosaccharomyces* em mais de 95% de abundância nas bebidas fermentadas e *Saccharomyces* em menor abundância.

Já Chakravorty *et al.* (2016) analisaram a população microbiana em 16 lotes de kombuchas de chá preto (no SCOBY e no *starter*), em diferentes tempos, e verificaram que a levedura dominante foi do gênero *Candida* e *Lachancea sp.* foi a segunda, diferente das encontradas anteriormente por Marsh *et al.* (2014), que mostraram uma clara dominância dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Saccharomyces* (Marsh *et al.*, 2014). Chakravorty *et al.* (2016) verificaram a presença, mesmo que em proporções baixas, de *Saccharomyces* (tanto no SCOBY como no *starter*), mas não verificaram de *Zygosaccharomyces*. Em relação a população bacteriana, foi observada a máxima diversidade no sétimo dia de fermentação, com diversidade superior no *starter* do que no SCOBY. *Komagataeibacter sp.* e *Gluconobacter sp.* foram os gêneros mais proeminentes identificados no sistema (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016).

Coton *et al.* (2017), por sua vez, realizaram um estudo objetivando comparar comunidades microbianas de kombuchas de chá preto e verde e verificaram que as espécies bacterianas dominantes pertenciam a *Acetobacteraceae* e a um *Lactobacteriaceae* em menor extensão, enquanto as principais leveduras identificadas corresponderam a *Dekkera*, *Hanseniaspora* e *Zygosaccharomyces* durante todas as fermentações. Entre bactérias ácido acéticas, *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconobacter oxydans*, *Komagataeibacter saccharivorans* e *Acetobacter peroxydans*

foram identificadas como espécies dominantes. A principal bactéria láctica, *Oenococcus oeni*, foi fortemente associada às fermentações do chá verde. O tipo não influenciou a comunidade de leveduras, com *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Hanseniaspora valbyensis* como o mais dominante.

O estudo mais atual realizado por Villarreal-Soto *et al.* (2020) buscou realizar o sequenciamento metagenômico em três kombuchas de diferentes origens produzidas a partir de chá preto. Como resultados, verificaram vários gêneros bacterianos dominantes, como *Komagataeibacter*, *Gluconacetobacter* e *Gluconobacter*. Já as leveduras mais dominantes identificadas foram *Brettanomyces* e *Schizosaccharomyces*

Nos resultados do seu estudo realizado a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA de kombuchas comercializadas no Brasil, Shure (2020) identificou uma diferenciação na comunidade bacteriana entre as amostras de diferentes marcas. *Firmicutes* foi o filo predominante em 4 marcas enquanto *Proteobacteria* foi predominante em uma marca. Relata também que outras bactérias menos abundantes foram encontradas, representando os filos *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria*, *Thermi*, *Verrucomicrobia* e *Nitrospirae*. Quanto ao gênero, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Enterobacter* apresentaram abundâncias relativas maior ou igual 1,0%. Em três marcas houve predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*, em duas marcas *Oenococcus* foi o gênero predominante e apenas uma marca apresentou maior abundância do gênero *Gluconacetobacter*. Já nos estudos anteriormente citados (MARSH *et al.*, 2014; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COTON *et al.*, 2017; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2020) o gênero *Gluconacetobacter* foi o que apresentou mais abundância. Segundo Shure (2020), no que se refere a espécies, *Bacillus flexus*, *Lactobacillus ruminis*, *Oenococcus oeni* e *Gluconacetobacter intermedius* foram as principais bactérias identificadas nas amostras, sendo *Oenococcus oeni* a espécie bacteriana predominante em 2 marcas, enquanto *Lactobacillus ruminis* em 3 marcas.

No que diz respeito à comunidade fúngica, Shure (2020) relata que a diversidade foi relativamente baixa quando comparada a diversidade bacteriana, *Ascomycota* foi o filo predominante em todas as 6 marcas e em gênero, *Dekkera* e *Lancea* apresentaram abundâncias relativas maiores ou iguais a 1,0% estando o gênero *Dekkera* presente em todas as marcas estudadas. Também foram identificados em menor abundância os gêneros fúngicos *Wallemia*,

Rhodospiridiobolus, *Candida*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Naganishia*, *Starmerella*, *Cyberlindnera*, *Filobasidium*, *Papiliotrema*, *Setophoma*, *Malassezia*, *Kloeckera*, *Bullera*, *Pichia*, *Hymenochaete* e *Meyerozyma*. Em nível de espécie, os fungos predominantes nas marcas de kombucha analisadas foram *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis* e *Lachancea fermentati*.

Para Nguyen *et al.* (2015) diversos desses microrganismos têm papéis bem estabelecidos na fermentação da kombucha, porém como a composição da microbiota pode variar, muitas espécies e suas interações ainda não estão bem caracterizadas. Dufresne e Farnworth (2000) e Crum e LaGory (2016) descrevem que a bactéria *Gluconacetobacter xylinus* é a principal responsável pela síntese da matriz de celulose que acomoda a microbiota da kombucha, promovendo assim a associação entre as bactérias e leveduras. E complementam que a cafeína e outras substâncias estimulantes similares presentes no chá estimulam a síntese de celulose bacteriana. Além disso, Nguyen *et al.* (2015) relatam que as bactérias do gênero *Gluconacetobacter* podem oxidar etanol em ácido acético e acetato em CO₂. Já *Gluconacetobacter intermedius* (anteriormente identificada como *Acetobacter intermedius*) segundo relatam Tyagi *et al.*, 2016, é uma espécie identificada como produtora de celulose e pode estar associada à formação do SCOBY.

Diante do exposto, observa-se diferenças na composição da microbiota quando comparados os resultados dos diferentes estudos realizados. Embora os estudos de Marsh *et al.* (2014), Chakravorty *et al.* (2016), Coton *et al.* (2017) e Villarreal-Soto *et al.* (2020) tenham similaridades no que diz respeito a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) e caracterização da microbiota de kombuchas de primeira fermentação, as diferenças de origens dos SCOBYs e *starters*, além dos parâmetros de processo, são fatores importantes a serem considerados para a variação das culturas. O estudo de Suhre (2020) diferencia-se ainda mais em função da caracterização da microbiota ter sido realizada nas bebidas comercializadas engarrafadas (que passaram pela segunda fermentação). Certamente a complexidade da comunidade simbiótica e diversidade dos microrganismos estão diretamente relacionadas a todos esses fatores, que talvez possam ser padronizados somente com a realização de processos fermentativos em condições controladas.

2.2.3 Kombucha e saúde

Na China, a kombucha é chamada de elixir da longevidade, e Chen e Liu (2000) a consideram um produto de alto valor nutricional, probiótico e funcional, tendo no produto final importantes metabólitos como ácido glicurônico, ácido hialurônico, ácido acético, ácido láctico, ácido fólico, aminoácidos, ferro, vitaminas do complexo B, entre outros, resultantes do processo fermentativo. Os autores ainda relatam que o consumo da kombucha ajuda no equilíbrio de uma forma geral, modulando e aumentando a imunidade. Crum e LaGory (2016) descrevem um relato do Dr. H. Waldeck, no ano de 1915 que, consumiu a kombucha pela primeira vez, ajudando a curar sua prisão de ventre. A bebida foi oferecida por um químico, que a considerava “bebida maravilhosa”, uma arma secreta russa, já que combatia todos os tipos de doenças, e servia inclusive para curar os soldados feridos durante a Primeira Guerra Mundial. Foram gerados nessa época, os primeiros relatórios médicos que se tem notícias (CRUM; LAGORY, 2016).

Esses estudos têm mostrado que o consumo da bebida pode ajudar na redução do risco de doenças crônicas, além de benefícios antioxidantes, atividade antimicrobiana, efeito probiótico, propriedades anticarcinogênicas, propriedade desintoxicante e efeito hepatoprotetor (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN, *et al.*; 2014; WATAWANA, *et al.*; 2015; CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; CRUM; LAGORY, 2016). Considerando que a kombucha é uma bebida produzida a partir da fermentação de *Camellia sinensis* (de chá branco, verde, oolong ou preto), estudos demonstraram que os polifenóis presentes no chá podem permanecer na bebida após o processo fermentativo. Leal *et al.* (2017) descrevem que polifenóis possuem potencial de proteção contra o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, inibindo enzimas e interrompendo processos que resultam no crescimento de células que causam neoplasias malignas. González (2003) complementa que os polifenóis do chá, principalmente do chá verde, podem ter relação com a prevenção de doenças cardiovasculares (a partir da inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade), além de poderem atuar na inibição da enzima lipase pancreática, diminuindo o colesterol e a absorção de triacilglicerol (SOUSA *et al.*, 2007; BELLASOUED *et al.*, 2015). Autores relatam que os compostos que são produzidos durante os processos de produção de diferentes tipos de chá afetam de forma

marcante a composição e o conteúdo fenólico total encontrado nas kombuchas (TALAWAT *et al.*, 2006).

Um estudo de Bellassoued *et al.* (2015) traz dados interessantes, sobre a manutenção e possível evolução dessas propriedades cujos resultados sugerem que a kombucha contém mais compostos fenólicos do que o chá verde, explicando que a concentração de compostos fenólicos totais aumenta progressivamente até o décimo segundo dia de fermentação, o que provavelmente pode ter acontecido porque as enzimas liberadas pelas bactérias e leveduras durante a fermentação degradaram os polifenóis complexos gerando moléculas pequenas, que por sua vez resultaram no aumento de compostos fenólicos totais. Chakravorty *et al.* (2016) complementam que a quantidade relativa total de polifenóis e flavonóides no chá fermentado, comparado ao chá não fermentado, aumenta em 54% e 24%, respectivamente, durante 21 dias de fermentação.

Do ponto de vista da composição microbiana, relata-se popularmente que a kombucha fornece uma ampla fonte de bactérias e leveduras (cultura simbiótica) probióticas, que auxiliam na nutrição e crescimento dos microrganismos úteis para o trato digestivo, desde que não sofram nenhum processamento que as remova ou inviabilize (KOZYROVSKA *et al.*, 2012; SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020). O termo simbiótico é definido como a existência de moléculas probióticas e prebióticas¹ juntas nos alimentos e acredita-se que a kombucha contenha microrganismos probióticos e microcelulose que atuam como um componente prebiótico (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020).

Em seu estudo de revisão sobre o potencial probiótico da kombucha, Sengun e Kirmizigul (2020) relataram que em geral, algumas bactérias e leveduras encontradas na kombucha (podendo conter mais de 50 variedades diferentes) são consideradas probióticos potenciais. Kozyrovska *et al.*, (2012) e Watawana *et al.* (2015) explicam que uma mistura probiótica geralmente contém *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* ou ainda uma mistura dessas duas cepas. *Saccharomyces cerevisiane* var. *cerevisiae* e *Saccharomyces cerevisiae* também podem estar presentes nesta mistura. Segundo a FAO e WHO (2006), membros dos gêneros

¹Segundo a FAO e WHO (2006) prebióticos são geralmente definidos como "ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou um número limitado de espécies bacterianas já estabelecidas no cólon e, portanto, em vigor melhorar a saúde do hospedeiro".

Lactobacillus e *Bifidobacterium* são os principais microrganismos probióticos utilizados, mas essa propriedade não se limita a eles, e, portanto, tem sido observado número crescente de alimentos probióticos no mercado. Para uso em alimentos, os microrganismos probióticos devem ser resistentes aos sucos gástricos e capazes de crescer na presença de bile sob condições nos intestinos, ou ser consumido em um alimento veículo que lhes permite sobreviver à passagem pelo estômago e à exposição à bile. É a capacidade de permanecer viável no local de destino e de ser eficaz que deve ser verificada para cada cepa potencialmente probiótica. Uma vez que as propriedades probióticas estão relacionadas à cepa, sugere-se que a sua identificação (tipagem genética) seja realizada, com metodologia como eletroforese em gel de campo de pulso (Pulse Field Gel Electrophoresis PFGE). Testes fenotípicos seguidos por identificação genética são recomendados, usando métodos como hibridização DNA/DNA, sequenciamento de rRNA 16S ou outros métodos internacionalmente reconhecidos.

Matei *et al.*, (2018) descrevem que para demonstrar que a kombucha é um alimento probiótico, o número de células vivas probióticas deve ser de pelo menos 10^6 unidade formadora de colônia (ufc) por mL de produto e testes *in vitro* devem ser aplicados para microrganismos isolados da kombucha. Após as etapas de isolamento e identificação, as cepas classificadas devem ser testadas em termos de atividade antagonista contra outros microrganismos, resistência à acidez gástrica, sais biliares e fenol, aderência aos tecidos intestinais, atividade antimicrobiana, produção de bacteriocina e ácidos graxos de cadeia curta (*Short Chain Fatty Acids* - SCFAs), susceptibilidade a antibióticos, etc. (FAO/WHO, 2006).

Sengun e Kirmizigul (2020) concluem relatando as limitações dos estudos existentes sobre a microbiota da kombucha e também sobre não terem sido realizados, nos últimos 10 anos, nenhum estudo sobre os efeitos probióticos em humanos, embora os efeitos em animais tenham sido confirmados. Sugere, ainda, o uso de tecnologias ômicas² para pesquisas na determinação das propriedades probióticas de cepas, para superar as deficiências encontradas nos modelos tradicionais *in vitro* e *in vivo*.

² As tecnologias ômicas incluem genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. A genômica revela as sequências estáticas de genes e proteínas, enquanto a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica revelam a função biológica do produto gênico (DEBNATH; PRASAD; BISEN, 2010).

Embora seu consumo seja frequentemente associado a saúde, como tais propriedades ainda não são comprovadas cientificamente, a legislação brasileira através da IN nº41 de 2019, veda o uso de alegações funcionais e de saúde não autorizadas pela legislação específica da kombucha (BRASIL, 2019). Para que a alegação de funcionalidade seja possível, é necessário que a empresa produtora realize um dossiê técnico e o submeta à ANVISA, seguindo os requisitos previstos na Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, que aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Portanto, considerando que as alegações de funcionalidade devem ser acompanhadas de comprovações, em relação a presença de cepas probióticas, até o momento, nenhum produtor brasileiro de bebida kombucha conseguiu fazer esse tipo de alegação de forma autorizada por não haver literatura científica que corrobore o fato (BRASIL, 1999). Ademais, a mesma IN nº41 indica que no rótulo da bebida kombucha comercializada “fica proibido o uso de expressões tais como: artesanal, caseira, familiar, bebida viva, bebida probiótica, bebida milenar, elixir, elixir da vida, energizante, revigorante, especial, premium, dentre outras que atribuam características de qualidades superlativas e propriedades funcionais não aprovadas em legislação específica” (BRASIL, 2019).

Alguns autores também têm investigado as propriedades anticancerígenas da kombucha. Jayabalan *et al.* (2011) estudaram as propriedades citotóxicas e anti-invasivas de frações de kombucha de chá preto contra células cancerígenas A549 (carcinoma pulmonar humano), U2OS (carcinoma ósseo humano) e 786-O (carcinoma renal humano) e verificaram que malonato de dimetil 2-(2-hidroxi-2-metoxipropilideno) e vitexina, que possivelmente seriam os compostos responsáveis pelas propriedades anticancerígenas. Srihari *et al.* (2013) estudaram o efeito da kombucha de chá preto contra células PC-3 (câncer de próstata) e verificam diminuição significativa das células cancerosas através da inibição da expressão de moléculas que estimula a angiogênese. Além disso pode levar à inibição do crescimento de tumores e uma probabilidade reduzida de metástases de câncer.

Em um estudo mais recente, Villarreal-Soto *et al.* (2019) testaram a utilização de kombucha de chá preto contra linhagens celulares de câncer de mama humano (MCF-7) e câncer de cólon humano (HCT-116). Como resultado observaram um aumento da atividade anticarcinogênica para ambas linhagens celulares, já que após a fermentação, a kombucha foi capaz de produzir compostos bioativos com diferentes

polaridades, obtendo um aumento de inibição em todos os extratos testados em relação ao chá não fermentado. Já um estudo realizado por Kaewkod, Bovonsombut e Tragoolpua (2019), os autores analisaram a ação de kombuchas preparadas a partir de chá verde, oolong e preto contra células cancerosas colorretais Caco-2, e os resultados demonstraram que as kombuchas produzidas a partir dos diferentes chás e, fermentadas durante 15 dias, apresentaram toxicidade efetiva contra essas células.

Além das atividades já mencionadas, autores têm estudado sobre a possível atividade antimicrobiana da kombucha, em função da sua atividade inibitória em relação a microrganismos patogênicos, como *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium*. De uma maneira geral, a presença dos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo parece ser a responsável por esse efeito antimicrobiano, lembrando que a composição da microbiota está diretamente relacionada a esses metabólitos que são produzidos, e que, portanto, acabam variando nas bebidas produzidas em diferentes locais (SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000; SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2001; BATTIKH, BAKHROUF; AMMAR, 2012).

No ano de 2019 os autores Kapp e Sumner (2019) publicaram uma revisão sistemática sobre as evidências empíricas dos benefícios da kombucha para a saúde humana. Um dos pontos discutidos foi em relação aos riscos potenciais dessa bebida para a saúde humana, e os autores verificaram que embora existam vários relatos de casos ainda não se têm evidências científicas que os confirmem. Alguns dos casos relatados pelos estudos analisados foram de acidose láctica, hepatite tóxica (após consumo de kombucha diariamente por dois anos), diagnóstico de vírus da imunodeficiência humana apresentando caso de hipertermia, acidose láctica e insuficiência renal aguda (15 horas após a ingestão de kombucha), reação alérgica, icterícia náusea, vômito, dor de cabeça e hepatotoxicidade e hepatite colestática. Porém, até o momento da publicação dessa revisão, as atividades biológicas haviam sido estudadas em animais (ratos, camundongos, coelhos, patos, cachorros, porcos, gado e frangos de corte) e em linfócitos de sangue periférico humano. Baschali *et al.* (2017) alertam sobre a importância de ensaios clínicos em humanos para que se possa compreender os reais benefícios do consumo da kombucha para a saúde (NGUYEN *et al.*, 2015; MATEI, 2018).

3 METODOLOGIA

A metodologia descrita nos subitens a seguir serão utilizadas nas diferentes etapas do desenvolvimento da pesquisa, conforme pode ser visualizado no quadro 2.

Na produção tradicional da kombucha, o termo cultura *starter* é utilizado para definir o extrato líquido iniciador, no qual o SCOBY é cultivado e mantido, durante a primeira fermentação (processo aeróbio). A expressão (cultura *starter*) será utilizada, portanto, ao longo da presente pesquisa, para denominar o líquido iniciador, também identificado como sobrenadante.

Quadro 2: Etapas do desenvolvimento da pesquisa

	ETAPAS		METODOLOGIA
Caracterização do SCOBY e do sobrenadante	1	Padronização do cultivo e manutenção do SCOBY	3.1.1
	2	Caracterização da microbiota do SCOBY e do sobrenadante (cultura <i>starter</i>)	3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3
	3	Análises físico-químicas do sobrenadante (cultura <i>starter</i>)	3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6, 3.3.7, 3.3.8 e 3.3.9
	4	Análises microbiológicas da bebida do SCOBY e do sobrenadante (cultura <i>starter</i>)	3.4.1 e 3.4.2
	5	Isolamento de Microrganismos	3.5
Caracterização da kombucha	6	Estudo cinético e otimização do processamento da bebida kombucha	3.6
	7	Caracterização da microbiota da bebida kombucha	3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3
	8	Análises físico-químicas da bebida kombucha	3.3.1, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6, 3.3.7, 3.3.8 e 3.3.9
	9	Análises microbiológicas da bebida kombucha	3.4.1 e 3.4.2
	10	Determinação do Potencial Antioxidante – DPPH, ABTS, FRAP – da bebida kombucha	3.7.1, 3.7.2, 3.7.3 e 3.7.4

Atividades da kombucha	11	Avaliação do efeito antitumoral da bebida kombucha em diferentes células de câncer (<i>in vitro</i>)	3.8.1, 3.8.2, 3.8.3, 3.8.4, 3.8.5, 3.8.6, 3.8.7, 3.8.8
	12	Estudo da atividade antimicrobiana da bebida kombucha	3.9.1 e 3.9.2
	14	Estudo do efeito probiótico da kombucha (<i>in vitro</i>)	3.10

Fonte: Elaborado pela autora.

3.1. Padronização do cultivo e manutenção do SCOBY

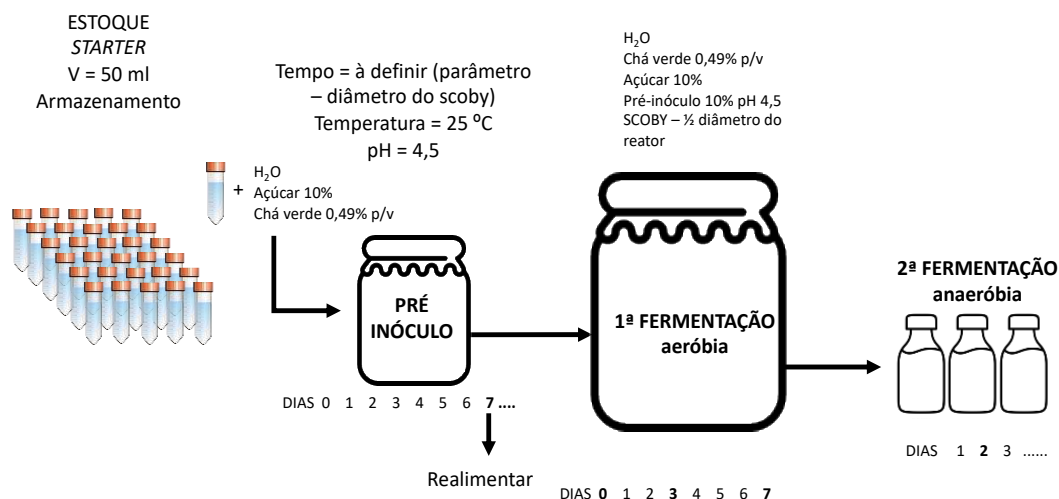
3.1.1. Amostras, armazenamento e manutenção do SCOBY

A amostra de cultura *starter* com aproximadamente 1 litro, obtida com produtor parceiro, será inicialmente armazenada em recipiente de vidro previamente esterilizado. A amostra será transportada até a UFCSPA em temperatura de refrigeração de 5 ± 1 °C.

Imediatamente a cultura *starter* será distribuída em tubos falcon estéreis de 50 mL, com adição de glicerol, e armazenados sob congelamento. Esse procedimento resultará em um estoque inicial de cultura *starter*, que será utilizado para o desenvolvimento de todo o estudo. Na figura 1 pode-se observar a sequência da metodologia proposta inicialmente.

A manutenção do SCOBY e primeira fermentação serão inicialmente realizadas seguindo metodologia descrita por Marsh *et al.* (2014), que irá servir como embasamento para a criação de um protocolo próprio.

Figura 1: Sequência metodológica do processo de produção da kombucha.



Fonte: Elaborado pela autora.

O pré-inóculo (figura 1) será produzido com base na metodologia proposta por Marsh *et al.* (2014) (descrita a seguir) entretanto utilizando-se somente a cultura *starter* sem adição do SCOBY, que será adicionada no caldo elaborado a partir da infusão de chá verde em água, e adição de sacarose. O propósito é que, nesta etapa, o SCOBY seja criado naturalmente a partir do *starter*, para que então se tenha o controle exato das condições iniciais de cultivo. A cada 7 dias o pré-inóculo será realimentado com o caldo (mesmas condições da infusão inicial), até que se atinja o tamanho ideal de SCOBY (metade do diâmetro do reator da primeira fermentação). Carvalhaes e Andrade (2020) sugerem que a formação do SCOBY na superfície do reator ocorre de forma lenta e gradual, inicialmente com pontos esbranquiçados na superfície, evoluindo para uma fina película transparente (em aproximadamente 10 dias, e mais cor e espessura com no mínimo 20 dias).

Para a elaboração do caldo, dois litros de água serão esterilizados a 121 °C por 15 minutos em um recipiente de vidro de 3 L. A água será levada à ponto de ebulição e então adicionado chá verde a 0,49% p/v e deixado em infusão por 15 minutos. Após a remoção das folhas de chá, será adicionado sacarose a 10%, seguindo de agitação para que ocorra a dissolução. Será realizado resfriamento da solução até a temperatura ambiente (23 °C), e adicionado chá fermentado a 10% (da fermentação

anterior de kombucha com a mesma origem, correspondente à cultura *starter* mencionada acima) para acidificar a solução. O recipiente será coberto com um pano 100% algodão e fixado com um elástico. As culturas serão fermentadas à temperatura ambiente (23 °C) e novamente inoculadas em chá fresco a cada 7 dias, seguindo os mesmos procedimentos já descritos.

Conforme pode ser visualizado na figura 1, para a primeira fermentação (aeróbia), além de 10% da cultura *starter*, o SCOBY criado também será adicionado ao reator, juntamente com a infusão de chá e a sacarose. Passados 7 dias, o líquido da primeira fermentação será engarrafado e hermeticamente fechado, para que ocorra a segunda fermentação (anaeróbia) durante 24 horas, resultando na bebida kombucha. Para a segunda fermentação pretende-se testar a adição de um pouco de sacarose como um *priming* para a segunda fermentação, mas atentando para o residual que possa ser gerado.

3.2. Caracterização da Microbiota

3.2.1 Preparo das amostras e extração dos ácidos nucleicos

A extração de DNA será realizada a partir do SCOBY e do líquido obtido na primeira fermentação (coletados nos dias 0, 3 e 7) e na segunda fermentação (coletado no dia 2) as quais ocorrem de forma aeróbia e anaeróbia, respectivamente. Para o SCOBY, DNA total será extraído a partir de 0,25 g de película celulósica obtidos do SCOBY (tapete de superfície de uma fermentação fresca) bem como do líquido coletado em diferentes momentos da primeira e segunda fermentação. Em cada coleta, um volume de 50 mL de kombucha será aliquoteada e centrifugada a 5.000 G por 30 min. Os pellets resultantes e a película celulósica serão tratados com as enzimas mutanolisina (100 U / mL) e lisozima (50 mg / mL) a 37 ° C por 1 hora e então submetidos à extração de DNA utilizando o kit PowerFood® Microbial DNA Isolation Kit conforme instruções do fabricante (MoBio Laboratories Inc, EUA). O DNA obtido será diluído em água ultra-pura para análise em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) em português CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) bem como para a avaliação microbiológica por sequenciamento de alto desempenho.

3.2.2. Sequenciamento e Análise de dados

Para caracterizar a microbiota presente na kombucha, DNA total extraído será utilizado para a amplificação da região V4 do gene 16S rRNA utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 515F and 806R (CAPORASO *et al.*, 2011). A reação de amplificação será realizada em um volume de 50 µL contendo 1 X Buffer, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de cada primer, 2U Platinum Taq DNA Polymerase (INVITROGEN, Califórnia, EUA) e 12,5 ng do DNA. A reação será conduzida em termociclador (Applied Biosystem) seguindo as condições: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e, extensão final de 72 °C por 5 minutos. A amplificação será verificada em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio. Os produtos obtidos serão purificados utilizando Agencount AMPure XP beads (Beckman Counter life Sciences, Indianapolis, IN, USA) seguindo instruções do fabricante.

Os produtos purificados serão utilizados para confecção das bibliotecas de acordo com protocolo da Illumina. O sequenciamento de alto desempenho será conduzido na plataforma MiSeq Illumina utilizando o kit MiSeq Reagent Nano v2 (500 cycles; Illumina, USA).

3.2.3. Análise de dados

A análise dos dados obtidos no sequenciamento de alto desempenho será conduzida utilizando a plataforma de bioinformática de microbioma QIIME 2 (*Quantitative Insights Into. Microbial Ecology*) (BOLYEN *et al.*, 2019). As sequências obtidas serão filtradas por qualidade e quimeras serão removidas através do q2-dada2 *plugin* com DADA2 *pipeline* (CALLAHAN *et al.*, 2016). As sequências restantes serão alinhadas com o software MAFFT (*Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences*) (KATO, 2002) e usadas na construção da filogenia com fasttree2 (PRICE *et al.*, 2010). A classificação taxonômica será baseada em 99% de similaridade com sequências referências no banco de dados Greengenes, considerando *Amplicon Sequence Variant* (ASV) (BOKULICH *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos no QIIME2 serão exportados para o R Studio para análise de dados. *Alpha-diversity metrics* (Shannon, Simpson Chao1), *beta diversity*

metrics Weighted UniFrac, unweighted UniFrac (LOZUPONE *et al.*, 2007), *Jaccard distance* e *Bray-Curtis dissimilarity* serão estimados utilizando *Microbiome* v1.6.0 e *Phyloseq* v1.28.0 *R packages* (MCMURDIE; HOLMES, 2013). A abundância diferencial entre as amostras será avaliada utilizando ANCOM, o qual permite comparar a composição de microrganismos entre grupos. As sequências obtidas serão depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3.3. Análises físico-químicas

3.3.1 Pré-processamento das amostras

Serão analisadas amostras do *starter* da primeira fermentação (dias 0, 3 e 7) e da segunda fermentação (dia 2).

Os líquidos serão colocados em tubos falcon estéreis. Os tubos serão centrifugados durante 5 minutos, a 5000 G e 4° C. Os sobrenadantes coletados serão descarbonatados em banho ultrassônico e então realizadas as análises físico-químicas.

3.3.2. pH

O pH será analisado utilizando pHmetro eletrônico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.3.3. Açúcares

Açúcares redutores serão analisados pelo método de DNS (ácido dinitrossalicílico) (CHAPLIN, 1986). Além dessa metodologia, também serão realizadas análises de açúcares utilizando a metodologia descrita por Sehnem *et al.* (2017). Os açúcares serão determinados em HPLC com detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-Rad HPX-87H (300x7,8 mm) usando como eluente fase móvel de ácido sulfúrico 5 mM, e vazão de 0,6 mL min⁻¹.

3.3.4. Acidez total

A acidez total será analisada segundo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O CO₂ será eliminado utilizando um agitador magnético ou banho de ultrassom. Resumidamente, 10 mL de amostra descarbonatada será transferida para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de água ao qual será adicionado 0,5 mL de indicador fenolftaleína. Será realizada a titulação com hidróxido de sódio 0,1 N padronizado até o aparecimento de coloração rósea persistente na amostra. A acidez total será então expressa em meq/L segundo a equação:

$$n \cdot N \cdot f \cdot 1000 = \text{acidez em meq/L } V$$

n = volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL
M = normalidade da solução de hidróxido de sódio

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

V = volume tomado da amostra, em mL

3.3.5. Acidez volátil

A acidez volátil será determinada segundo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação será realizada por volumetria após a destilação por arraste de vapor. Resumidamente, 10 mL da amostra será colocada em borbulhador junto com 250 mL de água isenta de CO₂ no aparelho gerador de vapor de Cazenave-Ferré (ou conjunto similar de destilação por arraste de vapor). O condensador será conectado. O aparelho de Cazenave-Ferré será aquecido em chapa elétrica até a ebulição com a torneira de vapor aberta, de modo a eliminar o ar do conjunto, bem como, se houver, o gás carbônico da água destilada. Após o início de ebulição, a torneira deverá ser fechada, de modo que o vapor de água borbulhe na amostra arrastando os ácidos voláteis. Será recolhido 100 mL do destilado em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 mL de água destilada. 1 mL de solução de indicador fenolftaleína será adicionada ao destilado e, em seguida, será realizada a titulação com hidróxido de sódio padronizada, até que haja o aparecimento de coloração rósea persistente por 30 s. O cálculo de acidez volátil será realizado utilizando a mesma equação do método de acidez total descrito no item 3.3.4.

3.3.6. Acidez fixa por diferença

A acidez fixa será realizada segundo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Será calculado por diferença entre a acidez total (item 3.3.4) e a acidez volátil (item 3.3.5). O resultado será expresso em meq/L.

3.3.7. Ácidos orgânicos

As análises de ácidos orgânicos serão realizadas empregando a metodologia descrita por Jayabalan, Marimuthu e Swaminathan (2007). As análises serão realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (HPLC/DAD). Será usada coluna Phenomenex Luna C-18. A fase móvel utilizada será uma mistura de Dihidrogenofosfato de potássio 20 mM, pH 2,4 e metanol (97:3). A vazão utilizada será de 1,0 mL min⁻¹ e a temperatura de 28 °C. A detecção será realizada a 220 nm.

3.3.8. Etanol

Propõe-se a utilização de duas metodologias para a quantificação do teor alcoólico, para fins de comparação e obtenção de melhores resultados: Cromatografia Gasosa (CG) e *Alcolyzer*. Segundo PAAR (2018) *Alcolyzer* é um equipamento usualmente utilizado pelo MAPA para a fiscalização de bebidas alcoólicas, por ser mais acessível e com menores tempos de medição.

3.3.8.1 Cromatografia Gasosa

As análises de etanol serão realizadas de acordo com metodologia adaptada de Ebersole *et al.* (2017). Resumidamente, as análises serão realizadas em CG-FID, CG com FID (*Flame Ionization Detector* - detector de ionização de chama). Os vials com amostra serão incubados a 70 °C por 30 min. A temperatura do forno será inicialmente de 40 °C por 10 min, com aumento de 25 °C por min até 240 °C, sendo essa última temperatura mantida por 1 min. A temperatura de injeção será de 150°C e a temperatura do FID será de 250 °C. Hélio será usado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min⁻¹.

3.3.8.2 *Alcolyzer Beer*

A determinação do grau alcoólico será realizada em triplicata, através de densímetro eletrônico acoplado a espectrofotômetro NIR (*Near Infra-red*) Anton Paar DMA 4500M *Alcolyzer* ME (através de colaboração com o laboratório do MAPA), pelo método *Alcolyzer Beer*, para bebidas de baixo grau alcoólico, com tolerância de até 0,3%. Os resultados do grau alcoólico serão expressos em porcentagem de etanol.

3.3.9. Ésteres

As análises de ésteres serão realizadas de acordo com a metodologia proposta por Garavaglia *et al.* (2014). As amostras serão preparadas usando a técnica de HS-SPME (*Headspace - Solid Phase Micro-Extraction*) e serão analisadas em CG-MS, CG com MS (*Mass Spectrometry* - espectrômetro de massa)

3.4. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas serão realizadas na película de celulose (SCOBY), no *starter* e na bebida kombucha. No caso da película, 5 g de SCOBY serão homogeneizados em de 45 mL de água peptonada estéril e depois serão realizadas as diluições decimais. No caso do *starter* e da bebida, 1 mL será coletado e vertido em 9 mL de água peptonada estéril, logo após serão realizadas as diluições decimais e a semeadura conforme descrito nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

Após os períodos de incubação descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2, as UFC serão contadas, será calculada a média das duplicatas e as contagens convertidas em log UFC/g ou log UFC/mL.

3.4.1. Contagem Total de Bactérias Acéticas (CTBA) e Contagem Total de Bactérias Ácido Láticas (CTBAL)

Para determinar a CTBA será utilizado o método de superfície, em dois meios de cultura: Ágar Sabouraud Dextrose e Acetobacter Ágar com carbonato de cálcio (NEFFE- SKOCIŃSKAA *et al.*, 2017).

A CTBAL será determinada com o método de inoculação em profundidade utilizando o meio de cultura MRS Agar (de Man, Rogosa e Sharpe Agar) (NEFFE-SKOCIŃSKAA *et al.*, 2017).

3.4.2. Contagem Total de Leveduras (CTL)

A contagem de leveduras será realizada pelo método de superfície com a utilização do meio selectivo *Sabouraud Chloramfenicol Yeast Glucose Agar*, com incubação a 25 °C, por 120 horas (NEFFE-SKOCIŃSKAA *et al.*, 2017).

3.5. Isolamento de Microrganismos

A partir do resultado do sequenciamento de DNA, será observada a presença de microrganismos de interesse tecnológico e o melhor ponto de coleta. A partir disso, será identificada a metodologia a ser utilizada para isolamento, considerando as diferentes classes de microrganismos presentes (leveduras e bactérias) conforme descrito nos estudos sobre caracterização da microbiota da kombucha de Marsh *et al.* (2014), Chakravorty *et al.* (2016), Coton *et al.* (2017) e Villarreal-Soto *et al.* (2020).

3.6. Estudo cinético e otimização do processamento da bebida kombucha

Serão realizados experimentos em escala laboratorial para otimizar a produção de etanol durante a produção da kombucha. As fermentações serão conduzidas em bateladas de 13 L em recipientes com geometria cilíndrica, não agitados. O SCOBY e o starter caracterizados no item 3.2 serão utilizados para a fermentação.

Será adotada a metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). A variável de resposta será a concentração de etanol. Para determinar quais nutrientes e condições de cultivo têm efeito na produção de etanol, serão utilizadas como variáveis independentes durante a fermentação: concentração de *starter*, de SCOBY, de chá e de sacarose; temperatura de fermentação; pH inicial. Durante a fermentação haverá o controle de temperatura e serão coletadas amostras para realização de análises e acompanhamento do processo.

Na condição otimizada pelo DCCR, serão realizados experimentos para determinar o tempo apropriado de fermentação.

3.6.1. Caracterização da microbiota da bebida kombucha

Para caracterização da microbiota da bebida kombucha, serão realizadas as análises conforme técnicas descritas no item 3.2.

3.6.2. Levantamento das principais características físico-químicas da bebida kombucha

As amostras serão analisadas de forma a caracterizar o intervalo de valores dos principais parâmetros que poderão ser utilizados para descrever de forma genérica as bebidas kombucha. Serão realizadas análises de pH, açúcares, acidez, ácidos orgânicos, etanol, ésteres e compostos fenólicos, conforme técnicas descritas no item 3.3 de análises físico-químicas da presente proposta.

3.6.3. Caracterização microbiológica da bebida kombucha

Será realizada a identificação dos microrganismos presentes na bebida, conforme descrito no item 3.4. Os resultados dessas análises, juntamente com o levantamento dos parâmetros físico-químicos, serão utilizados para a proposição dos principais parâmetros microbiológicos que deverão ser observados quanto à segurança relacionada ao consumo de bebidas kombucha.

3.7 Estudo do potencial antioxidante da kombucha *in vitro*

Para a avaliação do potencial antioxidante, amostras de diferentes tempos de cultivo da bebida de kombucha serão utilizadas. A determinação do teor de compostos fenólicos será realizada através do método *Folin-Ciocalteu*.

A formação de radicais livres é a base da maioria dos métodos de análise da atividade antioxidante *in vitro*. Estes radicais livres podem ser gerados pela adição de diversos tipos de compostos cromógenos, como por exemplo, os compostos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) ou DPPH (2,2'-difênil-1-picrilhidrazila) (ARENA; FALLICO; MACCARONE, 2001; ANTOLOVICH et al, 2000). Já o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) mede indiretamente a

atividade antioxidante total da amostra a ser analisada, e de acordo com os resultados, quanto maior a intensidade da coloração e consequentemente da absorbância medida, maior será a capacidade redutora pela formação do complexo ferroso $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$. o que significa um elevado potencial antioxidante (BOROSKI *et al.*, 2015).

Portanto para o estudo do potencial antioxidante da kombucha serão utilizadas três metodologias: ABTS, DPPH e FRAP, conforme descrito nos subitens que seguem.

3.7.1. Avaliação dos compostos fenólicos presentes na kombucha

A determinação do teor de compostos fenólicos totais será realizada através do método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999; MEDA *et al.*, 2005).

A recuperação dos compostos da kombucha para análise de compostos fenólicos e cafeína será desenvolvida durante o trabalho. Um único método de separação será desenvolvido e validado para a identificação e quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos na kombucha. Para isso será utilizada coluna de fase reversa de C-18 (Zorbax, 5 μm , 150 x 4,6 mm) e as fases móveis metanol, acetonitrila, água e ácido fórmico para otimização do gradiente de separação. Será utilizado equipamento de cromatografia líquida de ultra performance com detector de arranjo de diodos (UPLC-DAD Prominence Shimadzu, Japan) e acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução equipado com fonte de ionização por electrospray (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany). Os compostos serão monitorados de 200 a 800 nm e os cromatogramas obtidos a 280 nm e 320nm para análise metilxantinas/compostos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzóico e para compostos fenólicos derivados de hidroxibenzoatos, respectivamente. Os compostos fenólicos possuem ionização preferencial em modo negativo, mas durante a otimização das condições de método para detecção e identificação simultânea com metilxantinas ambos os modos serão avaliados. As condições para focalização e fragmentação dos compostos serão avaliadas e otimizadas tomando como base condições já testadas por outros trabalhos (JAISWAL; DERMARDEROSIAN; PORTER, 2010). A identificação será realizada por análise dos dados espectrais obtidos pelo detector de arranjo de diodos, pela análise dos

espectrômetros de massas e fragmentações, pela ordem de eluição dos compostos e por comparação com dados da literatura. A quantificação será realizada por calibração externa com padrões de metilxantinas e com padrões disponíveis de compostos fenólicos. O método será avaliado com relação não somente à exatidão, mas precisão (repetitividade e reprodutibilidade), linearidade e especificidade conforme recomendações do ICH (2005).

3.7.2 Determinação da atividade antioxidante por ABTS

A determinação da atividade antioxidante pelo Método ABTS será realizada através da redução de cátion ABTS segundo o método descrito por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski *et al.* (2004). O radical ABTS $\cdot^+$ é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado o radical ABTS $\cdot^+$, o mesmo será diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm$ 0,02) a um comprimento de onda de 754 nm, a uma temperatura de equilíbrio de 30°C. A absorbância será medida em espectrofotômetro modelo (Hewlett-Packard 8452^a), nos tempos 1; 4 e 7 minutos após a adição da amostra. Serão preparadas curvas com soluções-padrão de Trolox (antioxidante sintético similar à vitamina E). Os resultados serão expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em $\mu\text{mol TEACg}^{-1}$ de amostra.

3.7.3 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

A avaliação da atividade antioxidante diante do consumo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) será realizada de acordo com a metodologia descrita por Villarreal-soto *et al.* (2019).

O método DPPH tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 520 nm do radical DPPH $\cdot$ por antioxidantes. 20 μL dos extratos fermentados de Kombucha serão misturados com 180 μL de uma solução metanólica de DPPH 0,2 mM. A mistura reacional será então incubada a 25 °C durante 30 min. Um experimento controle também será realizado usando ácido ascórbico como padrão, com o mesmo procedimento sem a amostra, e a absorbância será lida

a 520 nm. A atividade de eliminação de radicais livres de cada amostra será então calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 (\text{Abs (controle)} - \text{Abs (amostra)}) / \text{Abs (controle)}$$

3.7.4 Ensaio antioxidante do poder de redução do ferro - FRAP

O ensaio FRAP será realizado de acordo com a metodologia descrita por Benzie (1996). Os reagentes utilizados serão HCl 0,05 mM, ácido cítrico 5 mM, solução de FeCl₃ 3 mM em ácido cítrico (cloreto férrico anidro) e TPTZ (2, 4, 6 – trifridril-s-tiazina): 0,0780 g e m 250 mL HCl 0,05. A solução mãe de extrato será preparada pela diluição de 0,01 g do extrato em 1 mL do seu solvente de extração (etanol, água e etanol:água [50:50 v/v]). O preparo do meio reacional será realizado pela adição de 200 µL da solução de cloreto férrico 3M para os 4 tubos de ensaio, sendo 3 tubos por amostra (triplicatas) e 1 tubo de ensaio para o branco. Em seguida, serão pipetados 200 µL do extrato da amostra a cada tubo, com exceção do branco, no qual será adicionado 200 µL do solvente utilizada na amostra. Em seguida, os tubos serão colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Após este período, será adicionado 3,6 mL de TPTZ nas mostras e no branco, seguida pela agitação em vortex e imersão em banho frio por 10 minutos. A leitura da absorbância será realizada espectrofotômetro 620 nm.

Os resultados serão calculados a partir da equação:

$$C_{\mu\text{mol/L}} = ((\text{Abs} - \text{Absb}) - A) / B$$

Onde A e B são os coeficientes da curva padrão, Abs a absorbância da leitura da amostra e Absb a absorbância do branco.

O cálculo da atividade antioxidante será realizado pela equação:

$$C_{\mu\text{mol/gamostra}} = C_{\mu\text{mol/L}} / C_{\text{solução mãe}}$$

Onde:

$C_{\mu\text{mol/gamostra}}$ = concentração equivalente ao Trolox.

$C_{\mu\text{mol/L}}$ = concentração da solução obtida da equação 2.

$C_{\text{solução mãe}}$ = concentração da solução mãe de extrato.

3.8. Avaliação do efeito antitumoral em células *in vitro*

Para a avaliação do efeito antitumoral em células de câncer de próstata, mama, cólon e fígado, amostras diferentes tempos de cultivo da bebida de kombucha serão utilizadas.

3.8.1. Cultivo celular

Células das linhagens LNCaP, PC3, PNT1A (próstata), já disponíveis no Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA, e Hep-G2 (fígado), HT-29 (cólon) e MDA-MB-231 (mama), já disponíveis em laboratório parceiro (Laboratório de Nutrição e Cultivo Celular do Itt Nutrifor da Unisinos), serão mantidas em cultura a 37°C com 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado com kanamicina 0,5 mg/mL (Invitrogen) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco BRL). As passagens serão feitas com tripsina/EDTA (0,25% w/v e 0,53 mM, respectivamente). Quando atingirem confluência, as células serão tripsinizadas, plaqueadas em placas de 6 ou 24 poços, e divididas, conforme o experimento (identificados segundo os objetivos). Serão realizados quatro experimentos independentes com cada uma das linhagens.

3.8.2. Cálculo Amostral

Serão realizados três experimentos independentes com cada linhagem celular para cada técnica e os dados obtidos destes serão analisados estatisticamente para verificação do poder da amostra. Se necessário, serão feitos mais experimentos conforme o resultado do cálculo de poder. Para fins de orçamento, foi considerada a realização de quatro experimentos independentes.

3.8.3. Avaliação da viabilidade e proliferação celular

A proliferação e viabilidade celular serão medidas através da combinação de dois métodos diferentes: MTT e SR-B. O teste do MTT (brometo de [3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenil tetrazolium]) é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de Formazan (E,Z- 1-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan), que são cristais insolúveis em soluções aquosas. A produção de Formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória, sendo os resultados utilizados para inferir, também, proliferação celular e efeitos citotóxicos (MOSMANN, 1983).

A avaliação da proliferação celular será realizada através do Ensaio da Sulforodamina B (SR-B) (SKEHAN *et al.*, 1990). A SR-B é um corante que se liga às proteínas celulares, sendo que a quantidade de corante extraído de células pigmentadas é diretamente proporcional à massa total de proteínas e, portanto, permite inferir o número de células presentes. A proliferação celular será avaliada em placas de 96 poços com 10 replicatas de cada grupo, com uma densidade de 103 células por poço. As placas serão centrifugadas a 300 xg por 5 min a temperatura ambiente, as células serão lavadas duas vezes com tampão salina-fosfato (PBS) e então fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético 50%. Após 1h a 4 °C, as células serão lavadas duas vezes com 100 µL de água bidestilada e serão adicionados 100 µL de sulforodamina B (0,4% em ácido acético 1%). Após 30 min, as células serão lavadas com 100 µL de ácido acético 1% por 3 vezes para eliminar o excesso de corante e então solubilizadas com 200 µL de Tris 10 mM. A absorbância a 570 nm será medida no espectrofotômetro de placas *Anthos Zenyth 200 rt*.

3.8.4. Avaliação de morte e ciclo celular

A avaliação de alterações no ciclo celular, bem como a indução de morte celular será avaliado através de citometria de fluxo. O conteúdo de DNA nas células pode ser facilmente quantificado quando coradas com iodeto de propídio (PI; 16 µg/mL - Sigma-Aldrich), um corante fluorescente intercalante que permite a discriminação das proporções entre as fases Sub-G1, Go/G1, S, G2/M do ciclo celular.

A avaliação de morte celular será realizada através da marcação com Anexina V-PE (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I BD Pharmingen™), em conjunto com o corante 7- AAD, sonda de viabilidade celular usada para distinguir células viáveis de células não viáveis. Essas marcações permitem avaliar e classificar as células que

estão passando por apoptose (células marcadas com Anexina V-PE), apoptose tardia (células coradas tanto com Anexina V-PE quanto com 7-AAD) e células em necrose (marcadas com 7-AAD).

3.8.5. Ensaio de migração celular

Para avaliar a capacidade de migração celular, será realizado o ensaio de reparo de lesão (*wound repair assay*). As células serão cultivadas até a confluência em placas de 24 poços, sob condições padrões de cultivo. Com o auxílio de uma ponteira para pipetador, será feito um risco linear no centro do poço, e os restos celulares serão retirados por lavagem com PBS (tampão salina-fosfato). A seguir, as células serão divididas nos grupos de tratamento. Será feita a captura de imagens da lesão em 0 (zero) e 24 horas após, por imagens capturadas por uma câmera acoplada, e os intervalos refletirão a capacidade de migração das células.

3.8.6. Ensaio de formação de colônias (Clonogênico)

Este ensaio visa a análise da capacidade das células formarem colônias após o tratamento, verificando se este é capaz de alterar a capacidade de proliferação e formação de clones celulares mesmo após a retirada do mesmo. Para a realização deste ensaio, as células serão plaqueadas e após adesão, tratadas durante 24 horas e 48 horas. Após este tempo, as células serão tripsinizadas, contadas e semeadas na concentração de 100 células por poço em placas de 6 poços. Após o período de 10 dias, as células serão fixadas usando metanol 70% e lavadas com água deionizada para retirada do fixador. Cristal violeta 0,5% (dissolvido em metanol) será adicionado permanecendo em contato com as células durante 2 horas. Após a retirada do excesso do cristal violeta, os poços serão fotografados e os resultados expressos como “fração de sobrevivência”, obtida considerando o número de colônias formadas em relação ao número de células semeadas (FRANKEN *et al.*, 2006).

3.8.7. Ensaio de Wash-out

A capacidade de recuperação da viabilidade celular após a retirada do tratamento será avaliada através do ensaio de *Wash-out*. Considerando que algumas

das células de tecido tumoral possuem a capacidade de proliferar e formar novos tumores a investigação da capacidade de recuperação da viabilidade celular após a retirada do tratamento é utilizado para a obtenção de informações sobre a efetividade de estratégias terapêuticas para o tumor estudado em relação à probabilidade de recorrência do mesmo. Para a realização deste ensaio, as células serão plaqueadas na densidade de $2,8 \times 10^4$ por poço em uma placa de 24 poços e, após adesão, serão tratadas por 24 horas. Posteriormente, as células serão lavadas com PBS para a retirada efetiva do tratamento, tripsinizadas, contadas e re-plaqueadas em placa de 96 poços. Após 4 dias o ensaio de MTT (descrito acima) será realizado para análise da viabilidade celular.

3.8.8. Análise estatística

Estabelecidos os grupos de análise, serão calculados os valores de média e desvio padrão das variáveis em estudo. Para comparação entre os grupos de tratamento das linhagens será aplicado o teste de Equações de Estimativas Generalizadas (*Generalized Estimating Equations* – GEE), com teste *post-hoc* de Bonferroni para identificar quais grupos diferem entre si. As diferenças serão consideradas significativas para valores de P menores que 0,05. Todas as análises serão realizadas utilizando o processador de dados SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 23.0.

3.9. Estudo da atividade antimicrobiana de kombucha

3.9.1. Obtenção do sobrenadante livre de células

Uma alíquota da bebida kombucha será transferida para um tubo de 15 mL e esse será centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante livre de células será utilizado para avaliar o comportamento antimicrobiano *in vitro*. Em paralelo, para avaliar a natureza do composto inibidor, o sobrenadante livre de células será neutralizado na faixa de 6,8 - 7,0, com solução de NaOH 1N.

3.9.2. Determinação do espectro de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células

Os microrganismos indicadores escolhidos para a determinação do espectro de atividade antimicrobiana das enterocinas são prevalentes em amostras de alimentos e amostras clínicas provenientes de coleção existente no Laboratório de Microbiologia da UFCSPA e em laboratórios de outras universidades cuja parceria está sendo estabelecida. Para os testes serão preparadas suspensões das bactérias indicadoras em APT (*Antimicrobial Pharmacodynamics and Therapeutics*) 0,1% na concentração de 10^6 células/ mL. As bactérias indicadoras serão crescidas em meio de cultura e temperaturas ideais por 24 h. O teste de atividade do sobrenadante livre de células será realizado contra as bactérias indicadoras conforme descrito a seguir: em placas contendo agar triptona de soja (*Tryptic Soy Agar- TSA*) de volume definido (20-25mL) será inoculada com swab, em três direções distintas, uma cultura da bactéria indicadora em APT 0,1% com aproximadamente 10^6 células/mL. Após a secagem completa das placas à temperatura ambiente, será depositada uma alíquota de 20 µL do sobrenadante livre de células sobre a placa previamente inoculada com o microrganismo a ser testado. As placas serão mantidas em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente até a completa secagem. As placas serão incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por 18 h. Após a incubação a atividade antimicrobiana frente ao microrganismo indicador será atribuída às placas onde for observada a inibição do crescimento através da medida dos halos de inibição em milímetros. Esse teste será realizado em triplicata.

Posteriormente, se o sobrenadante livre de células apresentar atividade antimicrobiana serão realizados os testes de caracterização dos peptídeos/moléculas produzidas. Os ensaios de atividade antibiofilme, antimicrobiana incluindo avaliação do efeito bacteriostático ou bactericida e determinação da concentração inibitória mínima dos compostos serão realizados de acordo com Trentin *et al.* (2011) e Trentin *et al.* (2013).

3.10. Atividade probiótica da kombucha em testes *in vitro*

Os testes para atividade probiótica da kombucha *in vitro* serão realizados com base na metodologia proposta por Grispoldi *et al.* (2020), com a proposta de utilização

de neutralizantes padrões internacionalmente reconhecidos, para avaliar a atividade bactericida básica de compostos.

3.10.1 Viabilidade probiótica e ensaio

Grispoldi *et. al.* (2020) descrevem que viabilidade probiótica *in vitro* é geralmente determinada pela quantificação de sua resistência ao suco gástrico simulado ou ao fluido intestinal simulado, medindo a sobrevivência microbiana após determinados períodos de contato. Os autores sugerem um ensaio de validação preliminar para calcular a contagem da suspensão probiótica, validar a não toxicidade do meio líquido utilizado para diluições seriadas ou decimais da suspensão probiótica, validar a não toxicidade do neutralizador e validar a não toxicidade do suco gástrico e intestinal após a neutralização. Para a realização dos ensaios, as cepas testadas serão provenientes da microbiota da kombucha produzida, identificados a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA (item 3.2) e isolados conforme item 3.5.

O procedimento experimental seguirá as seguintes etapas propostas por Grispoldi *et. al.* (2020), com a temperatura do teste e o tempo de contato organizados de acordo com os requisitos específicos do teste:

1. Suspensão de microrganismo em concentração conhecida (a cepa ou formulação probiótica);
2. Suspensão ou solução bactericida (o suco gástrico ou intestinal simulado);
3. Neutralizador com tampão e capacidade de adsorção.

Antes de cada teste, cada cepa será cultivada de acordo com a sua especificidade, será verificada sua pureza e realizadas as contagens totais de células viáveis (UFC ml⁻¹) em agar nutriente para todas as diluições, sendo registradas como controles (valor de N). O fluido gástrico ou intestinal, suspensão bacteriana, diluente e neutralizador serão estabilizados na temperatura de teste (37 °C ± 1 °C). Um tubo de ensaio contendo 1 ml de solução salina estéril (diluente) e 1 ml de suspensão bacteriana de teste será preparado para cada cepa/probiótico. Após 2 min de contato, 8 ml dos extratos da amostra "suco gástrico A" (solução de ácido clorídrico 0,07 N com pH 1,5 a 37 °C) e "suco gástrico B" (cloreto de sódio 0,03 M, ácido clorídrico 0,084 M e pepsina 0,32% (p / v) com pH 1,4 a 37 °C), serão adicionados e deixados

em contato pelos tempos selecionados na temperatura de teste, de acordo com cada cepa. Ao final do tempo de contato, 1 ml da mistura será transferido para um tubo de ensaio contendo 8 ml de neutralizador e 1 ml de solução salina estéril. Após 5 minutos do procedimento de neutralização, a mistura será agitada com movimentos fortes giratórios, sendo então realizada a contagem em triplicata com resultados expressos em UFC ml⁻¹ e o valor "Na" será então calculado (contagem bacteriana para o probiótico ao final do tempo de contato). A atividade de redução da vitalidade será realizada usando um neutralizador específico para interromper a atividade antibacteriana de "suco gástrico A" e "suco gástrico B" em um determinado momento (GRISPOLDI *et. al.*, 2020)

3.10.2 Cálculo e expressão dos resultados

O cálculo da redução da vitalidade é expresso em um logaritmo e calculado para cada microrganismo e concentração de teste, sendo o resultado expresso em UFC ml⁻¹:

$$\log R = \log N - \log Na.$$

Sendo:

N = contagem bacteriana para o probiótico antes do contato com o suco

Na = contagem bacteriana para o probiótico ao final do tempo de contato

3.11. Análise Estatística

Os resultados das análises serão expressos em média $\pm$ desvio padrão. O conjunto de dados serão submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey com 5% de probabilidade ($p < 0,05$), pelo programa *IBM-SPSS Statistics 23*.

4 RESULTADOS ESPERADOS

No quadro 3 podem ser observadas as previsões de geração de artigos a partir das etapas realizadas, em ordem cronológica.

Quadro 3: Previsão de publicações

	ETAPAS		PUBLICAÇÕES
Revisão Sistemática - Microbiota	1	Revisão de Artigos Científicos sobre Microbiota da kombucha	Artigo 1
Caracterização do SCOBY e do <i>starter</i>	2	Padronização do cultivo e manutenção do SCOBY	Artigo 2
	3	Caracterização da microbiota do SCOBY e do sobrenadante (cultura <i>starter</i>)	
	4	Análises físico-químicas do sobrenadante (cultura <i>starter</i>)	
	5	Análises microbiológicas do SCOBY e do sobrenadante (cultura <i>starter</i>)	
	6	Isolamento de MO para fins tecnológicos	Artigo 3
Caracterização da kombucha	7	Estudo cinético e otimização do processamento da bebida kombucha	Artigo 4
	8	Caracterização da microbiota da bebida kombucha	
	9	Análises físico-químicas da bebida kombucha	
	10	Análises microbiológicas da bebida kombucha	
	11	Avaliação do efeito antitumoral da bebida kombucha em diferentes células de câncer	Artigo 5
	13	Determinação do Potencial Antioxidante – DPPH, ABTS, FRAP – da bebida kombucha	Artigo 6
	14	Atividade antimicrobiana da bebida kombucha	
	15	Atividade probiótica da kombucha	

Fonte: elaborado pela autora

Os resultados mencionados no quadro 3 tendem a gerar um material científico importante para o desenvolvimento e aprofundamento da temática, em âmbito

Determinação do Potencial Antioxidante – DPPH, ABTS, FRAP – da bebida kombucha																
Avaliação da atividade probiótica da kombucha																
Avaliação do efeito antitumoral da bebida kombucha em diferentes células de câncer																
Estudo da atividade antimicrobiana da bebida kombucha																
Compilação e análises dos resultados																
Participação em eventos e publicações, artigos científicos																
Defesa da Tese																

Fonte: elaborado pela autora.

6 DISPONIBILIDADE DE INFRAESTRUTURA E DE APOIO TÉCNICO PARA O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

A UFCSPA disponibilizará sua infraestrutura física de laboratórios e biblioteca, bem como equipamentos e bases de dados, a realização de serviços de pesquisa e desenvolvimento, conforme descrito nesta proposta e estes se apresentam como contrapartida da instituição.

A pesquisa será realizada nos laboratórios de Microbiologia, Farmacotécnica e Cosmetologia, Biologia Molecular, de Genética Toxicológica e de Fisiologia Comportamental da UFCSPA. Este conjunto de laboratórios e as salas de apoio oferece toda a estrutura necessária para desenvolvimento do projeto.

Além da estrutura da UFCSPA mencionada, serão buscados recursos em editais e parcerias com instituições que possam contribuir com o desenvolvimento da pesquisa.

7 RECURSOS

No quadro 4 está descrito o orçamento para a realização do presente projeto. Os itens listados serão custeados a por recursos de projetos já aprovados em editais de fomento bem como continuarão sendo pleiteados nos próximos meses.

Quadro 4 - Orçamento do Projeto

ITEM	VALOR (R\$)
Reagentes e insumos para extração de DNA e sequenciamento	5.000,00
Meios de cultura	3.000,00
Reagentes e insumos para estudo de atividade antitumoral	3.000,00
Demais reagentes químicos	11.000,00
Vidraria em geral	1.000,00
Plásticos descartáveis, membranas/meios filtrantes, holders, utensílios para análise	7.000,00
Despesas de deslocamento para coleta de amostras*	-
Insumos e embalagens para a produção de kombucha*	-
TOTAL	30.000,00

*Despesas custeadas pela pesquisadora

Fonte: Elaborado pelo autor.

REFERÊNCIAS

- ALOULOU, A.; HAMDEN, K.; ELLOUMI, D.; ALI, M. B.; HARGAFI, K.; JAOUADI, B.; AYADI, F.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 63, p. 1472- 6882, 2012.
- AMARASINGHE, H., WEERAKKODY, N. S., WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of 257 physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during 258 extended periods of fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 659-665, 2018.
- ANSARI, F; POURJAFAR, H.; KANGARI, A.; HOMAYOUNI, A. Evaluation of the glucuronic acid production and antibacterial properties of kombucha black tea. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 20, n. 11, p. 985–990, 2019.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Critical Review. Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- ANTON PAAR. **Determination of the alcohol content in kombucha with AlcoLyzer M/ME**. 2018. Disponível em: <https://www.anton-paar.com/corp-en/servicessupport/document-finder/application-reports/determination-of-the-alcohol-content-inkombucha-with-alcolyzermme/>. Acesso em: 17 de nov. de 2020.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia na produção de alimentos**. Vol. 4. Série Biotecnologia industrial. 1. ed. São Paulo/SP, Edgard Blücher Ltda, 2001.
- ARENA, E; FALLICO, B; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 423-427, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE KOMBUCHA (ABKOM). **Levantamento de dados do mercado brasileiro**. 2019. Disponível em: <https://www.abkom.org.br/>. Acesso em: 19 nov. 2020.
- BACHINSKAYA, A.A. History of Development and Culture of a New Yeast Fungus, *Saccharomyces paradoxus*, Zhurn. **Mikrobiologii**. V. 1, n. 3/5, p. 231–247, 1914.
- BAGUL, K.; KOERTEN, J.; REES, T. **Evolving Trends in Food na Nutrition. Euromonitor International**. 2020. 26p. Disponível em: http://go.euromonitor.com/rs/805-KOK-719/images/wpTrendsFoodNutritionANUGA.pdf?mkt_tok=eyJpIjoiTkROa09UUXIPV1

ZoZoTIRZdylsInQiOiJmeHI1UyQUIVRXhUN042UkZtNTVsbVdoa2RNcTEranRTMnNPK2JoV2NWRcTGOEdHNU9ITUpUaGd0dVlxanpQdk83d21MVmdVXC9tbm5Wem8rcIB5Y2pFRHVpF2lZMnhwcGtaYitjd29zZzNxZ2pCUXRaRXVLencrTk5BbXF3XC9TIn0%3D Acesso em: 18 nov. 2020.

BASCHALI A.; TSAKALIDOU E.; KYRIACOU A.; KARAVASILOGLOU N.; MATALAS A.L. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 1-24, 2017.

BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 71–77, 2012.

BELLASSOUED, K.; GHRAB, F.; MAKNI-AYADI, F.; PELT, J. V.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, 2015.

BENZIE, I.; STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BHATTACHARYA, S.; MANNA, P.; GACHHUI, R.; SIL, P.C. Protective effect of kombucha tea against tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 7, p. 511-24, 2011.

BOKULICH, N. A.; 1, KAEHLER, B. D.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M.; BOLYEN, E.; KNIGHT, R.; HUTTLEY, G. A.; CAPORASO, J. G. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 2018.

BOLYEN, E.; RIDEOUT, J. R.; DILLON, M. R.; BOKULICH, N. A.; ABNET, C.; AL-GHALITH, G. A.; ALEXANDER, H. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852–857, 2019.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R.; **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**. 1. ed. – Curitiba, Appris, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 1999. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-no-19-de-30-de-abril-de-1999.pdf/view> Acesso em: 27 dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 268 41/2019, de 17 de setembro de 2019**. Estabelece o Padrão de

Identidade e Qualidade da Kombucha em todo território nacional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534> Acesso em: 10 jan. 2019.

BRINQUES, G.B; AYUB, M.A.Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastro-intestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 123–128, 2011.

CALLAHAB, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. K.; HAN, A. W. JOHNSON, A. J A; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-3, 2016.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 1, p. 4516- 4522, 2011.

CAPOZZI, V.; GAROFALO, C.; CHIRIATTI, M.; GRIECO, F.; SPANO, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. **Microbiological Research**, v. 185, p. 75- 83, 2015.

CARDOSO, R. R; NETO, R. O.; D'ALMEIDA, C. T. S.; NASCIMENTO, T. P.; PRESSETE, C. P.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H. S. D.; CAMERONE, L. C.; FERREIRA, M. S. L.; BARROSA, F. A. R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which T impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. **Food Research International**, v. 128, 2020.

CARVALHAES, F. G.; ANDRADE, L. A. **Fermentação à Brasileira**. Explore o universo dos fermentados com receitas e ingredientes nacionais. Instituto Brasil a Gosto. São Paulo. Editora Melhoramentos, 2020. 320p.

Centers for Disease Control and Prevention. Unexplained severe illness possibly associated with consumption of kombucha tea—Iowa. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, n. 48, p. 892–900, 1995.

CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 63–72, 2016.

CHAPLIN, M.F. **Monosaccharides**. In: CHAPLIN M.F.; KENNEDY, J.F. (eds). Carbohydrate Analysis. IRL Press, Oxford, p. 1-3, 1986.

CHEN, C; LIU, B. Y. Changes in major component of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 843-839, 2000.

CHU, S.; D.; CHEN, C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 502-507, 2006.

CLEARLY, L. Fermenting uncertainty: re-imagining leisure under liquid modernity. **Annals of Leisure Research**, v. 1, n. 18, p. 2159-6816, 2019.

COGHETTO, C. C.; BRINQUES, G.B.; AYUB, M. A. Z. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 8, p. 929-43, 2016.

COOPER, R.; MORRE, D.J.; MORRE, D.M. Medicinal benefits of green tea. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, p. 521–528, 2005.

COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; COULLOUMME-LABARTHE, L.; FALL, A.; DAUBE, G.; COTON, E. Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, 2017.

CRUM, H., LAGORY, A. **The big book of kombucha: brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea**. 1^a ed. North Adams: Storey publishing; 2016.

DEBNATH, M.; PRASAD, G. B. K. S.; BISEN, P. S. **Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities**. Dordrech Heidelberg London, Springer, 2010, p 11-31.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, p. 409-421, 2000.

EBERSOLE, B.; LIU, Y.; SCHMIDT, R.; ECKERT, M.; BROWN, P. N. Determination of Ethanol in Kombucha Products: Single-Laboratory Validation, First Action 2016.12. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 732-736, 2017.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006

GALIMBERTI, A.; BRUNO, A.; AGOSTINETTO, G.; CASIRAGHI, M.; GUZZETTI, L.; LABRA, M. Fermented food products in the era of globalization: tradition meets biotechnology innovations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 70, p. 36-41, 2021.

GARAVAGLIA, J.; HABEKOST, A.; BJERK, T. R.; SCHNEIDER, R., C., S.; WELKE, J. E.; ZINI, C. A.; VALENTE, P. A new method for rapid screening of ester-producing yeasts using in situ HS-SPME. **Journal of Microbiological Methods**, v.103, n.1-2, 2014.

GONZÁLEZ, E. The chemo-preventive effect of tea and its components. **Archivos Latinoamericanos De Nutrición**, v. 53, p. 111–118, 2003.

GRISPOLDI, L.; GIGLIETTI, R.; TRAINA, G.; CENCI-GOGA, B. How to Assess in vitro Probiotic Viability and the Correct Use of Neutralizing Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 204, 2020.

HASLER, C. M.; BROWN, A. C. Position of the American dietetic association: functional foods. **Journal American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 735-746, 2009.

HUGENHOLTZ, J. Traditional biotechnology for new foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 155-159, 2013.

HUR, S. J.; LEE, S. Y.; KIM, Y. C.; CHOI, I.; KIM, G. B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

ICH - HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Current Step 4 version. 2005. Disponível em: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> Acesso em: 17 dez. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4a ed. (1a Edição digital), 1020 p. 2008.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ITAL. **Brasil Food Trends 2020**. São Paulo: ITAL/FIESP, 2010. 173 p.

JAISWAL, V.; DERMARDEROSIAN, A.; PORTER, J. R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 11-16, 2010.

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Mycologist**, v. 14, n. 4, p. 166-170, 2000.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, p. 392-398, 2007.

JAYABALAN, R.; CHEN, P.; HSIEH, Y.; PRABHAKARAN, K.; PITCHAI, P.; MARIMUTHU, S.; THANGARAJ, P.; SWAMINATHAN, K.; YUN, S. E. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—Characterization of dimethyl 2-(2 hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 75-82, 2011.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R.V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A review on kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 538–550, 2014.

JIGISHA, A.; NISHANT, R.; NAVIN, K. Green tea: A magical herb with miraculous outcomes. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 139-148, 2012.

KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 700, 2019.

KAPP, J. M.; SUMNER, W. Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. **Annals of Epidemiology**, v. 30, p. 66–70, 2018.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059-3066, 2002.

KATZ, S.E. **The Art of Fermentation** – Na in-depth exploration of essential concepts and processes from around the world – 1st ed. United States of America: Chelsea Green, 2012.

KAUR, N.; SINGH, P. D. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167–187, 2017.

KOMBUCHA BREWERS INTERNATIONAL - KBI. 2018. Disponível em: <https://kombuchabrewers.org/> Acesso em: 16 nov. 2020.

KOZYROVSKA, N. O.; REVA, O. M.; GOGINYAN, V. B.; VERA, J. P. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology. **Biopolymers and Cell**, v. 28, n. 2, p. 103–113, 2012.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARILLA, M. C.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.4, p. 691-693, 2004.

LEBLANC, C. The Kombucha Tea Recall. University of Houston. Law Center. **Health Law e Policy Institute**. 2010. Disponível em: https://www.law.uh.edu/healthlaw/perspectives/2010/leblanc_kombucha.pdf Acesso em: 26 dez. 2020.

LEAL, J. M.; SUÁREZ, L. V.; JAYABALAN, R.; OROS, H. J.; ANAYANSI, E. A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.

LIU, J.; CUI, X.; LIU, Z.; GUO, Z.; YU, Z.; YAO, Q.; JIN, J.; LIU, X.; WANG, G. The Diversity and Geographic Distribution of Cultivable Bacillus-Like Bacteria Across Black Soils of Northeast China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1424, 2019.

LONČAR, E.; DJURIĆ, M.; MALBAŠA, R.; KOLAROV, L.J.; KLAŠNJA, M. Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. **Food and Bioproducts Processing**. V. 84, n. 3, p. 186-192, 2006.

LOZUPONE, C.A, KNIGHT R. Global patterns in bacterial diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007.

MANCHESTER, K. L. Louis Pasteur (1822–1895) — Chance and the prepared mind. **Trends Biotechnology**, v. 13, p. 511–515, 1995.

MARSH, A. J.; O’SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P. COTTER, PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014.

MATEI, B.; SALZAT, J.; DIGUTA, C. F.; CORNEA, C. P.; LUTĂ, G.; UTOIU, E. R.; FLORENTINA, M. Lactic acid bacteria strains isolated from kombucha with potential probiotic effect. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, n. 3, 2018.

MAY, A; NARAYANAN, S; ALCOCK, J.; VARSANI, A.; MALEY, C.; AKTIPIS, A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **PeerJ**, v. 7, p. 75-65, 2019.

MCGOVERN, P.; JALABADZE, M.; BATIUK, S.; CALLAHAN, M.P; SMITH, K.E.; HALL, G.R.; KVAVADZE, E.; MAGHRADZE, D.; RUSISHVILI, N.; BOUBY, L. ET AL. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 48, p. E10309-E10318, 2017.

MCMURDIE P.J; HOLMES, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, e61217, 2013.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUлма, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, Londres, v. 91, p. 571-577, 2005.

MIRANDA, B.; LAWTON, N.M.; TACHIBANA, S.R.; SWARTZ, N.A.; HALL, W.P. Titrationand and HPLC characterization of Kombucha fermentation: a laboratory experiment in food analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 10, p. 1770–1775, 2016.

MONEY, N. **The rise of yeast**. Nova York: Oxford University Press, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEFFE-SKOCINSKA, K., SIONEK, B., SCIBISZ, I., KOŁOZYN-KRAJEWSKA, D. Acid contents 289 and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, 290 microbiological and sensory properties. **Journal of Food**, v.15, n. 4, p. 601-607, 2017.

NGUYEN, N. K.; NGUYEN, P. B.; NGUYEN, H. T.; LE, P. H. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. **Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1149-1155, 2015.

NIELSEN, J. Yeast systems biology: model organism and cell factory. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, e1800421, 2019.

NUMMER, B. A. Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model 292 Food Code: risk analysis and processing guidance. **Journal of Environmental Health**, v. 76, n. 4, p. 8-11, 2013.

PETERSON, J.; DWYER, J.; JACQUES, P.; RAND, W.; PRIOR, R.; CHUI, K. Tea variety and brewing techniques influence flavonoid content of black tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3-4, p. 397-405, 2004.

PETRUZZELLO, M. (2017). Kombucha fermented beverage. **Encyclopædia Britannica**. Dec. 12, 2017. Disponível em: <https://www.britannica.com/topic/kombucha>. Acesso em: 18 dez. de 2020.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. A.; ARKIN, A. P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLOS ONE**, v. 5, n. 3, e9490, 2010.

REDZEPI, R.; ZILBER, D. **The Noma Guide To Fermentation** (Foundations Of Flavor). 1 Ed. New York: Artisan, 2018.

REZAC S.; KOK C.R.; HEERMANN M.; HUTKINS, R. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in Microbiology**, 9:1785, 2018.

SAJILATA, M.G.; POONAM, R.B.; SINGHAL, R.S. Tea polyphenols as nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 3, p. 229-254, 2008.

SAXE, L. Fermented Foods Are Up 149% - As Long As They're Unfamiliar. **FORBES**, feb. 6, 2019. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/lizzysaxe/2019/02/06/fermented-foods-are-up-149-percent-as-long-as-theyre-unfamiliar/?sh=2411d15e673f> Acesso em: 13 dez. 2020.

SCHLENK, F. Early research on fermentation - a story of missed opportunities. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 252- 254, 1985.

SCHMITT, E.; GALLI, F.; MENOZZI, D.; MAYE, D.; TOUZARD, J. M.; MARESCOTTI, A.; SIX, J.; BRUNORI, G. Comparing the sustainability of local and global food products in Europe. **Journal of Cleaner Production**, v. 165, p. 346-359, 2017.

SEHNEM, N. T.; HICKERT, L. R.; PEREIRA, F. C.; MORAIS JR, M. A.; M. A. Z. Bioconversion of soybean and rice hull hydrolysates into ethanol and xylitol by furaldehyde-tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces*

anomalus, and their fermentations. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.7, n. 2, p. 199-206, 2017.

SELHUB, E. M.; LOGAN, A. C.; BESTED, A. C. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 33, n. 2, p. 1180- 6805, 2014.

SENGUN, I. Y.; KIRMIZIGUL, A. WITHDRAWN: Probiotic potential of Kombucha. **Journal of Functional Foods**, 2020.

SIAL PARIS. Innovation in the drink sector. **Beverage Innovation**. 2018. Disponível em: <https://www.sialparis.com/Top-Trends/Sectoral-innovations/Innovation-in-the-drinks-sector?xtmc=kombucha&xtnp=1&xtr=1> Acesso em: 28 dez. 2020.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; RAVENTÓS-LAMUELA, R. M. Polyphenols and Flavonoids. (In: SIES, Helmut; PACKER, Lester Org.). **Methods in Enzymology**. Alemanha: Lehmanns media, p. 152-178, 1999.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, 1990.

SOUSA C.M.; SILVA, H.R.E.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589–2594, 2000.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Characterization of Antimicrobial Activity in Kombucha Fermentation. **Acta Biotechnologica**, v. 21, n. 1, p. 49 – 56, 2001.

SRIHARI, T.; RAMACHANDRAN, A.; ARUNAKARAN, J.; SATYANARAYANA, U. Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 53–58, 2013.

SUHRE, T. **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2020.

TALAWAT, S.; AHANTHARIK, P.; LAOHAWIWATTANAKUL, S.; PREMSUK, A.; RATANAPO, S. Efficacy of fermented teas in antibacterial activity. **Kasetsart Journal of Social Sciences**, v. 40, n. 4, p. 925–933, 2006.

TALEBI, M.; FRINK, L. A.; PATIL, R. A.; ARMSTRONG, D. W. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 4062-4067, 2017.

TAMANG, J.P.; COTTER, P.D.; ENDO, A.; HAN, N.S.; KORT, R.; LIU, S.Q.; MAYO, B.; WESTERIK, N.; HUTKINS, R. Fermented foods in a global age: East meets West. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 1, 2020.

TRENTIN, D. S.; GORZIZA, D. F.; ABRAHAM, W. R.; ANTUNES, A. L. S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A. J. Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1329-1333, 2011.

TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PLOS ONE**, 2013.

TROITINO C. Kombucha 101: demystifying the past, present and future of the fermented tea drink. **FORBES**, feb 1, 2017. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/christinatroitino/2017/02/01/kombucha-101-demystifying-the-past-present-and-future-of-the-fermented-tea-drink/?sh=55962abe4ae2> Acesso em: 18 dez. 2020.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, n.1, p. 71-80, 2016.

UNACHUKWU, U. J.; AHMED, S.; KAVALIER, A.; LYLES, J. T.; KENNELLY, R. J. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6 p. C541-8, 2010.

VELICANSKI, A. S.; CVETKOVIC, D. D.; MARKOV, S. L.; SAPONJAC, V. T. T.; VULIC, J. J. Antioxidant and Antibacterial Activity of the Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea with Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. **Food Technology Biotechnology**, v. 52, 420-429, 2014.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BEAUFORT, S.; BOUAJILA, J.; SOUCHARD, J.; RENARD, T.; ROLLAN, S.; TAILLANDIER, P. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 44-54, 2019.

VILLARREAL-SOTO, S. A.; BOUAJILA, J.; PACE, M.; LEECH, J.; COTTER, P. D.; SOUCHARD, J.; TAILLANDIER, P.; SANDRA BEAUFORT, S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, 2020.

VITASA, J. S.; CVETANOVIĆA, A. D.; MAŠKOVIĆB, P. Z.; ŠVARC-GAJIĆA, J. V.; MALBAŠAA, R. V. Chemical composition and biological activity of novel types of kombucha beverages with yarrow. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 95–102, 2018.

WALTHER, A.; HESSELBART, A.; WENDLAND, J. Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast. G3: Genes, **Genomes, Genetics**, v. 4, n. 5, p. 783- 793, 2014.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; GUNAWARDHANA, C. B.; WAISUNDARA, V. Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. **Journal of Chemistry**, 2015.

WATSON E. Fermentation on fire: US retail sales of kombucha and other fermented beverages surged 37.4% in 2017. **Food Navigator**, 13 feb. 2018. Disponível em: <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2018/02/13/Fermentation-on-fire-US-retail-sales-of-kombucha-and-other-fermented-beverages-surged-37.4-in-2017#> Acesso em: 13 dez. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION (FAO). Probiotics in Food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO Food and Nutrition Paper**. Rome, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2020.

YOUNG, S. P. Kombucha: Revered For Millennia, But Is It Really A Life Saving Brew? Ancient Origins, 23 may, 2019. Disponível em: <https://www.ancient-origins.net/myths-legends-asia/kombucha-0011948>. Acesso em: 29 nov. de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Naiane Carlesso Bassani

Avaliação da atuação da melatonina e do exercício físico no perfil inflamatório

**Orientadora: Dra. Alessandra Peres
Coorientador: Dr. Gilson Pires Dorneles**

**Porto Alegre
2021**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
ABSTRACT.....	5
RESUMO.....	6
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Melatonina.....	7
1.1.1 Síntese	7
1.1.2 Mecanismo de ação	9
1.1.3 Receptores	10
1.2 Marcadores inflamatórios.....	10
1.3 Obesidade	12
1.4 Exercício físico	13
1.5 Justificativa	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Delineamento e cálculo amostral.....	18
3.2 População de estudo	18
3.3 Amostragem e dados	19
3.4 Coleta de dados	19
3.5 Desenho experimental	19
3.6 Colheita da amostra e análises laboratoriais.....	20
3.7 Análise estatística	23
3.8 Riscos e benefícios	23
4 LOCAL DE REALIZAÇÃO	25
5 CRONOGRAMA	26
6 ORÇAMENTO E FONTE FINANCIADORA	27
7 ASPECTOS ÉTICOS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE ABREVIATURAS

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Fator de crescimento transformante - TGF

IMC - Índices de Massa Corporal

Interferon – IFN

Interleucina – IL

Interleucina 1 – IL-1

Interleucina 2 – IL-2

Interleucina 6 – IL-6

Interferon γ – INF- γ

NK - *natural killers*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SV - Secretaria de Vigilância em Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

T reguladoras – T reg

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco para doenças crônicas não transmissíveis por Inquérito Telefônico (VIGITEL)

ABSTRACT

Melatonin plays a key role in the regulation of various physiological processes in mammals, including the immune system modulation. Melatonin dosages, overweight, obesity and exercise are important factors in the modulation of the inflammatory processes. However, those relationships still require more studies. The aim of this project is to evaluate the impact of isolated and combined melatonin supplementation and strenuous exercise on inflammatory markers, in the immune profile and in possible genetic damages in overweight and eutrophic individuals. The study hypothesis is to verify if the melatonin supplementation combined with physical exercise potentiates the anti-inflammatory immune profile in these individuals. The study methodology consists in the recruitment of males, classified as eutrophic or overweight. Subjects will be divided into two subgroups: one will do exercises and use melatonin supplementation for 5 days, while the other one will do the same exercises but will receive a placebo for the same period of time. Saliva samples will be collected at the beginning and the end of the intervention, always before and after exercise. The methodology includes the evaluation of inflammatory markers such as TNF α , MCP-1, IL-6, IL-1 β , INF γ , IL-1ra, IL-4 and IL-10 and other parameters such as cortisol levels. This project is expected to run for 24 months, aiming to perform a detailed analysis, seeking to identify possible relationships between melatonin supplementation and physical exercise with immune system modulation. The study results may contribute to a better characterization of the immune profile, as well as to elucidate the influence of some variables in the modulation of this profile.

Keywords: exercise, overweight, obesity, melatonin, immunoregulation, inflammation, immune response.

RESUMO

A melatonina é um hormônio fundamental para a regulação de diversos processos fisiológicos em mamíferos, dentre os quais inclui-se a modulação do sistema imunológico. As dosagens de melatonina, o sobrepeso, a obesidade e a prática de exercício físico são fatores que desempenham papéis importantes na modulação do processo inflamatório, contudo, tais relações ainda requerem estudos. O objetivo deste projeto é avaliar o impacto da suplementação de melatonina e do exercício físico extenuante, isolados e combinados, nos marcadores inflamatórios, no perfil imunológico e nos danos genéticos em indivíduos eutróficos e com sobrepeso. A hipótese do trabalho é verificar se a suplementação de melatonina combinada ao exercício físico potencializa o perfil anti-inflamatório nesses indivíduos. A metodologia do estudo consiste no recrutamento de indivíduos do sexo masculino, classificados como eutróficos ou com sobrepeso. Os indivíduos serão divididos em dois subgrupos: um realizará exercício físico e suplementação de melatonina por 5 dias, enquanto o outro realizará apenas exercício físico e receberá placebo pelo mesmo período de tempo. Serão realizadas coletas de saliva no início e final da intervenção, antes e após a realização de exercício físico. A metodologia inclui a avaliação de marcadores inflamatórios, como TNF α , MCP-1, IL-6, IL-1 β , INF γ , IL-1ra, IL-4 e IL-10 e de outros parâmetros como níveis de cortisol. O projeto se propõe a realizar uma análise detalhada, buscando identificar possíveis relações entre a suplementação com melatonina e do exercício físico com a modulação do sistema imune. Os resultados do estudo poderão contribuir para uma melhor caracterização do perfil imunológico, tal como elucidar a influência das variáveis na modulação deste perfil.

Palavras-chaves: exercício físico, sobrepeso, obesidade, melatonina, imunorregulação, inflamação, resposta imune.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melatonina

1.1.1 Síntese

A melatonina ou N-acetil-5-metoxitriptamina (Peso Molecular = 232,3), com estrutura química apresentada na Figura 1 foi descoberta e isolada da glândula pineal de bovinos em 1958 por Aaron Lerner (LERNER et al., 1958). Trata-se de um hormônio encontrado em mamíferos, incluindo humanos, que é produzido principalmente na glândula pineal, contudo, vários órgãos e tecidos também a secretam, tais como retina, glândula lacrimal, trato gastrointestinal, glândula de Harder, células da medula óssea e plaquetas sanguíneas.

Este hormônio é sintetizado a partir do aminoácido triptofano, que é hidroxilado e convertido em 5-hidroxitriptofano que, por sua vez, quando descarboxilado, é convertido em serotonina, que é então acetilada e metilada, originando a melatonina. Uma vez sintetizada, a melatonina é imediatamente liberada na corrente sanguínea, não sendo armazenada nas células da glândula pineal. Além do sangue, a melatonina está presente em outros fluidos, como a saliva, líquido cefalorraquidiano, bile, sêmen e líquido amniótico. A meia vida da melatonina varia de 30 a 60 minutos, sendo metabolizada principalmente no fígado e, secundariamente, nos rins (KARASEK; WINCZYK; DISEASES, 2006; TORDJMAN et al., 2017).

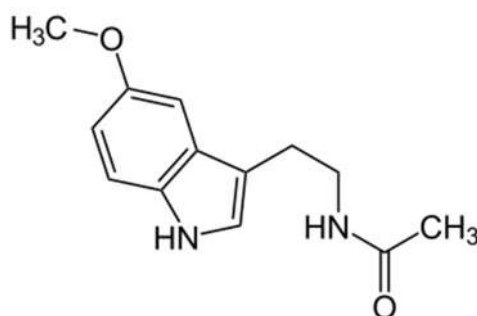


Figura (1) Estrutura química da melatonina.

Fonte: Wikipédia

O sistema circadiano atua diretamente na secreção da melatonina, quando somos expostos ao ciclo escuro, a secreção da melatonina é aumentada e a frequência cardíaca e

a temperatura diminuem. Por isso, a melatonina apresenta um ritmo de produção bem estabelecido, sensível a luminosidade, com aumento de secreção ao anoitecer e queda no fim da noite, observa-se relação entre a síntese de melatonina e a concentração do seu principal metabólito urinário, a 6-sulfatoximelatonina, que aumenta conforme o aumento de síntese do hormônio. A luz é o fator ambiental mais relevante na regulação da síntese da melatonina, porém outros fatores, como a idade, também atuam diretamente na regulação dessa produção. O ritmo de síntese e de secreção da melatonina é coordenado pelo marcapasso circadiano situado no núcleo supraquiasmático (NCS) do hipotálamo e sincronizado pela oscilação do ciclo claro-escuro. Os impulsos fotossensoriais chegam a pineal através da via polineuronal, assim as fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares, que terminam na pineal, liberam a noradrenalina, que desempenha papel crucial no controle da síntese de melatonina (KARASEK; WINCZYK; DISEASES, 2006; TORDJMAN et al., 2017; VETTER et al., 2019).

O ritmo de síntese e secreção da melatonina inicia logo após o nascimento e se normaliza por volta de 21-24 semanas de vida, contudo a amplitude do pico noturno da secreção do hormônio atinge os maiores níveis entre o 5 e 10 anos de idade, após esse período há uma queda nas concentrações de melatonina, proporcional ao avanço da idade. Com o envelhecimento, principalmente após os 65 anos, muitos indivíduos deixam de apresentar diferenças significativas na síntese e secreção da melatonina no dia e noite (KARASEK; WINCZYK; DISEASES, 2006; TORDJMAN et al., 2017).

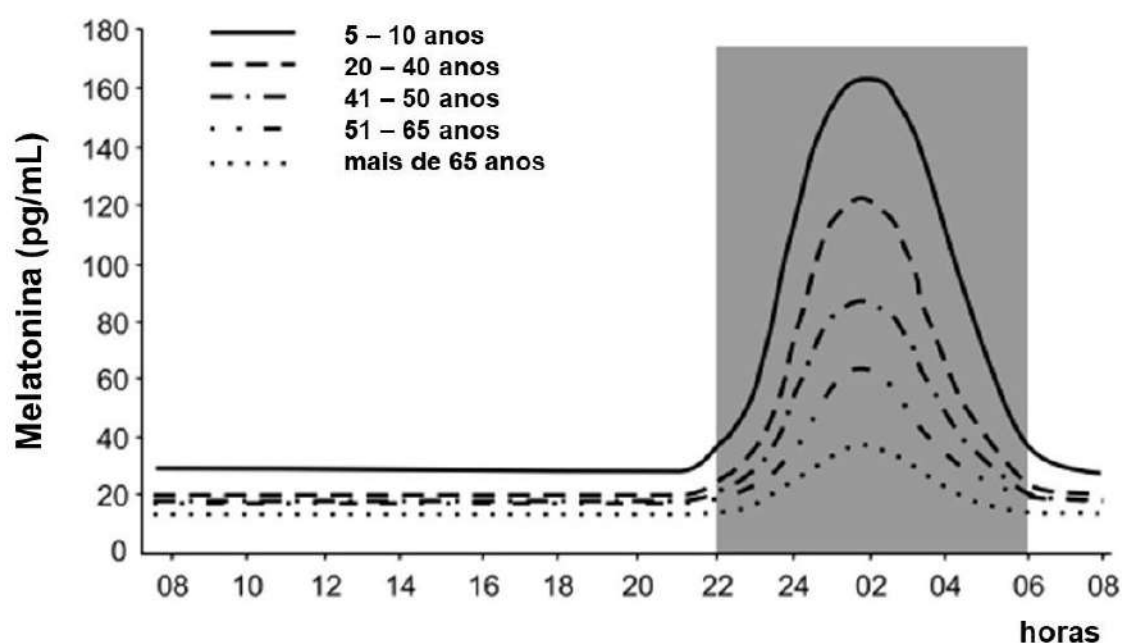


Figura (2) Perfil circadiano relacionado as concentrações séricas de melatonina

Fonte: Imagem adaptada de Karasek *et al*, 2006.

1.1.2 Mecanismo de ação

A melatonina tem sua síntese ativada com a escuridão e inibida pela luminosidade. Em humanos, sua secreção começa após o pôr-do-sol e atinge seu pico no meio da noite, entre 2 e 4 horas da manhã, diminuindo de forma gradual durante a segunda metade da noite. Quase 80% da melatonina é sintetizada à noite, com concentrações séricas variando entre 80 e 120 pg/mL; já durante o dia, as concentrações séricas decaem para cerca de 10-20 pg/mL. Ela está envolvida na regulação do relógio biológico, organizando os ritmos sazonais e circadianos. Como um agente cronobiológico, a melatonina também participa da regulação e do balanço energético no organismo, podendo aumentar o gasto energético pela ativação do tecido adiposo marrom. Dentro dessa ampla gama de funções fisiológicas da melatonina, inclui-se o seu perfil anti-inflamatório, imunomodulador, antioxidante e antiapoptótico. Muitos processos metabólicos no tecido adiposo, por exemplo, incluindo a expressão e secreção de algumas adipocinas, estão sob controle circadiano (PEVET; KLOSEN; FELDER-SCHMITTBUHL, 2017; TORDJMAN *et al.*, 2017; TAROCCO *et al.*, 2019).

A atuação da melatonina ocorre através da ativação de duas vias moleculares pela ativação de dois tipos de receptores específicos de membrana, os sítios ML1 (alta afinidade) e ML2 (baixa afinidade). A ativação dos receptores ML1, acoplados a proteína G, leva a inibição da adenilato ciclase nas células-alvo, já a ativação dos receptores ML2 leva a hidrólise dos fosfoinosítídeos. Dois tipos de receptor ML1 foram descritos, Mel1a e Mel1b. O *Mel1a* é codificado no cromossomo 4 (4q35.1), é composto por 351 aminoácidos e é amplamente distribuído na hipófise anterior, hipotálamo (região do relógio circadiano), córtex, tálamo, substância negra, núcleo de *accumbens*, amígdala, hipocampo, cerebelo, córnea e retina. O *Mel1b* é codificado no cromossomo 11 (11q21q22), é composto por 363 aminoácidos e é distribuído principalmente na retina e, de forma secundária, no hipocampo, córtex, núcleo paraventricular e cerebelo. Os receptores de melatonina foram descritos em vários tecidos centrais, porém também podem ser encontrados em vários tecidos periféricos, incluindo coração, artérias, glândula adrenal, rim, pulmão, fígado, vesícula biliar, intestino

delgado, adipócitos, ovários, útero, mama, próstata e pele (PEVET; KLOSEN; FELDER-SCHMITTBUHL, 2017; TORDJMAN et al., 2017).

1.1.3 Receptores

Nos mamíferos, os receptores de alta afinidade de melatonina são encontrados no cérebro, principalmente nas regiões do hipotálamo e da hipófise. O hormônio da glândula pineal, atua através de receptores MT1 e MT2, regulando os ritmos circadianos e a reprodução sazonal. Os receptores MT1 são expressos no núcleo supraquiasmático, no cerebelo, no tálamo, no hipocampo e no córtex cerebral enquanto que os receptores MT2 são expressos no cerebelo e no hipocampo. A ação neuroprotetora da melatonina resulta de sua atividade antioxidante, observa-se a influência de ambos receptores que são encontrados no hipocampo humano. A expressão do gene *MT1* e a ligação da 2- (125I) -iodomelatonina também foram encontradas em diferentes regiões do cérebro fetal humano, como: hipotálamo, tálamo, leptomeninges, cerebelo e tronco cerebral. Os receptores de melatonina também podem ser encontrados em tecidos humanos periféricos, incluindo coração e artérias, rim, intestinos, células adiposas do folículo ovariano, útero, fígado, vesícula biliar, células da mama, próstata e pele (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

Pelo seu tamanho e característica lipofílica, a melatonina atravessa com facilidade membranas celulares, podendo assim desempenhar sua função biológica através da sinalização citoplasmática e/ou nuclear. Demonstrou-se uma ação genômica da melatonina via receptores RZR (receptores Z de retinóides) e ROR (receptores órfãos relacionados a retinóides), esses receptores são amplamente expressos em tecidos normais e em células tumorais, principalmente as relacionadas com o câncer de cólon, próstata e mama (BECKER-ANDRÉ et al., 1994). Nesse caso, o efeito antitumoral da melatonina está relacionado as suas atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas. Tais mecanismos moleculares ainda estão sendo estudados, porém estudos demonstraram que os efeitos oncostáticos da melatonina dependem dos receptores de membrana e dos receptores nucleares de RZR/RO (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

1.2 Marcadores inflamatórios

A inflamação é processo fisiológico usual, ativado em resposta ao estresse ambiental, como a exposição à patógenos e ameaças e a reações biológicas e químicas do organismo. A nível tecidual possui etapas definidas: (1) a agressão, (2) a reação vascular, com a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (calor e rubor), (3) o aumento da permeabilidade vascular, com os transtornos de permeabilidade, edema pressionando as terminações nervosas e a reação leucocitária (diapedese, quimiotaxia e fagocitose), (4) a proliferação do tecido vascular e, por fim, (5) a reparação e cicatrização. O processo inflamatório compreende o processo de inflamação aguda e o processo de inflamação crônica, com diferentes agentes, células e mediadores envolvidos.

Tabela 1 – Inflamação

	Inflamação aguda	Inflamação crônica
Agente causal	Patógenos orgânicos, radiação ionizante, agentes químicos e/ou traumas mecânicos	Persistência do estímulo inflamatório inicial e/ou autoimunidade
Células envolvidas	Neutrófilos, monócitos, macrófagos e/ou mastócitos	Macrófagos, linfócitos e ou fibroblastos
Mediadores primários	Aminas vasoativas, eicosanoides, quimiocinas e/ou espécies reativas de oxigênio	IFN-GAMA, citocinas, fatores de crescimento e enzimas hidrolíticas
Início	Imediato	Tardio
Duração	Poucos dias	Meses ou anos
Evolução	Cicatrização com restituição, formação de abscesso ou cronificação	Destruição tecidual ou fibrose

Fonte: Elaborada pelo autor

Na fase aguda, leucócitos principalmente granulócitos, migram ao longo de um gradiente quimiotático, para o local da lesão, mediado por citocinas, com o objetivo combater a causa da inflamação (como o agente infeccioso ou estranho ao organismo). De acordo com o grau da lesão, essa fase aguda já atua de forma satisfatória, solucionando o dano. Porém se os estímulos inflamatórios persistem, dá-se início ao processo de inflamação crônica,

caracterizado por um infiltrado mononuclear. O processo inflamatório crônico é observado em inúmeras doenças como artrite, asma, aterosclerose, doenças autoimunes, diabetes e câncer e nos processos de envelhecimento (GERMOLEC et al., 2018).

Diferentes células e mediadores estão envolvidos no processo inflamatório. Na fase aguda da inflamação, plaquetas e células granulocíticas como basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos são ativados, produzindo e liberando mediadores que modulam a resposta inflamatória. Os neutrófilos polimorfonucleares são as principais células mediadoras do processo de inflamação aguda, apresentando grânulos que contêm diversas enzimas, peptídeos e proteínas (GERMOLEC et al., 2018).

O sistema imunológico apresenta proteínas responsáveis pela mediação das respostas imunológicas. As citocinas são proteínas reguladores, de baixo peso molecular e produzidas a partir de diferentes células. Interagem com as células através de receptores com alta especificidade e a alta afinidade e atuam regulando a intensidade e a duração da resposta imunológica por meio da estimulação/inibição da ativação, proliferação e/ou diferenciação de diferentes tipos celulares e através da regulação da secreção dos anticorpos e de outras citocinas envolvidas no processo inflamatório. As citocinas influenciam direta ou indiretamente no sistema imunológico, destacando-as: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (INF- γ) (TONET; NÓBREGA, 2008).

1.3 Obesidade

A obesidade e suas doenças correlacionadas são importantes problemas de saúde globais. No ano de 2016 (OMS, 2019), 1,9 bilhões de adultos foram identificados como acima do peso, destes mais de 650 milhões eram obesos e cerca de 3,5 milhões morrem anualmente devido as doenças relacionadas à obesidade (FARIAS et al.; 2019). Índices de massa corporal (IMC) maiores que 30kg/m² são fatores de risco para morbidade e mortalidade em muitas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2 e alguns tipos de câncer. A adiposidade excessiva é um distúrbio multifatorial, normalmente resultante da interação da alta ingestão energética, poucas atividades físicas, fatores genéticos, transtornos alimentares, fatores ambientais e fatores socioeconômicos. O tecido adiposo branco é uma forma importante de armazenamento de triglicerídeos e liberação de ácidos graxos, além disso, também apresenta função endócrina e secreta mais

de 600 moléculas bioativas, como as adipocinas. Tais moléculas atuam na regulação de inúmeros processos, como o metabolismo lipídico, apetite, níveis de energia, sensibilidade a insulina, angiogênese, regulação da pressão arterial, hemostasia, cascata de coagulação, imunidade e processos inflamatórios (SZEWCZYK-GOLEC et al., 2017).

A obesidade, prejudica a ação endócrina do tecido adiposo e altera o perfil da adipocina, resultando em um cenário pró-inflamatório. Variáveis como a inflamação crônica, disfunção dos tecidos, aumento nos níveis plasmáticos de glicose e lipídios, hiperleptinemia e a diminuição da defesa antioxidante correspondem aos fatores que perturbam o equilíbrio oxidante-antioxidante na condição de obesidade. Na obesidade, geram-se espécies reativas de oxigênio (ROS) que são induzidas por vários mecanismos bioquímicos. Além disso, as ROS exercem papel importante nos neurônios hipotalâmicos, que atuam regulando a homeostase energética (SZEWCZYK-GOLEC et al., 2017).

O processo de inflamação crônica e as quantidades excessivas de ROS estão diretamente envolvidos com a causalidade de problemas médicos relacionados a obesidade. Um agente adequado para diminuir esses efeitos deletérios, que são consequentes da adiposidade excessiva, precisa conciliar um perfil de propriedades anti-inflamatório e antioxidantes juntamente com o impacto na secreção de adipocinas. Uma molécula que cumpre tais requisitos e atua dessa forma é justamente a N-acetil-5-metoxitriptamina, também conhecida como melatonina (SZEWCZYK-GOLEC et al., 2017).

O estilo de vida moderno está associado à redução do tempo de sono e ao uso excessivo de luzes artificiais, fatores que perturbam o ritmo circadiano. Estudos em modelos animais apontam para a ação benéfica da melatonina na prevenção da adiposidade. Dados também confirmam que a melatonina regula funções do adipócito, como a lipólise, lipogênese, diferenciação celular e absorção de ácidos graxos, influenciando no metabolismo energético, lipemia e peso corpóreo. A melatonina ainda cumpre um papel regulador no balanço energético, atuando na regulação do fluxo de energia. Além disso, sua associação com os aspectos fisiológicos e com processos típicos da atividade-vigília e do ritmo de descanso diário podem afetar o peso corporal (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

Exercício físico

A prática regular de exercício físico, assim como as modificações na alimentação e no estilo de vida, altera o metabolismo e modula o processo inflamatório e, consequentemente diminuem a prevalência de doenças crônicas e do envelhecimento. O exercício físico atua

no processo anti-inflamatório e na modulação antioxidante, resultando na prevenção e no tratamento de processos deletérios associados ao envelhecimento (GARCÍA-MESA et al., 2012; GALLE; MARTELLA; BRESCIANI, 2018).

Os linfócitos T desempenham um papel fundamental orquestrando a resposta imune e são considerados marcadores de perfil imunológico. As células T mediam outras células do sistema imunológico inato e adquirido, produzindo citocinas pró e anti-inflamatórias específicas. Os linfócitos compreendem cerca de 20 e 25% da população de leucócitos do sangue periférico, dos quais, de 60 a 80% são células T. As células T são divididas em células T auxiliares ou TCD4+ (aproximadamente 70%) e células T citotóxicas ou TCD8+ (aproximadamente 30%), essa diferenciação ocorre durante sua maturação no timo. As células CD4 têm um papel na regulação tanto da mediação celular quanto na resposta imune através da sinalização de citocinas. Já as células CD8 são predominantemente responsáveis pela destruição de células infectadas, no entanto, elas também produzem citocinas (SHAW et al., 2018).

As células T auxiliares e T citotóxicas podem se diferenciar em tipo 1 ou tipo 2, no entanto, é a produção de citocinas pela célula T CD4+ que é a principal responsável pela regulação imunológica. As células T tipo 1 estão predominantemente envolvidas na regulação da imunidade celular, atuando no combate de patógenos intracelulares, como vírus. Elas são caracterizadas pela produção da citocina pró-inflamatória interferon (IFN) - γ , tal como pela ativação de células T CD8 +, células *natural killers* (NK) e fagócitos. Já as células T tipo 2 estão envolvidas na imunidade humoral, que fornece proteção contra patógenos extracelulares, principalmente bactérias e fungos. Elas são caracterizadas pela produção da citocina anti-inflamatória, IL-4, por auxiliar na regulação da produção de imunoglobulinas (como IgE) pelas células B e por recrutar eosinófilos. A IL-4 que tem ação antagônica ao IF- γ , polariza as células T para um fenótipo tipo 2 através da ação de o fator de transcrição, GATA-3 (SHAW et al., 2018).

Já as células T reguladoras (Treg) representam 5 a 10% do sangue periférico e desempenham um papel central na modulação de respostas imunes e no silenciamento de células T auto-reativas. As células Treg expressam o marcador de superfície celular, o CD25+, tal como marcadores específicos de expressão intracelular, como o fator de transcrição *Forkhead* (FoxP3) e o marcador de superfície celular CD127^{low}. Células Treg (nTreg) CD4+ CD25 + (produzidas no timo) e células Treg (iTreg) induzidas pelo fator de crescimento transformante (TGF) β (produzidas na periferia) são os dois principais tipos de células Treg (SHAW et al., 2018).

As células Treg suprimem as funções de proliferação e ativação de CD4+ (células T tipo 1 e tipo 2), células CD8 +, células NK, células dendríticas e células B, através da liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. O exercício físico atua na modulação das células T do sangue periférico, os linfócitos do sangue periférico provocam uma resposta bifásica proporcional à sua intensidade e duração. No decorrer do exercício e logo após seu término, o número de linfócitos sobe, esse aumento é seguido por um declínio abaixo dos níveis do pré-exercício (redistribuição + apoptose). Essa redistribuição das células imunes contribui para a vigilância imunológica e regulação da citotoxicidade. O nível de células T CD4 + e T CD8 + é proporcional à intensidade do exercício. Um número maior de células T CD4+ se mobiliza em comparação com as células T CD8+. Quando o período de recuperação entre as sessões de exercício é encurtado (3 a 6 horas), as células T CD4+ e CD8+ podem não retornar aos níveis basais (SHAW et al., 2018).

O perfil anti-inflamatório não pode ser generalizado para toda a população, indivíduos que praticam níveis baixos a moderados de atividade física tem possibilidade de serem caracterizados por um estado pró-inflamatório. Em particular, o número de células T do tipo 1 do sangue periférico e sua capacidade de produzir IFN- γ declina imediatamente após exercício exaustivo ou nos estágios iniciais de recuperação, enquanto o número de células T tipo 2 e a produção de IL-4 parece inalterada. Além disso, treinos de alto impacto resultam no acúmulo de células T tipo 2 e células Treg e na redução de células T tipo 1, prejudicando a capacidade do sistema imunológico (SHAW et al., 2018).

O exercício físico reduz a oxidação, modulando o estresse oxidativo, com o aumento da expressão de enzimas antioxidantes. Além disso o exercício regula a resposta inflamatória, reduzindo a presença de monócitos pró-inflamatórios (modulando o perfil M1 e M2) e induz a liberação de citocinas anti-inflamatórias. Devido a esse mecanismo a prática de exercício físico é apresentada como uma possível ferramenta antioxidante e anti-inflamatória, que atua na redução de marcadores de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios. Por isso é importante uma melhor compreensão sobre os mecanismos que regulam o sistema imunológico, suas modulações e consequências, para propor e desenvolver estratégias efetivas que devem ser implementadas para aprimorar seu funcionamento (GALLE; MARTELLA; BRESCIANI, 2018).

1.5 Justificativa

O processo inflamatório e a obesidade são fatores de risco para o desenvolvimento

de inúmeras doenças. A busca por agentes que promovam a diminuição desses efeitos prejudiciais é extremamente importante para diminuição desses efeitos deletérios, que são consequentes da adiposidade excessiva. Esse agente necessita conciliar o perfil anti-inflamatório e antioxidante. A N-acetil-5-metoxitriptamina, conhecida como melatonina, e o exercício físico atuam desempenhando esse papel.

Os índices obtidos do sistema de Vigilância de Fatores de Risco para doenças crônicas não transmissíveis por Inquérito Telefônico (VIGITEL) da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde mostram que a obesidade cresceu 67,8 % entre 2006 e 2018, atingindo 19,8% dos brasileiros. O sobrepeso e a obesidade desencadeiam um perfil inflamatório e oxidante, em contraposição, o exercício físico e a suplementação com a melatonina atuam modulando esse processo com ação anti-inflamatória e antioxidante.

Tendo em vista a importância de caracterização do perfil imunológico e dos fatores que interferem na caracterização do mesmo, a avaliação da interferência da melatonina e do exercício física é de extrema importância para compreensão do mecanismo de modulação dos mesmos no do perfil imunológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar o impacto do uso da suplementação de melatonina nos marcadores inflamatórios após a realização de uma sessão de exercício extenuante de indivíduos eutróficos e com sobrepeso.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito da suplementação de melatonina em marcadores inflamatórios como TNF α , MCP-1, IL-6, IL-1 β , INF gama, IL-1ra, IL-4 e IL-10;
- II. Verificar as alterações nos níveis de cortisol dos voluntários.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento e cálculo amostral

O projeto consiste em um estudo comparativo, classificado em ensaio clínico randomizado, que utilizará amostras de saliva e dados clínicos, pertencentes as populações de estudo.

3.2 População do estudo

Serão comparados diferentes grupos amostrais, integralmente compostos por voluntários saudáveis, divididos entre indivíduos eutróficos e indivíduos com sobrepeso, conforme tabela abaixo. Os grupos amostrais serão compostos por 10 indivíduos eutróficos (IMC entre 18,6 kg/m² e 24,9 kg/m²) e 10 indivíduos com sobrepeso (IMC entre 25 kg/m² a 39,9 kg/m²). Nos grupos serão incluídos apenas indivíduos do sexo masculino, de 18 a 45 anos.

Os grupos com suplementação de melatonina, receberão a dosagem de 10mg/dia, por 5 dias. O grupo controle receberá cápsulas de placebo, por 5 dias, sem que isso acarrete qualquer prejuízo a sua saúde.

Grupo 1: Indivíduos eutróficos receberão 10mg/dia de melatonina, por 5 dias e realizarão exercício físico antes e após a suplementação da melatonina.

Grupo 2: Indivíduos com sobrepeso receberão 10mg/dia de melatonina, por 5 dias e realizarão exercício físico antes e após a suplementação da melatonina.

Grupo 3: Indivíduos eutróficos receberão placebo (cápsulas com farinha de mandioca, por 5 dias e realizarão exercício físico antes e após a suplementação da melatonina.

Grupo 4: Indivíduos com sobrepeso receberão placebo (cápsulas com farinha de mandioca, por 5 dias e realizarão exercício físico antes e após a suplementação da melatonina.

3.3 Amostragem e dados

Serão utilizadas amostras de salivas coletadas, após aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em formato virtual com assinatura virtual.

As seguintes variáveis serão aferidas:

- Idade;
- Cor da pele;
- Alcoolismo;
- Tabagismo;
- Uso de drogas ilícitas;
- Institucionalização;
- Histórico familiar de doenças crônicas;
- Uso de fármacos;
- Prática de exercício físico;
- Qualidade de sono;
- Questionário de hábitos alimentares.

3.4 Coleta de dados

Serão coletados dados e elaborado uma tabela relacionando as variáveis aferidas com os dados obtidos no presente estudo.

3.5 Desenho Experimental

O estudo inclui a avaliação da modulação do perfil imunológico de indivíduos com sobrepeso e de indivíduos eutróficos. Os grupos de indivíduos com sobrepeso e de indivíduos eutróficos, serão divididos conforme a tabela 1, do item 3.2.

A primeira etapa do trabalho consistirá na avaliação online do indivíduo, analisando o perfil do corporal e dos hábitos do voluntário. Nessa etapa será aplicado o TCLE com assinatura online. O paciente receberá um kit de coleta de saliva com as devidas orientações para realização desta coleta e receberá a suplementação de melatonina ou placebo (estudo duplo cego) e o orientação referente a realização do exercício físico. O kit de coleta de saliva e a suplementação serão preparados considerando todos os protocolos de segurança (máscara de proteção, luvas, álcool em gel, entre outros). As caixas contendo o kit e a

suplementação, serão entregues com distanciamento e protocolos de segurança entre a equipe do projeto e o participante do estudo.

Posteriormente os participantes grupo do exercício físico já realizarão a primeira sessão de exercício físico extenuante e serão orientados a ingerir a melatonina pelos próximos 5 dias, em horários pré-agendados, ao final do estudo o grupo realizará outra sessão de exercício físico extenuante e uma nova coleta de saliva. Os grupos sem exercício físico, também terão encontro agendado no final do estudo para acompanhamento e coletarão saliva após a suplementação. Todos os encontros serão realizados de forma virtual, assim como as sessões de exercício físico.

Os grupos que não praticarão exercício físico também serão avaliados e as amostras de saliva serão comparadas para avaliação do perfil imunológico no período de início e período final, com 5 dias do estudo. Todos os encontros serão realizados de forma virtual.

3.6 Colheita de saliva e análises laboratoriais

As coletas de saliva serão realizadas pré-exercício e pós-exercício. As amostras serão colhidas pelo próprio voluntário seguindo as instruções enviadas com o kit. O material coletado será analisado por profissional habilitado, adotando todos os protocolos de segurança para proteção do analista.

Os resíduos das amostras biológicas serão descartados conforme descrito na Resolução RDC nº 306 de 7 de dezembro de 2004, que descreve o Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.7 Análise estatística

A análise estatística será realizada com o programa SPSS 20.00 com o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados serão testados pelo teste de Kolgomorov-Smirnov (Teste KS) e serão apresentados através de média $\pm$ desvio padrão. Será utilizada ANOVA de três vias para comparação das diferentes variáveis, tomando grupo (eutróficos e sobrepeso), exercício (ausência e presença), melatonina (suplementação e placebo) e tempo (pré e pós). Correlações serão testadas através do coeficiente de correlação de Pearson.

3.8 Riscos e Benefícios

A suplementação com melatonina pode ocasionar efeitos colaterais leves, enjoo, dor de cabeça, fadiga, sonolência e diarreia. Nesse caso o profissional prestará as orientações e medidas necessárias para o voluntário do estudo.

Os resultados desta pesquisa poderão ajudar a melhorar o impacto da utilização da melatonina e da realização de exercício físico na modulação imune dos indivíduos. Os voluntários serão informados a respeito de todas as avaliações e resultados obtidos no estudo.

4 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O estudo será realizado na modalidade virtual e domiciliar. As análises laboratoriais serão realizadas no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, localizada na Rua Sarmiento Leite, 245 Porto Alegre, Rio Grande do Sul. O laboratório é equipado com os principais equipamentos necessários para os experimentos descritos, incluindo: geladeiras, freezer, cabine de biossegurança, centrifugas, leitor de microplacas, citometro, entre outros.

5 CRONOGRAMA

Atividades	2019	2020		2021	2021
	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem
Redação do projeto	X				
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X
Submissão ao Comitê de Ética		X		X	
Coleta da amostra e aplicação do questionário				X	X
Análises experimentais				X	X
Análise estatística				X	X
Redação da tese				X	X
Apresentação					X

6 ORÇAMENTO E FONTE FINANCIADORA

Parte dos reagentes, insumos e anticorpos necessários para a realização do presente projeto de pesquisa já está disponível para utilização no laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA. O laboratório também está equipado com os principais equipamentos necessários para os experimentos, como: geladeiras, freezer, cabine de biossegurança (fluxo laminar), centrifugas, leitor de microplacas, entre outros. Os demais itens de infraestrutura necessários estão disponíveis nos outros laboratórios da UFCSPA.

A maioria dos itens descritos abaixo já foram adquiridos e estão armazenados na UFCSPA. Este projeto também poderá ser usado para captação de recursos junto a agências de fomento. Além disso, colaboradores podem auxiliar com reagentes e insumos quando necessário.

Descrição do material	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
Aminoácidos Não essenciais	1	70	70,00
Bicarbonato de Sódio PA 1kg	1	30	30,00
Ficoll Histopaque-1077	2	600,00	1200,00
HEPES 100g	2	170,00	340,00
Lipopolissacarídeo	1	178,00	178,00
L-glutamina 200mM Sigma	1	137,00	137,00
Penicilina G Sódio 10MU	2	151,00	302,00
Piruvato de sódio 25g	1	160,00	160,00
RPMI-1640 Sigma (10x1L)	1	190,00	190,00
Soro Fetal Bovino (Sigma)	1	300,00	300,00
Streptomicina Sulfato 25g	1	151,00	151,00
Vitaminas (Solução MEM vitaminas 100x)	1	112,00	112,00
Anticorpos para citometria de fluxo			
Anti-CD4 100tests (Ebioscience)	1	817,5	817,5
Anti-CD8 100tests (Ebioscience)	1	1042,5	1042,5
Anti-CD25 100tests (Ebioscience)	1	1897,5	1897,5
Anti-CD14 100 tests (Ebioscience)	1	950,85	950,85
Anti-CD16 (Ebioscience)	1	817,5	817,5
Anti-CD28 100 tests (Ebioscience)	1	930,00	930,00

Anti-CD152 100tests (Ebioscience)	1	1222,5	1222,5
Anti-CD279 100tests (Ebioscience)	1	1222,5	1222,5
NF-KB Phosflow	1	1815,0	1815,0
Kits Citocinas			
Human IL-1 10 plates Kit Ebioscience	1	2400,00	2400,00
Human IL-4 10 plates Kit Ebioscience	1	2400,00	2400,00
Human IL-6 10 plates Kit Ebioscience	1	2400,00	2400,00
Human IL-10 10 plates Kit Ebioscience	1	2400,00	2400,00
Human TNF-a 10 plates Kit Ebioscience	1	2400,00	2400,00
Human MCP-1 plates Kit Ebioscience	1	2400,00	2400,00
Reagentes – Bioquímica Estresse Oxidativo			
Ácido Acético 1L	1	100,00	100,00
Ácido Tiobarbitúrico	1	650,00	650,00
Pirgalol 100g	1	743	743,00
DTPA 10g	1	391,00	391,00
N-Ethylmaleimide 5g	1	363,00	363,00
5,5'- Dithiobis(2-nitrobenzoico) 5g	1	563,00	563,00
B-NADPH	1	844,00	844,00
Glutathione Reductase 100UN	1	307,00	307,00
Total			32246,85

7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto será submetido no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA. Somente após o consentimento, será iniciado o processo de recrutamento dos pacientes para coleta das amostras. Os voluntários que estiverem de acordo com os critérios de inclusão serão orientados a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em modalidade virtual, autorizando a sua participação e a utilização do material biológico no estudo. As assinaturas do TCLE serão realizadas em duas vias, sendo uma via para o participante do estudo e outra para o pesquisador responsável. A participação no estudo é voluntária, isto é, caso o participante decida se desligar do projeto, sua saída pode ser realizada em qualquer etapa do estudo e a equipe do estudo estará disponível para qualquer dúvida ou esclarecimento. É importante ressaltar que nenhum voluntário terá custos e não receberá nenhuma quantia por participar da pesquisa. As identidades dos participantes não serão divulgadas em hipótese alguma, assim como as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins exclusivamente científicos.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo “Avaliação da atuação da melatonina e do exercício físico no perfil inflamatório” e antes da sua confirmação de participação neste estudo é necessário esclarecer alguns detalhes importantes.

Estudos apontam que o sobrepeso e a obesidade são problemas que influenciam na saúde pública no mundo, atuando como principais fatores de risco em diferentes doenças. A obesidade e o processo inflamatório são associados ao desenvolvimento de doenças e ao maior risco de infecções, diminuindo a qualidade e expectativa de vida. O perfil imunomodulatório da melatonina ainda está sendo estudado, assim como a atuação da mesma em combinação com a prática de exercício físico. Nesse estudo, pretendemos avaliar o perfil inflamatório frente a suplementação com a melatonina relacionando-a ao sedentarismo e a prática de exercício físico.

Ao participar do estudo você receberá uma cópia deste termo. Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária e você poderá desistir após ter concordado em participar do estudo em qualquer momento, sem que haja nenhuma responsabilidade ou prejuízo.

Na primeira etapa da pesquisa serão enviados um kit com a suplementação (placebo ou melatonina), material de orientação e kit de coleta de saliva. Os materiais serão preparados considerando todos os protocolos de segurança, com utilização de *face shield*, máscara de proteção e álcool em gel. O uso dessa suplementação não acarreta nenhum prejuízo a saúde em curto ou longo prazo, porém em alguns indivíduos pode ocasionar efeitos colaterais leves, como fadiga, dores leves de cabeça, náuseas e diarreia. Nesse caso o profissional prestará as orientações e medidas necessárias para o voluntário do estudo.

No primeiro encontro virtual serão aplicados questionários, para avaliação de hábitos gerais de saúde e de hábitos alimentares. As orientações quanto ao preenchimento serão realizadas por acadêmico(a) treinado(a), com o objetivo de obter informações que permitam definir e avaliar os hábitos e a alimentação consumida, no período de referência, sem indução de respostas.

Os grupos com exercício físico, praticarão exercício de intensidade extenuante, no primeiro encontro e em horário agendado no final do estudo, ambos encontros ocorrerão de forma virtual, com envio de link de acesso 1h antes do horário agendado. A pesquisa possuirá um total de duas coletas de saliva para os indivíduos que não praticarão exercícios: uma no dia das avaliações pré-participação do estudo e outras após 5 dias de

suplementação. Já os indivíduos que praticarão exercício físico realizarão 4 colheitas de saliva: duas no dia das avaliações e início do estudo, (coleta pré e pós exercício) e 5 dias no dia da última sessão de exercício (coleta pré e pós exercício).

Para avaliar seu perfil inflamatório, você será orientado referente ao procedimento de coleta de saliva. Para coleta de saliva serão necessários em torno de 10 minutos e está ocorrerá em duas etapas distintas, antes e após o período de ingestão diária da melatonina e imediatamente antes e imediatamente após a realização das sessões programadas de exercício físico. Todo o procedimento será realizado obedecendo às normas de biossegurança para material biológico.

Os resultados desta pesquisa poderão ajudar a melhorar a saúde dos pacientes. Como benefícios da sua participação na pesquisa, você será informado e orientado a respeito de todas as avaliações realizadas: alimentar, composição corporal e perfil inflamatório.

Informamos que não será realizado nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Os dados da pesquisa só poderão ser divulgados somente para fins científicos, onde será omitido seu nome ou qualquer outra forma de identificação, priorizando a preservação da sua identidade.

Você pode sempre pode solicitar esclarecimentos a qualquer dúvida acerca das avaliações, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo é Naiane Carlesso Bassani (51-992992152), tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou pensar que fui prejudicado pela minha participação, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (51-3303-8804).

Este documento será elaborado em duas vias, sendo elas enviadas na modalidade virtual. Somente após a assinatura deste termo, você ingressa como voluntário da pesquisa. Assinando abaixo, você autoriza sua participação neste estudo.

Nome do participante: _____ Data: ____/____/____

Assinatura do sujeito da pesquisa: _____

Nome do professor orientador: _____ Data: ____/____/____

Assinatura representante legal: _____

Nome do pesquisador: _____ Data: ____/____/____

Assinatura do pesquisador: _____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKER-ANDRÉ, M. et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 28531–28534, 1994.

CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 4, p. 371–381, 2014.

FARIAS, T.dS. Md. et al. Melatonin Supplementation Decreases Hypertrophic Obesity and Inflammation Induced by High-Fat Diet in Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. 750, p.1–10, 2019.

GALLE, F. A.; MARTELLA, D.; BRESCIANI, G. Antioxidant and anti-inflammatory modulation of exercise during aging. **Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia**, v. 53, n. 5, p. 279–284, 2018.

GARCÍA-MESA, Y. et al. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 6, p. 1124.e13-1124.e29, 2012.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1803, p. 57–79, 2018.

KARASEK, M.; WINCZYK, K.; DISEASES, M. Melatonin in humans 1. **Pharmacology**, p. 19–39, 2006.

LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587, 1958.

NELSON DP, KIESOW LA. Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25°C (with Molar Extinction Coefficient s of H₂O₂ Solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474– 478, 1972.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, Nn 2, p. 351–358, 1979.

PEVET, P.; KLOSEN, P.; FELDER-SCHMITTBUHL, M. P. The hormone melatonin: Animal studies. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 6, p. 547–559, 2017.

SHAW, D. M. et al. T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. **Cytokine**, v. 104, n. September 2017, p. 136–142, 2018.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SZEWCZYK-GOLEC, K. et al. Melatonin Supplementation Lowers Oxidative Stress and Regulates Adipokines in Obese Patients on a Calorie-Restricted Diet. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

SRIVASTAVA S, et al. Downregulation of CuZnsuperoxide dismutase contributes to β -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 3, p. 445–455, 2007.

TAROCCO A, et al. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 4, p 317–329, 2019.

TICE RR, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2010.

TONET, A. C.; NÓBREGA, O. de T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 11, n. 2, p. 259–273, 2008.

TORDJMAN, S. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v. 15, p. 434–443, 2017.

VETTER C, PHILLIPS AJK, SILVA A, LOCKLEY SW, GLICKMAN G, Light Me up? Why, When, and How Much Light We Need. **Journal of Biological Rhythms**, v. 34, n. 6, p. 573–575, 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS DE *Enterococcus* spp.
ISOLADOS DAS ÁGUAS DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE, RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Autora: Rebeca Inhoque Pereira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Prof^o Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Projeto de Tese de Doutorado

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS DE *Enterococcus* spp.
ISOLADOS DAS ÁGUAS DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE, RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Projeto de tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências como um dos requisitos para obtenção do Grau de Doutora na Área de Estudos Funcionais e Estruturais de Moléculas com Potencial Biotecnológico.

Autora: Rebeca Inhoque Pereira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Prof^o Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Junho de 2018

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS DE *Enterococcus* spp. ISOLADOS DAS ÁGUAS DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

EXECUTOR

Rebeca Inhoque Pereira

Farmacêutica Industrial pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

ORIENTADORA

Ana Paula Guedes Frazzon

Professora Associada II no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS.

CO-ORIENTADOR

Pedro Alves d'Azevedo

Professor Titular no Departamento de Ciências da Saúde da UFCSPA.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

Biociências

LINHA DE PESQUISA

Estudos funcionais e estruturais de moléculas com potencial biotecnológico.

DATAS DE INÍCIO E PREVISÃO DE CONCLUSÃO

Março/2018 a Março/2022.

PALAVRA(S) CHAVE(S)

Enterococos, MLST, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, probióticos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Enterococcus* spp.

Os enterococos são bactérias Gram-positivas, não formadores de esporos, catalase e oxidase negativas, anaeróbios facultativos, apresentam-se na forma de cocos arranjados aos pares, em cadeias curtas ou ainda como células únicas (Teixeira et al., 2011). Esse gênero é conhecido por tolerar altas concentrações de sais, variações de pH e temperatura, sobrevivendo as mais diversas condições ambientais (Murray, 1990; Teixeira et al., 2011; Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

Devido a essas características, esses micro-organismos estão amplamente distribuídos na natureza. Dentre os possíveis habitats estão o solo, a água, as plantas e os hospedeiros animais, bem como os produtos de consumo humano, incluindo alimentos fermentados e produtos lácteos, conferindo ao gênero a característica da ubiquidade (Mundt, 1961; Mundt, 1963; Fisher & Phillips, 2009; Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014).

1.2. Ecologia do gênero *Enterococcus* spp.

O gênero inclui mais de 58 espécies descritas (Euzéby, 2018), sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as espécies conhecidas como portadoras de fatores de virulência. *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* como espécies com colônias pigmentadas. *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* como espécies que apresentam motilidade. Essas características particulares de cada espécie, também contribui para a facilidade adaptativa e sua ampla distribuição na natureza (Fisher & Phillips, 2009; Lebreton et al., 2014; Lebreton et al., 2017).

Bactérias do gênero *Enterococcus* spp. são comensais do trato gastrointestinal (TGI) de seres humanos e outros animais. A ocorrência e a frequência de algumas espécies de enterococos no TGI podem estar diretamente relacionadas à dieta, à idade e à espécie do hospedeiro, bem como relacionadas a suas variações sazonais e localização geográfica (Byappanahalli et al., 2012; Lebreton et al., 2014; Santestevan et al., 2015; Prichula et al., 2016).

No entanto, estudos epidemiológicos salientam que, pela sua natureza oportunista, os enterococos têm emergido como patógenos associados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde – IRAS (Murray, 1990; Mundy et al., 2000; Koch et al., 2004; Bender et al., 2009; Higuaita & Huycke, 2014). Os enterococos podem ser causadores de infecções como endocardite, infecção-pélvica e intra-abdominal, infecção urinária, meningite e septicemia (Teixeira et al., 2011; Johansson & Rasmussen, 2013; Higuaita & Huycke, 2014).

Em alimentos representam uma importante ferramenta na tecnologia de produção de alimentos fermentados, uma vez que, contribuem no amadurecimento e no desenvolvimento de sabor de muitos queijos, iogurtes e manteiga (Giraffa, 2002; Franz et al., 2003). Além disso, também são utilizados como culturas *starter*, probióticos (Franz et al., 2003; Gomes et al., 2010) e inibidores de espécies patogênicas em alimentos, devido à produção de bacteriocinas (Moraes et al., 2012; Nes et al., 2014).

Apesar desse uso benéfico na indústria alimentícia, os enterococos podem ser indicadores de contaminação fecal na produção e no processamento de alimentos, bem como podem ser reservatórios de genes de resistência, capazes de se disseminarem na cadeia alimentar, contribuindo para a propagação da resistência aos antibióticos na população humana (Fracalanza et al., 2007; Riboldi et al., 2009; Prichula., 2013).

O ecossistema aquático também tem sido alvo de estudos. Byappanahalli et al. (2012), em uma revisão com ênfase em enterococos oriundos de ambientes aquáticos, solo e sedimentos, demonstram a influência de interferentes exógenos, como a salinidade e a disponibilidade de nutrientes, na seleção microbiana. Neste estudo, os autores destacam o peso dos fatores ambientais na determinação da sobrevivência ou expressão de genes, e também para o estabelecimento de relações intra e interespecíficas.

A contaminação das águas ocorre a partir de uma variedade de fontes, incluindo o despejo de esgotos residenciais, industriais e hospitalares. Essa situação é conhecida por proporcionar um habitat natural de micro-organismos patogênicos (Pereira et al., 2008). Além disso, alguns dos principais rios nacionais, que recebem esse tipo de lixo, convergem para a Zona Costeira carreando resíduos de agrotóxicos e fertilizantes, o que torna essa região vulnerável aos impactos ambientais (Moura et al., 2011; WWF-Brasil, 2018).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* foram recomendadas para representar cepas fecais devido a sua prevalência nas fezes humanas, servindo como micro-organismos indicadores utilizados para avaliar a qualidade da água (Maraccini et al., 2012; Stewart et al., 2014). Em virtude disso, o potencial da água como um veículo para a transmissão destas bactérias com algum tipo de adaptabilidade pode ser associado à abundância de bactérias fecais indicadoras e, conseqüentemente, com um aumento do risco de encontrar agentes patogênicos causadores de doenças (Johnston et al., 2004; Bennani et al., 2012).

1.3. Resistência antimicrobiana

Os enterococos são conhecidos por possuir um perfil de resistência múltipla aos antimicrobianos, esse fenômeno está relacionado à existência de genes codificadores de mecanismos que são capazes de alterar a ação de substâncias antimicrobianas, podendo ser observada tanto a resistência intrínseca, quanto a resistência adquirida (Tavares, 2000). A elevação do número de linhagens resistentes, devido uma pressão seletiva, tem sido relacionada ao aumento observado no uso de antimicrobianos nas áreas clínica, tanto humana quanto veterinária; industrial, na conservação de alimentos; e também comercial, como promotor de crescimento em animais (Tavares, 2000; Turnidge, 2004; Lebreton et al., 2014).

No entanto, estações de tratamento de água, esgoto doméstico e hospitalar, sedimentos, águas superficiais, rios, lagos e oceanos podem ser considerados como importantes reservatórios de enterococos resistentes (Caumo et al., 2010; Lebreton et al., 2014), uma vez que a transmissão e disseminação de micro-organismos por vias aquáticas podem ter origem no escoamento de resíduos hospitalares, industriais e residenciais. As medidas tomadas nas estações de tratamento de água e esgoto, todavia, são incapazes de eliminar a carga microbiana, pois a redução do número de bactérias não é suficiente para evitar a difusão por córregos, rios e oceanos (Nachtigall et al., 2013).

Nesse sentido, também se considera, atualmente, inevitável a presença de micro-organismos resistentes no ambiente hospitalar, e sua disseminação para o ambiente extra-hospitalar merece atenção (Tavares, 2000).

A contaminação dos efluentes urbanos seria uma forma de disseminar bactérias (Johnston et al., 2004), de forma a contaminar os animais que habitam esses ambientes. Logo, a investigação de micro-organismos da água pode ser uma ferramenta bastante conveniente na compreensão dos mecanismos de resistência a antimicrobianos (Caumo et al., 2010).

1.4. O Arroio Dilúvio

O Arroio Dilúvio, situado na cidade de Porto Alegre, nasce no limite dos municípios de Porto Alegre e Viamão, na Lomba do Pinheiro, Zona Leste da Cidade, na Represa da Lomba do Sabão. Recebe água de vários afluentes como os arroios dos Marianos, Beco do Salso, Moinho, São Vicente, Mato Grosso, Águas Mortas e Cascatinha e deságua entre os parques Marinha do Brasil e Maurício Sirotsky Sobrinho, também conhecido como Parque da Harmonia (PORTO ALEGRE, 2018).

A microbacia do Dilúvio tem cerca de 80 quilômetros quadrados, dos quais 19% estão localizados no Município de Viamão. A extensão canalizada do Arroio Dilúvio é de aproximadamente 12 quilômetros. Este importante córrego da cidade recebe anualmente 50 mil metros cúbicos de terra e lixo em suas águas, fazendo com que o Arroio Dilúvio seja um dos córregos de água mais poluído da capital (PORTO ALEGRE, 2018).

Esse cenário tem mobilizado o Departamento Municipal de Água e Esgotos – DMAE a fazer campanhas de monitoramento da qualidade da água do arroio desde 1996, com o “Projeto Dilúvio”. Mais recentemente, parcerias entre as Prefeituras de Viamão, Porto Alegre e as Universidades PUC/RS e UFRGS lançaram o Projeto intitulado “Arroio Dilúvio: um futuro possível” com o objetivo de recuperar o ambiente da Bacia do Arroio Dilúvio através da implantação de sistemas técnicos e naturais de saneamento para a gestão de águas, da ecologização do espaço urbano com acréscimo de áreas verdes (UFRGS, 2018).

No entanto, estudos que avaliem a diversidade microbiana do arroio, bem como, a identificação, o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e outros fatores de virulência dessas bactérias são escassos (Zanin et al., 2009; Oliveira et al., 2012, Nachtigall et al., 2013). Além disso, estudos que acompanham um mesmo sítio ecológico são benéficos no sentido de ajudar a

elucidar possíveis mudanças epidemiológicas, ecológicas, tanto quanto estabelecer relações com as espécies presentes, a sazonalidade e pontos de coleta da amostra.

1.5. Estudo epidemiológico das cepas de enterococos

1.5.1 Multi Locus Sequence Typing - MLST

Proposto em 1998 por Maiden e colaboradores para *Neisseria meningitidis*, o *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) (Maiden et al., 1998). O MLST é um procedimento usado para caracterizar isolados de espécies bacterianas usando sequências de fragmentos internos de *genes housekeeping*. Aproximadamente 450 a 500 pb de fragmentos internos de cada gene é amplificado, e este pode ser usado para sequenciar as duas fitas. Para cada gene *housekeeping*, diferentes sequências presentes em linhagens bacterianas diferentes, são classificados como alelos distintos. Para cada isolado, o conjunto dos alelos de cada um dos sete loci define o perfil alélico ou tipo de sequência, também chamado de *sequence type* (ST) (Maiden et al., 1998; Maiden et al., 2006)

A técnica de MLST vem sendo desenvolvida para uma variedade de patógenos procariotos e eucariotos, e seus dados tem contribuindo para a epidemiologia e estudos da biologia destes patógenos. O MLST é uma técnica que possui grandes vantagens em comparação a outras técnicas de tipagem molecular de micro-organismos: é rápida, facilmente aplicada, discriminatória e possui grande reprodutibilidade. Além disso, a técnica permite acomodar uma série de estruturas populacionais em um mesmo banco de dados, disponível *online*. A utilização desta metodologia para caracterização molecular de enterococos pode auxiliar no entendimento dos fatores genéticos que levam ao fenótipo invasivo de algumas linhagens de bactérias (Maiden et al., 1998; Maiden et al., 2006)

A necessidade de entender a epidemiologia e a estrutura populacional tem sido um importante fator para a pesquisa de enterococos. As análises de *MLST* revelaram uma diferença potencialmente importante entre *E. faecalis* e *E. faecium*. Para ambas as espécies, os complexos clonais (CC) particulares parecem estar significativamente associados a isolados derivados de hospitais.

No entanto, a maioria dos CCs de *E. faecalis* contém tanto isolados derivados de hospitais quanto comensais. Isso sugere que em humanos, os isolados comensais e clínicos de *E. faecalis* não são tão evolutivamente distintos como os de *E. faecium* (Homan et al., 2002)

Semelhante ao *E. faecium*, as análises genéticas populacionais por *MLST* indicam que a espécie *E. Faecalis* é altamente recombinogênica, o que pode contribuir para sua diversidade genômica. Alelos em diferentes locos *MLST* são significativamente associados entre si quando se considera tanto STs quanto STs distantemente relacionados dentro de CCs, que podem ter se diversificado recentemente. Isso é sugestivo de uma população clonal que evolui principalmente por mutação (Ruiz-Garbajosa, et al., 2006).

Em suma, o *MLST* mostrou que certas linhagens dentro de *E. faecalis* e *E. faecium* estão consistentemente associadas a infecções, resistência a múltiplos fármacos e persistência hospitalar. No entanto, estudos que avaliem essas linhagens em outros ambientes, como em animais e em alimentos e que relacionem essas diferentes procedências ainda são escassos (Lepage, et al., 2006; Aakra et al., 2007; McBride et al., 2007).

1.5.2 Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE

A técnica da eletroforese em campo pulsado “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” - PFGE é um método de tipagem molecular que visa discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie, comparando características genotípicas. Esta técnica é utilizada tanto para estudos epidemiológicos de surtos hospitalares quanto na comparação da estrutura genética de populações bacterianas (Tenover et al., 1995; Magalhães et al., 2005; Teixeira & Merquior, 2013). É, também, uma metodologia reconhecida como padrão ouro para identificação de muitas linhagens fúngicas, de protozoários e de bactérias, como os enterococos (Saeedi et al., 2002; Teixeira et al., 2011; Furukawa & Suzuki, 2013).

O desenvolvimento de metodologias de tipagem genética tem contribuído para o rastreamento e a compreensão da disseminação de micro-organismos em diversos nichos, uma vez que esses sistemas têm como base as observações de que isolados de uma mesma espécie podem apresentar

diferenças no DNA decorrentes de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (Tenover et al., 1995).

1.6 *Enterococcus* spp. como probióticos

O conceito de probiótico foi sugerido, pela primeira vez, a partir das observações de Metchnikoff, em 1907, correlacionando a utilização de leites fermentados à saúde. Esse autor se baseou na longevidade dos camponeses da Bulgária à baixíssima incidência de câncer de cólon e de uma proteção contra infecções gastrointestinais. Segundo o autor, esses benefícios eram decorrentes do grande consumo de leite fermentado por bactérias produtoras de ácido láctico.

Os probióticos, conhecidos também como “produtos bioterapêuticos vivos” pelo Food and Drug Administration (FDA) como micro-organismos seguros, que devem contemplar características como: ser colonizador normal do trato gastrointestinal do hospedeiro; sobreviver, crescer e se fixar ao epitélio intestinal; enfrentar condições adversas; possuir capacidade antagônica às bactérias prejudiciais; ser atóxico e possuir alta estabilidade e viabilidade para produção em escala industrial (FDA, 2018)

Nesse sentido, as bactérias da microbiota do hospedeiro têm um papel fundamental na sua saúde, sua microbiota indígena suprime a colonização de bactérias invasoras, fornecendo proteção contra espécies patogênicas. Dessa forma, muitos gêneros bacterianos podem trazer efeitos benéficos para o hospedeiro, tais como os *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* spp., (Giraffa, 2003; Soler et al., 2010; Campos et al., 2013). Sob essa perspectiva, muitos enterococos isolados a partir de diferentes fontes vêm sendo utilizados como probióticos contribuindo para o balanço microbial do TGI e para o tratamento de gastroenterites em humanos e animais (Franz et al., 2011; Yang et al., 2014; Laukova et al., 2015; Ghomrassi et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Os estudos genômicos a serem realizados neste projeto possibilitarão compreender como isolados de *Enterococcus* spp., comensais de animais, amostras hospitalares, de alimentos e de água têm adquirido genes de resistência ao longo do seu processo evolutivo em diferentes nichos ecológicos.

Dessa forma, será possível avaliar como as *sequence type* (ST) e os complexos clonais (CCs) circulam dentro das espécies de *E. faecium* e *E. faecalis*. Além disso, estudos que analisam as mudanças ambientais de um determinado local durante o passar do tempo são escassos e ajudam a elucidar a ecologia daquele sistema.

Igualmente importante, a busca por enterococos em fontes naturais que possam ter alguma aplicação biotecnológica tem sido uma ferramenta amplamente utilizada. Nesse sentido, se torna promissora a ideia de investigar diferentes nichos ecológicos na tentativa de isolar cepas de *Enterococcus* spp. como potencial probiótico.

O presente projeto será apresentado na forma de três capítulos:

Capítulo I. Avaliação epidemiológica de cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* isoladas do arroio Dilúvio

1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise epidemiológica de cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, isoladas do arroio Dilúvio, comparando os dados coletados no presente estudo com as cepas de dez anos atrás.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1.1.** Isolar cepas pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. a partir de amostras de água coletadas em diferentes pontos do Arroio Dilúvio, em quatro diferentes períodos do ano;
- 1.1.2.** Identificar as espécies isoladas e determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e os mecanismos genéticos de resistência envolvido;
- 1.1.3.** Estabelecer relação entre a ocorrência de determinadas espécies com o local da coleta, sazonalidade e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- 1.1.4.** Avaliação da relação clonal das cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* isoladas do Arroio Diluvio do presente estudo, com as isoladas a 10 anos, pelas técnicas de MLST e PFGE.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

Serão empregados no presente estudo:

- a. Cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* que serão isoladas de diferentes pontos do Arroio Diluvio;

- b. Cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* já isoladas e identificas em 2009, pertencentes a bacterioteca do Laboratório 222C do ICBS-UFRGS.

2.2 Coleta das amostras

Para o isolamento das cepas do Arroio Dilúvio, serão realizadas quatro coletas de dois litros de amostras de água superficial (profundidade de cerca de um metro) em cinco pontos diferentes do Arroio Dilúvio. As coletas serão de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: águas, sedimentos, comunidades aquáticas e efluentes líquidos (BRASÍLIA: ANA, 2011). Ocorrerão no ano de 2019, sendo a primeira no verão, a segunda no outono, a terceira no inverno e a quarta coleta na primavera. As amostras serão mantidas refrigeradas até a chegada ao Laboratório de Cocos Gram-positivos (LCGP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os pontos de coleta estão representados na Figura 1.

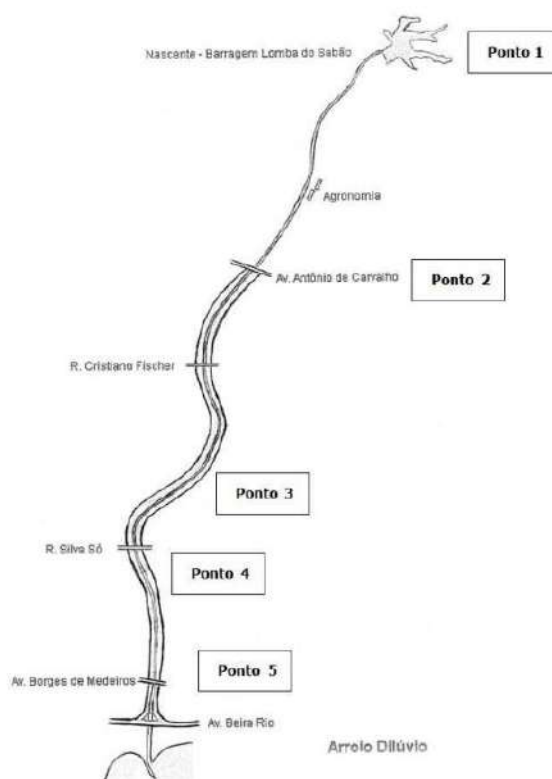


Figura 1. Mapa mostrando o percurso do Arroio Dilúvio na cidade de Porto Alegre e os pontos de coleta das amostras. **Ponto 1:** nascente do arroio, na represa Lomba do Sabão; **Ponto 2:** esquina das Avenidas Ipiranga com a Antônio de Carvalho; **Ponto 3:** esquina da Avenida Ipiranga com a Rua Guilherme Alves; **Ponto 4:** esquina

da Avenida Ipiranga com a Rua Ramiro Barcelos; **Ponto 5:** esquina das Avenidas Ipiranga com a Borges de Medeiros. **Fonte:** Faria, C. M.; Morandi, I. C. Pesquisa Ecos, Ano 3 – Nº 6: p.12, 2002.

2.3 Isolamento e identificação presuntiva

No Laboratório de Cocos Gram-positivos da UFCSA, cada uma das cinco amostras coletadas será semeada em meio seletivo para enterococos, Caldo Azida Dextrose, sendo inoculado 1mL de cada amostra de água em 9mL de caldo. Em seguida serão realizadas diluições seriadas até 10^{-5} e incubadas por 24 horas à 35°C. Após a incubação, 100µL de cada diluição serão semeados em placas contendo meio Ágar Infusão de Cérebro e Coração (Ágar BHI), acrescidos de 6,5% de NaCl e incubados por 24 horas à 35°C. Nas placas que puder ser observado um crescimento bacteriano serão selecionadas aleatoriamente 20 colônias de cada ponto de coleta e re-isoladas por esgotamento em Ágar Bile Esculina (BEA).

Os isolados que apresentarem capacidade de hidrolisar esculina na presença de sais biliares serão semeados em ágar BHI. Posteriormente, a produção da enzima catalase será verificada utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (v/v), bem como a capacidade desses micro-organismos de multiplicar-se a 10°C e 45°C, durante 24 horas de cultivo. Além disso, serão submetidos à identificação microscópica preliminar através da verificação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram.

Após a caracterização presuntiva quanto ao gênero *Enterococcus* spp., as amostras que pertencerem ao gênero serão mantidas sob a forma de suspensão em solução contendo 10% de leite desnatado em pó e glicerol a 10% (v/v), e armazenados em criotubos a – 20°C para análises moleculares posteriores.

2.4 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp. por PCR

O DNA total de todos os isolados bacterianos será obtido através da extração por Chelex, conforme Pinto et al. (2013). A identificação molecular será realizada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para identificar as espécies de enterococos mais frequentemente relatadas na literatura em amostras ambientais. Os oligonucleotídeos iniciadores

espécie-específicos utilizados para as reações com suas respectivas sequências, tamanhos dos fragmentos gerados, temperaturas de anelamentos e referências consultadas estão listados na Tabela 1.

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR espécie-específicos (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. gallinarum* e *E. mundtii*), temperatura de anelamento (TA) e tamanhos dos fragmentos gerados.

Oligonucleotídeos iniciadores ¹	Sequência (5' - 3')	TA (°C)	Produto (pb)	Referência
EM1_A	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	56	658	Cheng et al. (1997)
EM1_B	TATGACAGCGACTCCGATTCC			
DD13	CACCTGAAGAAACAGGC	54	475	Depardieu et al. (2004)
DD3-2	ATGGCTACTTCAATTCACG			
CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAC	50	288	Jackson et al. (2004)
CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG			
HiR1	TTATGTCCCWGTWTTGAAAAATCAA	58	180	Knijff et al. (2001) Prichula (2015)
HiR2	TATTGATAAGCTAATGCAAGCGC			
GA1	TACTTGCTGATTTTGATTGCG	50	173	Jackson et al. (2004)
GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG			
MU1	CAGACATGGATGCTATTCCATCT	64	98	Jackson et al. (2004)
MU2	GCCATGATTTTCCAGAAGAAT			

¹*Enterococcus faecium* (EM1_A e EM1_B), *Enterococcus faecalis* (DD13 e DD3-2), *Enterococcus casseliflavus* (CA1 e CA2), *Enterococcus hirae* (HiR1 e HiR2), *Enterococcus gallinarum* (GA1 e GA2) e *Enterococcus mundtii* (MU1 e MU2).

Cepas padrão e isolados identificados em trabalhos anteriores por sequenciamento da região 16S rRNA (serão utilizadas como controles para as seguintes reações: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* SS 1274, *E. casseliflavus* 1887, *E. gallinarum* RS-64, *E. hirae* C10 e *E. mundtii* J5 (Santestevan et al., 2015).

2.5 Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados será avaliado por meio do teste de disco-difusão em ágar, seguindo-se as recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” – CLSI (CLSI, 2018). Os isolados serão testados frente aos seguintes agentes antimicrobianos: ampicilina – AMP (10µg), ciprofloxacina – CIP (5µg), cloranfenicol – CLO (30µg), eritromicina – ERI (15µg), nitrofurantoína – NIT 55 (300µg), norfloxacina – NOR (10µg), tetraciclina – TET (30µg), vancomicina – VAN (30µg) – rifampicina RIF (5 µg). Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos

(HLR-A), serão utilizados discos de estreptomicina – EST (300 µg) e gentamicina – GEN (120 µg). Para controle de qualidade dos testes de suscetibilidade, serão utilizadas as seguintes amostras-padrão: *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212.

2.6 MLST

Serão realizadas as tipagens por MLST para os isolados selecionados da espécie *E. faecium*, segundo Homan et al., (2002) e para os isolados selecionados da espécie *E. faecalis*, segundo a metodologia descrita por Ruiz-Garbajosa et al., (2006). Esta técnica se baseia na amplificação e posterior sequenciamento de 7 genes conservados: *gdh* (glicose 6-fosfato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter), *gki* (glicoquinase), *aroE* (shikimato 5-desidrogenase), *xpt* (xantina fosofribosiltransferase), e *yiqL* (acetil coenzima A acetiltransferase) para *E. faecalis*. Já para *E. faecium* os 7 genes conservados são: *adk* (adenilato quinase), *atpA* (ATP sintase, subunidade alfa), *ddl* (ligase D-ala: D-ala), *gdh* (glicose 6-fosfato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *purK* (fosforibosilaminoimidazol carboxilase, subunidade ATPase), e *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter). O conjunto das sequências obtida pelos 7 genes gera uma sequência tipo (ST) que será analisada em um banco de dados internacional <<https://pubmlst.org/efaecalis/>>, para *E. faecalis* e <<https://pubmlst.org/efaecium/>>, para *E. faecium*. Para que um isolado seja considerado como pertencente ao mesmo Complexo Clonal (CC), este deve ter o mesmo perfil alélico para 5 dos 7 loci analisados.

2.7 PFGE

O DNA cromossômico dos isolados bacterianos será analisado após extração, tratamento enzimático e separação dos fragmentos gerados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). A técnica de PFGE será realizada de acordo com o protocolo adaptado de Pinto et al. (2013).

Os fragmentos de restrição serão separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado utilizando-se o CHEF DR III (Bio-Rad). O gel será

corado em solução de brometo de etídeo e observado em um transiluminador (Molecular Imager®, Gel Doc™ XR+ With Image Lab™ Software, Bio-Rad) sob luz UV e fotografado.

Será realizada uma inspeção visual do gel seguida de uma análise automatizada com auxílio do programa “Bionumerics”, Versão 7.1 (Applied Maths, Belgium). Os percentuais de similaridade dos perfis de fragmentação serão estimados pelo Coeficiente de *Dice*. Dendrogramas serão gerados utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages) com otimização de 0,5% e tolerância de 1%.

Capítulo II. Comparação do perfil genotípico de cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de diferentes fontes e anos

1. OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise epidemiológica de cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, isoladas de diferentes fontes e anos de isolamentos.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.1.1. Selecionar cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* isolados de fontes como alimentos, águas do dilúvio, amostras clínicas, de animais marinhos e de animais silvestres pertencentes a bacterioteca do Laboratório 222C do ICBS da UFRGS e do LCGP da UFCSPA;

1.1.2. Avaliar a relação clonal entre as diferentes cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, pelas técnicas de MLST e PFGE;

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

Serão empregados no presente estudo:

- a. Cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* isolados de fontes como alimentos, amostras clínicas, de animais marinhos e de animais silvestres pertencentes a bacterioteca do Laboratório 222C do ICBS da UFRGS e do LCGP da UFCSPA.

2.2 Seleção dos enterococos para PFGE e MLST

Os enterococos das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* serão selecionados de acordo com as características fenotípicas do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e genotípicas, como a presença ou ausência de fatores de virulência e resistência e perfil clonal de acordo com o PFGE, uma vez que, alguns dos micro-organismos pertencentes a coleção já possui esses dados. Serão selecionadas 150 cepas.

2.3 PFGE

O DNA cromossômico dos isolados bacterianos será analisado após extração, tratamento enzimático e separação dos fragmentos gerados por eletroforese em campo pulsado (PFGE). A técnica de PFGE será realizada de acordo com o protocolo adaptado de Pinto et al. (2013).

Os fragmentos de restrição serão separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado utilizando-se o CHEF DR III (Bio-Rad). O gel será corado em solução de brometo de etídeo e observado em um transiluminador (Molecular Imager®, Gel Doc™ XR+ With Image Lab™ Software, Bio-Rad) sob luz UV e fotografado.

Será realizada uma inspeção visual do gel seguida de uma análise automatizada com auxílio do programa “Bionumerics”, Versão 7.1 (Applied Maths, Belgium). Os percentuais de similaridade dos perfis de fragmentação serão estimados pelo Coeficiente de *Dice*. Dendrogramas serão gerados utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages) com otimização de 0,5% e tolerância de 1%.

2.4 MLST

Serão realizadas as tipagens por MLST para os isolados selecionados da espécie *E. faecium*, segundo Homan et al., (2002) e para os isolados selecionados da espécie *E. faecalis*, segundo a metodologia descrita por Ruiz-Garbajosa et al., (2006). Esta técnica se baseia na amplificação e posterior sequenciamento de 7 genes conservados: *gdh* (glicose 6-fosfato

desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter), *gki* (glicoquinase), *aroE* (shikimato 5-desidrogenase), *xpt* (xantina fosofribosiltransferase), e *yiqL* (acetil coenzima A acetiltransferase) para *E. faecalis*. Já para *E. faecium* os 7 genes conservados são: *adk* (adenilato quinase), *atpA* (ATP sintase, subunidade alfa), *ddl* (ligase D-ala: D-ala), *gdh* (glicose 6-fosfato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *purK* (fosforibosilaminoimidazol carboxilase, subunidade ATPase), e *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter). O conjunto das sequências obtida pelos 7 genes gera uma sequência tipo (ST) que será analisada em um banco de dados internacional <<https://pubmlst.org/efaecalis/>>, para *E. faecalis* e <<https://pubmlst.org/efaecium/>>, para *E. faecium*. Para que um isolado seja considerado como pertencente ao mesmo Complexo Clonal (CC), este deve ter o mesmo perfil alélico para 5 dos 7 loci analisados.

Capítulo III. Seleção de cepas de enterococos isolados de diferentes fontes com propriedade probiótica

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, as características probióticas de *Enterococcus* spp. isolados de diferentes fontes.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1.1.** Determinar a resistência às condições ácidas e à presença de sais biliares;
- 1.1.2.** Determinar a tolerância ao trânsito gastrointestinal;
- 1.1.3.** Avaliar a capacidade de produção de substâncias antagonicas.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

Serão empregados no presente estudo:

- a) Cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* que serão isoladas de diferentes pontos do Arroio Diluvio;

- b) Cepas de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* já isoladas e identificadas em 2009, pertencentes a bacterioteca do Laboratório 222C do ICBS – UFRGS;
- c) Cepas de *Enterococcus* spp. isolados de outras fontes como alimentos, amostras clínicas, de animais marinhos e de animais silvestres pertencentes a bacterioteca do Laboratório 222C do ICBS da UFRGS e do LCGP da UFCSPA.

2.2 Seleção das amostras

Em relação aos critérios para a seleção de cepas com atividades probióticas, serão observadas características relativas à segurança, como por exemplo, apresentar um perfil de ampla sensibilidade frente aos antimicrobianos.

2.3 Caracterização da atividade probiótica *in vitro*

2.3.1 Determinação da resistência às condições ácidas

A resistência sob condições ácidas será realizada de acordo com o protocolo de Erkkila & Petaja (2000). As cepas selecionadas serão cultivadas em BHI a 37 °C por 24 h. A cultura será padronizada em uma densidade óptica (OD_{600}) = $1,0 \pm 0,05$. Após, um mililitro de cultura padronizada será adicionado a tubos contendo 10 ml de caldo BHI estéril com os seguintes valores de pH: 2,0, 3,0, 4,0 e 7,0 (ajustado com HCl), o pH 7,0 será utilizado como controle. As contagens de células viáveis serão determinadas após exposição a essas condições ácidas durante 0, 1, 2, 3 e 4 h a 37 °C. O experimento será realizado em triplicata. O resultado será expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). A porcentagem de sobrevivência será calculada através da seguinte fórmula: % sobrevivência = final (UFC/mL) / controle (UFC/mL) X 100.

2.3.2 Determinação da resistência à presença de sais biliares

As cepas serão crescidas em BHI caldo e centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4 °C, esse precipitado celular será submetido a 10mL de caldo BHI

suplementado com uma mistura de colato de sódio com desoxicolato de sódio na proporção de 1:1 nas seguintes concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5% (p/v). A avaliação da resistência bacteriana aos sais biliares será calculada mediante a contagem de células viáveis após os seguintes tempos de incubação: 0, 1, 2, 3 e 4 h de incubação, seguido de diluição seriada e incubação pelo método *pour plate* a 37 °C por 24 h. Os valores serão expressos em UFC/mL (Perelmuter et al., 2008).

2.3.3 Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal

Simulando as condições do estômago e do intestino delgado, a viabilidade dos micro-organismos será determinada frente a pepsina em pH 2,0 e a pancreatina em pH 8,0 respectivamente, de acordo com a metodologia descrita por Huang & Adams (2004). As amostras serão crescidas em BHI caldo e centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 4°C, o precipitado será lavado com PBS, pH 7,2 e ressuspensionado com solução salina 0,5%. Após, 0,2 mL da suspensão bacteriana será inoculada em 1,0 mL de solução contendo pepsina e pancreatina para simular as secreções gastrointestinais e incubado a 37°C por 4 horas. A contagem de células viáveis será determinada nos tempos: 0, 1, 2, 3 e 4 horas, os valores serão expressos em UFC/mL.

2.3.4 Produção de substâncias antagônicas

Para verificar a produção de substâncias antagônicas será utilizada a metodologia segundo Tagg et al. (1971). Essa técnica consiste em avaliar a atividade antimicrobiana de enterococos contra *L. monocytogenes* ATCC 35152, uma vez que esse gênero é considerado como o mais sensível às enterocinas (Kawamoto et al., 2002). As cepas de enterococos selecionadas serão semeadas por picada em placas de TSA e incubados a 37°C por 24 h. Após a incubação, será vertida uma segunda camada de ágar TSA semi-sólido (0,7% de ágar), previamente inoculada com a bactéria indicadora na concentração de 10⁶ células/mL. A placa será novamente incubada a 37°C por 24 h, e após será verificada a presença de halos de inibição. A presença de halo de inibição, ao

redor de cada colônia, indica a produção de substâncias antibacterianas, incluindo bacteriocinas.

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos quanto à incidência, aos padrões de suscetibilidade a antimicrobianos e avaliação das características probióticas serão organizados em tabelas e os valores convertidos em percentuais para análise. Os resultados serão analisados pelo método estatístico de ANOVA.

7. ORÇAMENTO

Os equipamentos, materiais permanentes e reagentes necessários para o desenvolvimento do estudo estão disponíveis no Departamento de Ciências da Saúde da UFCSPA (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular) e no Departamento de Microbiologia da UFRGS (Laboratório de Microbiologia Ambiental). Além disso, demais recursos ao longo do desenvolvimento do estudo serão adquiridos através de editais nas agências de fomento.

Descrição dos materiais	Quantidade	Preço Total
Meios de cultura	-	3.500,00
Enzima Taq DNA Polimerase 500U	4	930,00
dNTPset 4x25uml	3	860,00
Oligonucleotídeos	12	1500,00
Agarose 100g	2	1000,00
Brometo de etídio	1	273,00
100 bp DNA ladder 250ml	1	925,00
Tubo de reação 0,2mL – 1000 Un.	5	700,00
Tubo de reação 1,5mL – 500 Um	1	35,00

Ponteiras 10 uL com barreira, estéreis, RNase e DNAs e free, em rack com 96.	2	75,00
Ponteiras 20 uL com barreira, estéreis, RNase e DNAs e free, em rack com 96.	2	70,00
Ponteiras 200 uL com barreira, estéreis, RNase e DNase free, em rack com 96.	2	70,00
Ponteiras 1000 uL com barreira, estéreis, RNase e DNase free, em rack com 96.	5	140,00
Luas de procedimento, látex M, sem talco, caixa 100pç,	2	67,00
Placas de Petri Descartável (pacote com 10 unidades)	500	5.000,00
Total	-	15.145,00

8. CRONOGRAMA

Atividades	2018		2019		2020		2021	
	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem
Pesquisa Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do Projeto	X							
Disciplinas	X	X	X	X	X			
Seleção de amostras na coleção de Enterococos	X	X	X					
Coleta das amostras			X	X				
Isolamento e identificação dos Enterococos			X	X	X			

Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos				X	X	X		
MLST			X	X	X	X		
Avaliação da atividade probiótica				X	X	X		
Tabulação de dados				X	X	X	X	
Exame de Qualificação					X			
Análise dos dados			X	X	X	X	X	X
Redação de artigos					X		X	
Redação da Tese								X
Defesa da tese								X

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKRA, Å.; NYQUIST, O. L.; SNIPEN, L.; REIERSEN, T. S.; NES, I. F. Survey of genomic diversity among *Enterococcus faecalis* strains by microarray-based comparative genomic hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*.73(7):2207–2217. PubMed PMID: 17220255, 2007.

BENDER, E.A.; de FREITAS, A.L.; REITER, K.C. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian journal of microbiology* 40: 693-700, 2009.

BENNANI, M.; AMAROUCH, H.; OUBRIM, N.; COHEN, N. Identification and antimicrobial resistance of fecal *Enterococci* isolated in Coastal Mediterranean environments of Morocco. *Eur. J. Sci. Res.*, v.70, n.2, p.266-275, 2012.

BYAPPANAHALLI, M. N.; NEVERS, M. B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z.R.; HARWOODC, V. J. *Enterococci* in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.76, n.4, p.685-706, 2012.

BRASÍLIA: Agência Nacional de Águas. Guia Nacional de Coleta e Preservação de amostras: águas, sedimentos, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 326p, 2011.

CAMPOS, S.D.E.; PEREIRA, A.M.; MAIA, A.L.P.S. Identificação de *Edwardsiella tarda* em processo septicêmico em *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes: Spheniscidae): relato de caso. *Rev Bras Med Vet* 35: 224-228, 2013.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Rev. Liber.*, v.11, p.89-118, 2010.

CHENG, S.; MCCLESKEY, F .K.; GRESS, M. J.; PETROZIELLO, J .M.; LIU, R.; NAMDARI, H.; BENINGA, K.; SALMEN, A.; DEL VECCHIO, V. G.. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.5, p.1248-1250, 1997.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, Wayne (PA, USA), 2018.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.12, p.5857-5860, 2004.

ERKKILA, S. & PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297e300, 2000.

Euzéby JP (2018) List of prokaryotic names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. Genus *Enterococcus*. *Int J Syst Bacteriol*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 08 jun. 2018.

FDA, <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/ScienceResearch/ucm493702.htm>, acessado em 08/06/2018.

FISHER, K. and PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.*, v.155, p.1749-1757, 2009.

FRACALANZZA, S. A. P.; Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos. 2007. 158 f. Tese (Doutorado) – Inst. Nac. Contr. Qualid. Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

FRANZ, C.; HUCH, M.; ABRIQUEL, H. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 15: 125-140, 2011.

FRANZ, C.M.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 88: 105-122, 2003.

FURUKAWA, T. and SUZUKI, Y. A Proposal for Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Microb. Environ.*, v.28, n.4, p.444-449, 2013.

GHOMRASSI, H.; BEN BRAIEK, O.; CHOISET, Y. Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Dis Aquat Organ* 118: 31-43, 2016.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews* 26: 163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 88: 215-222, 2003.

GOMES, B.C.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINIS, E.C.P. Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. in foods, p 1119-1125. In: Vilas AM (Org.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Research Center, Espanha, 2010.

HIGUITA, N.I. & HUYCKE, M.M. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment, p 1-27. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA, 2014.

HOMAN, W.L.; TRIBE, D.; POZNANSKI, S.; HOGG, G.; SPALBURG, E.; VAN EMBDEN, J.D.; WILLEMS, R.J.: Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol Jun;40(6):1963-71, 2002.

HUANG, Y. & ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. International Journal of Food Microbiology, 91, 253e260, 2004.

JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J. B. Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. J. Clin. Microbiol., v.42, n.8, p.3558-3565, 2004.

JOHANSSON, D. and RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. Microbial. Pathog., v.55, p.28-31, 2013.

JOHNSTON, L.M. & JAYKUS, L.A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. Appl Environ Microbiol 70: 3133-3137, 2004.

KAWAMOTO, S.; SHIMA, J.; SATO, R. Biochemical and genetic characterization of mundicin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Applied and Environmental Microbiology 68: 3830-3840, 2002.

KNIJFF, E.; DELLAGLIO, F.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; TORRIANI, S. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. J. Microbiol. Meth., v.47, p.35-40, 2001.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine, Amsterdam, v.22, n.7, p.822-830, 2004.

LAUKOVA, A.; KANDRICKAKOVA, A.; SCERBOVA, J. Use of bacteriocin-producing, probiotic strain *Enterococcus faecium* AL41 to control intestinal microbiota in farm ostriches. Letters in applied microbiology 60: 531-535, 2015.

LEBRETON, F.; MANSON, A.; SAAVEDRA, J.T.; STRAUB, T. J.; EARL, A. M.; , GILMORE, M. S. Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. Cell, v. 169, p. 849-861, 2017.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. Enterococcus Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. in: GILMORE M. S.; CLEWELL D. B.;

IKE Y.; SHANKAR, N. (editors). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

LEPAGE, E.; BRINSTER, S.; CARON, C.; DUCROIX-CREPY, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; DUNNY, G. Comparative genomic hybridization analysis of *Enterococcus faecalis*: identification of genes absent from food strains. *Journal of Bacteriology*. 188(19):6858–6868. PubMed PMID: 16980489, 2006.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Ver. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing, a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 3140-5, 1998.

MAIDEN, M.C.J. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*; 60: 561- 588, 2006.

MARACCINI, PA; FERGUSON, DM; BOEHM, AB. Diurnal Variation in *Enterococcus* Species Composition in Polluted Ocean Water and a Potential Role for the Enterococcal Carotenoid in Protection against Photoinactivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, n.2, p.305-310, 2012.

MCBRIDE, S. M.; FISCHETTI, V. A.; LEBLANC, D. J.; MOELLERING, R. C. Jr; GILMORE, M. S. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*. 2(7):e582. PubMed PMID: 17611618, 2007.

METCHNIKOFF, E. The prolongation of life. London: William Heinemann, 1907.

MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology* **113**: 318-328, 2012.

MOURA, J. F.; CARDOSO, M.; BELO, M. S. S.; HACON, S; SICILIANO, S. A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças, impactos socioeconômicos e relações benéficas. *Ciências e Saúde Coletiva*, 16(8), p.3469-3480, 2011.

MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci on plants in a wild environment. *J. Appl. Microbiol.*, v.11, n.2, p.141-144, 1963.

MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci: Bud., Blossom., and soil studies. *J. Appl. Microbiol.*, v.9, n.6, p.541-544, 1961.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.13, n.4, p.513-522, 2000.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev., v.3, n.1, p.46-65, 1990.

NACHTIGALL, G; JESUS, AG; ZVOBODA, DA; SANTESTEVAN, NA; MINOTTO, E; MOURA, TM; D'AZEVEDO, P; FRAZZON, J; VAN DER SAND, S; FRAZZON, APG. Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de Enterococcus sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 235-241, 2013.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HOLO, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of bacteriology* 189: 1189-1198, 2007.

OLIVEIRA, D.V.; SILVA, T.C.; ZANIN, J.G.; NACHTIGALL, G.; MEDEIROS, A.; FRAZZON, A.P.G.; VAN DER SAND, S.T. Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-negativas isoladas do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Evidência, Joaçaba v. 12 n. 1, p. 51-62, 2012.

PEREIRA, CS; AMORIM, SD; SANTOS, AFM; SICILIANO, S; MORENO, IB; OTT, PH; RODRIGUES, DP. Plesiomonas shigelloides and Aeromonadaceae family pathogens isolated from marine mammals of southern and southeastern Brazilian coast. Braz. J. Microbiol., v.39, p.749-755, 2008.

PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic Lactobacillus murinus isolated from the dog. Journal of Applied Microbiology, 104, 1718e1725, 2008.

PINTO, T. C. A.; SOUZA, A. R. V.; PINA, S. E. C. M.; COSTA, N. S.; NETO, A. A. B.; NEVES, F. P. G.; MERQUIOR, V. L. C.; DIAS, C. A. G.; PERALTA, J. M.; TEIXEIRA, LM. Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant Streptococcus pneumoniae isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the atpC gene. Journal of Clinical Microbiology, Washington DC, v. 51, n. 10, p. 3242-3249, Oct. 2013.

PORTO ALEGRE. Departamento Municipal de Águas e Esgotos. Prefeitura Municipal. A melhoria da qualidade da água do arroio Dilúvio (sub-bacia D-11, Porto Alegre / RS) e sua relação com as ligações de esgoto no sistema separador absoluto do DMAE. 2009. Disponível em: <http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/dmae/usu_doc/laudo_diluvio_d11_n_14_2009_dvp.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2018.

PRICHULA, J. Caracterização fenotípica e genotípica de Enterococcus spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (Spheniscus magellanicus) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. 2015. 154f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

PRICHULA, J.; ZVOBODA, D.A.; PEREIRA, R.I. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no Sul do Brasil. R bras Ci Vet 20: 104-109, 2013.

PRICHULA, J; CAMPOS, FS; PEREIRA, RI; CARDOSO, LA; WACHHOLZ, GR; PIETA, L; MARIOT, RF; MOURA, TM; TAVARES, M; d'AZEVEDO, PA; FRAZZON, J; FRAZZON, APG. Complete Genome Sequence of *Enterococcus faecalis* Strain P8-1 Isolated from Wild Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*) Feces on the South Coast of Brazil, v.4, 2016.

RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; d'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, A. P. G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* sp. isolated from food in southern Brazil. *Bras. J. Microbiol.*, v.40, p.125-128, 2009.

RUIZ-GARBAJOSA, P.; BONTEN, M. J.; ROBINSON, D. A.; TOP, J.; NALLAPAREDDY, S. R.; TORRES, C. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(6):2220–2228. PubMed PMID: 16757624, 2006.

SAEEDI, B.; HALLGREN, A.; JONASSON, J.; NILSSON, L. E.; HANBERGER, H.; ISAKSSON, B. Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS*, Copenhagen, v.110, n.12, p.869-874, 2002.

SANTESTEVAN, NA; ZVOBODA, DA; PRICHULA, J; PEREIRA, RI; WACHHOLZ, GR; CARDOSO, LA; MOURA, TM; MEDEIROS, AW; AMORIN, DB; TAVARES, M; d'AZEVEDO, PA; FRANCO, AC; FRAZZON, J; FRAZZON, APG. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South American fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantarctic fur seal) *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.31, p.1935–1946, 2015.

SOLER, J.J.; MARTÍN-VIVALDI, M.; PERALTA-SÁNCHEZ, J.M. Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. *The Open Ornithology Journal* 3: 93-100, 2010.

STEWART, J. R.; TOWNSEND, F. I.; LANE, S. M.; DYAR, E.; HOHN, A. A.; ROWLES, T. K.; STAGGS, L. A.; WELLS, R. S.; BALMER, B. C.; SCHWACKE, L. H. Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA. *Dis. Aquat. Org.*, v.108, n.2, p.91-102, 2014.

TAGG, J.R. & MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21:943, 1971.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, v.33, p.281-301, 2000.

TEIXEIRA L. M.; CARVALHO, M. G.; SHEWMAKER, P. L.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. *Manual of Clinical Microbiology* 10th ed., Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p.350-364, 2011.

TEIXEIRA L. M.; MERQUIOR, V. L. C. Enterococcus. In: FILIPPIS, I.; MCKEE, L.M. (editors). Molecular typing in bacterial infections. New York: Humana Press, p.17-26, 2013.

TENOVER, F. C. ; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., v.33, p.2233-2239, 1995.

TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals: prejudices, perceptions and realities. J Antimicrob Chemother, v.53, n.1, p.26-27, 2004.

UFRGS, Programa de Revitalização da Bacia do Arroio Dilúvio: <http://www.ufrgs.br/arroidiluvio/noticias/programa-de-revitalizacao-da-bacia-do-arroio-diluvio-avanca>, acessado em 10/05/2018.

WWF - Brasil. "World Wildlife Fund" Brasil. Disponível em http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_costeiro/biomas_costeira_curiosidades/. Acesso em: 20 mar. 2018.

YANG, S.C.; LIN, C.H.; SUNG, C.T. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 5: 241, 2014.

ZANIN, J.G. Avaliação da contaminação fecal e perfil de resistência a antimicrobianos destas bactérias presentes no Arroio Dilúvio. Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

Projeto de Pesquisa – submissão ao Edital FAPERGS FAPESP 2019

FAPERGS: Edital 06/2019

FAPESP: www.fapesp.br/12876

Título: **Imunoterapia Oncológica Baseada na Inibição da E3 Ubiquitina-Ligase MARCH1**

Equipe:

Pesquisador Responsável RS: Cristina
Bonorino – UFCSPA

Luiz Carlos Rodrigues Jr., UFCSPA
Matheus Gutierrez, doutorando
UFCSPA Karina Rodrigues, doutoranda
UFCSPA Mauricio Rigo, pós-doutorando
PUCRS

Resumo:

Pesquisador Responsável SP: José Alexandre
Mazargão Barbuto – USP

Renato Cardoso, Mestrando, USP
Gabriela Evangelista, Doutoranda, USP Dra.
Patrícia Bergami-Santos, Pesquisadora,
USP
Dr. Salomão Doria Jorge, Pesquisador USP

Uma série de anticorpos monoclonais (mAbs) são hoje utilizados na modulação da tolerância imune para o tratamento do câncer. O bloqueio ou desbloqueio imunoterápico visa atingir moléculas existentes na sinapse imunológica, ou seja, na interface de interação entre a célula efetora (por exemplo, célula do sistema imunológico) e a célula alvo (por exemplo, célula tumoral). Esta proposta visa investigar uma molécula candidata a ser um novo alvo de modulação imune em câncer, a molécula MARCH1. Em estudos preliminares, uma

colaboração dos dois grupos proponentes evidenciou níveis aumentados dessa molécula em células dendríticas de pacientes de câncer. MARCH1 ubiquitina as moléculas de MHC e CD86, reduzindo os dois principais sinais para a ativação do sistema imune. No ano passado, o grupo do RS descreveu a prova de conceito da validade de aumentar níveis de MARCH1 para diminuir a rejeição a enxertos. Aqui, visamos obter prova de conceito de que, em tumores níveis elevados de MARCH1 reduzem a resposta imune antitumoral, e que moléculas que reduzam a atividade de MARCH1 tem potencial para o tratamento oncológico. Vamos investigar o papel biológico de MARCH-1 em células dendríticas, tanto em modelos experimentais de tumores, quanto em pacientes com câncer, buscando sua correlação com a progressão tumoral e com a resposta à imunoterapia, gerando conhecimento para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para uso em oncologia. Nós analisaremos níveis de MARCH1 e os efeitos de sua manipulação em células murinas e humanas, e desenvolveremos estudos *in silico* de ancoramento molecular e triagem virtual para prospectar e testar novas entidades moleculares com potencial inovador. Os resultados do estudo devem incluir geração de conhecimento, proteção de propriedade intelectual, e formação de recursos humanos em um dos mercados que mais cresce hoje dentro da indústria farmacêutica internacional.

1. Apresentação do problema

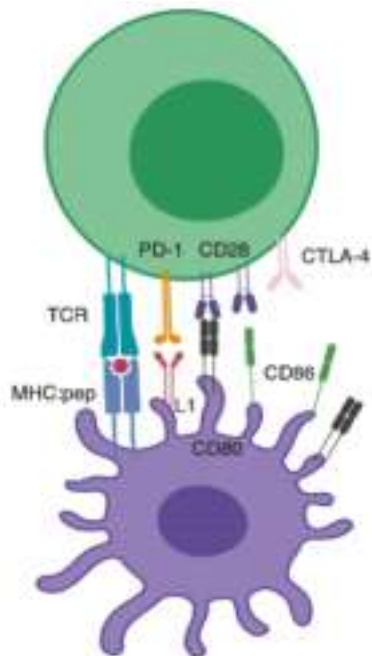
Este é um projeto de pesquisa focado em inovação na área de biotecnologia da saúde. Do ponto de vista da saúde pública, o tratamento do câncer é justamente o principal alvo da inovação. O câncer constitui a segunda principal causa de mortalidade e morbidade no Brasil. Enquanto os custos diretos com tratamento oncológico aproximam-se de 4 bilhões de reais anuais (segundo o INCA), custos indiretos podem alcançar quatro vezes esse valor. São urgentemente necessárias alternativas inovadoras que levem, principalmente, à diminuição da incidência de câncer, e a um aumento da qualidade de vida dos pacientes já afetados.

O presente projeto pretende, a curto prazo, obter dados para o desenvolvimento de medicamentos novos (novas moléculas) baseados em conhecimento gerado por pesquisadores brasileiros e validados internacionalmente. A médio e a longo prazo, fortalece uma colaboração entre grupos de imunologia tumoral de Porto Alegre e São Paulo, dois dos três únicos locais do país com grupos estabelecidos nessa área, gera novo conhecimento para publicações científicas de alto impacto, e lança as bases para o estabelecimento de tecnologias de desenvolvimento de outros medicamentos imunoterápicos.

2. Significância

Existe uma revolução no tratamento do câncer, e essa revolução é imunológica. A terapia do câncer pode ser agrupada em três grandes grupos, a saber: cirurgia, radioterapia, e intervenções medicamentosas. Mais recentemente, um método diferente que usa o sistema imune para controlar o câncer tem sido levado à prática clínica com o nome abrangente de imunoterapia. Essa metodologia trouxe uma virada de jogo para a terapia oncológica, pois não foca no tumor. Nesta abordagem terapêutica, estratégias tecnológicas exploram o próprio sistema imune do paciente para tratar o câncer. Assim, drogas ou processos tecnológicos são empregados para ativar ou modular células imunológicas e fazer com que elas reconheçam o tecido tumoral como diferente de células normais do corpo e as eliminando. Dentro dessas terapias estão moléculas e células que atuam no bloqueio do sistema imunológico (*immune checkpoint blockade*).

Desbloqueadores imunológicos agem nas moléculas co-estimulatórias ou co-inibidoras e/ou em seus receptores localizados nas membranas de células do sistema imune envolvidas na resposta ao tumor, restabelecendo a atividade de células imunológicas efectoras que vão eliminar os



tumores. Esse bloqueio imune é naturalmente usado pelo corpo, para evitar efeitos colaterais da reação do sistema imune ativado contra infecções, contra os próprios tecidos saudáveis. Entretanto, em pacientes com tumores clinicamente detectáveis, muitas vezes, houve ativação desses mecanismos bloqueadores, impedindo a resposta imune, que poderia controlar o crescimento tumoral, ou erradicá-lo. Consequentemente, no caso do câncer, a remoção deste bloqueio oferece uma alternativa para

intensificar o nível de resposta imune no microambiente tumoral, por ativação de células T citotóxicas (Pardoll 2012) ou de outros mecanismos efetores.

A Figura 1 (ao lado) esquematiza o racional para a interferência medicamentosa na **sinapse imune, que ocorre nos órgãos linfoides**, e os sinais trocados entre células dendríticas – em roxo - apresentadoras de antígeno, ou APC – e os linfócitos T, que efetuam a resposta. As interações MHC com TCR (o chamado sinal 1) e CD80 ou CD86 com CD28 (sinal 2) fornecem sinais de ativação para as células T, estimulando a resposta imune e a destruição do tumor. As

interações de PD-1

com PD-L1 e de

CTLA-4 com CD80 ou

CD86 fornecem um

sinal negativo para o

linfócito T – em verde.

Atualmente, a

modulação da

sinapse imune é feita

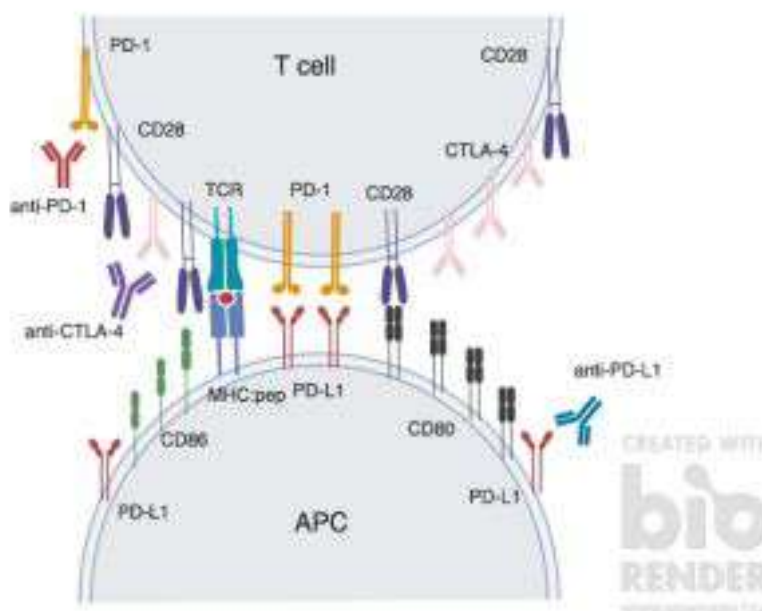
utilizando-se

anticorpos

monoclonais. O

anticorpo monoclonal

anti-CTLA4 - ipilimumab (Yervoy®) desenvolvido e comercializado pela Bristol-Myers Squibb **foi o primeiro** exemplo de terapia aprovada clinicamente com modo de ação de modular o sistema imune para tratar câncer. A droga Ipilimumab foi aprovada pelo FDA em 2011 para tratamento de pacientes com melanoma (Lipson and Drake 2011). Hoje, há uma série de anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados na modulação da tolerância imune para o tratamento do câncer e esta área de desenvolvimento tecnológico mostra-se extremamente ativa. A lógica de tratar o sistema imune para que este, por sua vez, reconheça o células cancerosas e desencadeie respostas adaptativas de eliminação transcendeu a terapia medicamentosa moderna e tem potencial pan-oncológico, ou seja, para ser aplicado a todos os tipos de câncer, possivelmente como um potencializador de outras terapias e para prevenção do câncer (Postow, Callahan, and Wolchok 2015) (Webber et al. 2018). As duas outras drogas aprovadas depois do ipilimumab para tratamento clínico foram o anticorpo monoclonal anti-PD-1



(nivolumab da Bristol Myers Squibb, Pembrolizumab da Merck); e o anti-PD-L1 (BMS-936559 da Bristol-Myers Squibb), esquematizados na Figura 2, acima.

Em 2018, James Allison e Tetsuo Honjo dividiram o Prêmio Nobel de Medicina por seu trabalho pioneiro na área. Atualmente, todas as grandes empresas farmacêuticas possuem anticorpos contra moléculas da sinapse imunológica em desenvolvimento e/ou em ensaios clínicos. Este é um mercado que mobiliza hoje 98 bilhões de dólares mundialmente, com previsão de crescimento de aproximadamente 10% ao ano, ao menos até 2022 (Grilo and Mantalaris 2019).

Contudo, atualmente, todos os estudos clínicos mostram que a taxa de sucesso de tratamento usando desbloqueadores imunes fica ao redor de 25%. Embora estes sejam números inéditos para terapia oncológica, ainda resta entender por que 75% dos pacientes não respondem. Já foi verificado em mais de um estudo clínico que a associação de desbloqueadores imunes para CTLA-4, PD-1 ou PD-L1 tem a taxa de sucesso aumentada para até 40%, em diferentes combinações entre eles (Drake 2012)(Ribas and Wolchok 2018), ou com outras terapias oncológicas (Mahoney, Rennert, and Freeman 2015) (Khalil et al. 2016).

Aqui surge então uma oportunidade para a descoberta de mecanismos de modulação adicionais, que ajam sozinhos ou associados aos desbloqueadores já estabelecidos. Com a descoberta de novos mecanismos, novas moléculas são necessárias para essa intervenção.

3. Jutificativa da proposta e dados preliminares

O bloqueio ou desbloqueio imunoterápico visa atingir moléculas existentes na sinapse imunológica, ou seja, na interface de interação entre a célula efetora (por exemplo, célula do sistema imunológico) e a célula alvo (por exemplo, célula tumoral). Um ponto ainda não explorado na sinapse imune para a terapia oncológica é o **senal 1**: a ação da molécula apresentadora de antígenos, o MHC, ou HLA em humanos (Complexo Principal de Histocompatibilidade). As moléculas de classe II codificadas por este complexo, o MHC-II são formadas pela união de duas subunidades proteicas, formando uma fenda proteica que acomoda pequenos peptídeos (**Figura 3**). Este complexo é apresentado na superfície celular, propiciando a ativação do sistema imunológico através da interação com linfócitos T CD4+ que apresentam TCR específico para o complexo MHC-II-peptídeo. As células T CD4+ coordenam toda a imunidade adaptativa. Existem proteínas que promovem a diminuição na apresentação do MHC

II na superfície células e, conseqüentemente, uma diminuição na resposta imunológica contra as células tumorais. Uma dessas moléculas é MARCH1, uma proteína que pertence à família das ubiquitina ligases E3 ligadas à membrana plasmática (Metzger et al. 2014) (Liu, Mintern, and Villadangos 2019). Sua função consiste, basicamente, na adição de ubiquitina a proteínas diversas, especificamente através de ligação covalente a resíduos de lisina, direcionando a proteína marcada para degradação no citoplasma da célula. Dessa forma, MARCH1 promove a diminuição da expressão do MHC-II na superfície celular (Baravalle et al. 2011). Além disso, MARCH1 também está envolvida na diminuição da expressão de CD86 (Corcoran et al. 2011), o sinal 2, uma das moléculas co-estimulatórias necessárias para ativação de linfócitos T. Quando as DCs são ativadas elas diminuem a expressão de MARCH1, através de um mecanismo regulado por CD83, o que resulta na estabilização dos níveis de MHC II e CD86 na superfície celular (Tze et al. 2011).

Neste ponto é interessante notar que em tumores a expressão de CD83 é aberrante (R. B. Baleeiro and Barbutto 2008)(R. B. Baleeiro et al. 2008) inclusive com o aumento da secreção de sua forma solúvel, o que, além de afetar a sinalização por cálcio nas células T(Pinho et al. 2014) (Pinho et al. 2016) poderia interferir com o papel regulador de CD83 de membrana sobre a expressão de MARCH1. A indução de MARCH1 é dependente da citocina IL-10 (Thibodeau et al. 2008) levando ao aumento da ubiquitinação do MHC II e CD86, direcionando essas moléculas para degradação em lisossomos e, conseqüentemente, diminuindo sua expressão na superfície das DCs (Oh et al. 2013) oferecendo um ambiente imunossuprimido favorável ao crescimento tumoral. Foi observado que a expressão de MARCH1 nas DCs de camundongos regula a ativação de células T *in vitro* (Baravalle et al. 2011) e é essencial para a geração de células T regulatórias (Tregs) *in vivo* (Oh et al. 2013). Células dessa subpopulação são inibidoras naturais da função de linfócitos T efetores, constituem uma das principais estratégias para o crescimento dos tumores *in vivo*, e são o principal alvo do anticorpo ipilimumab, por expressarem altos níveis de CTLA-4.

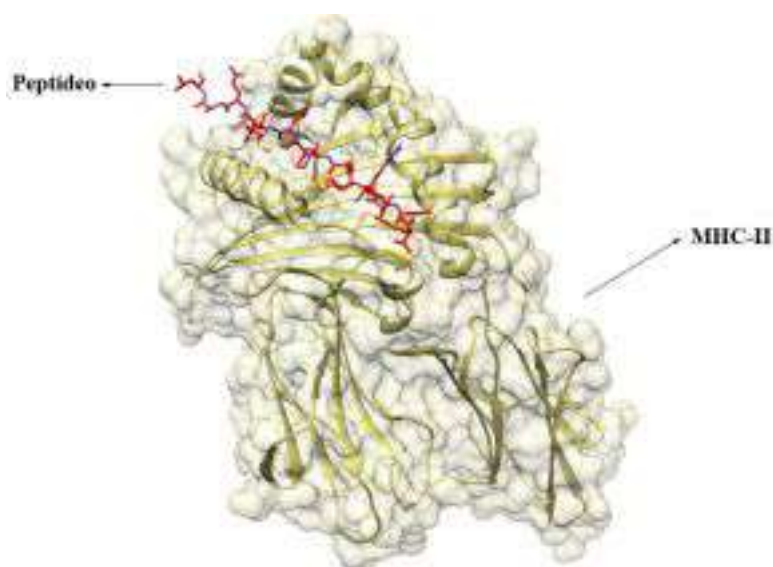


Figura 3. Estrutura tridimensional da molécula de MHC-II interagindo com um peptídeo, formando um complexo reconhecido pelos receptores de células T das células do sistema imunológico. *Reproduzido e modificado a partir da estrutura HLA-DR1 (PDB ID:4X5W), por Mauricio Rigo.*

O grupo liderado pela Dra. Cristina Bonorino vem estudando, por mais de treze anos, a diminuição de MHC II e CD86 em células dendríticas pela proteína DnaK de *Mycobacterium tuberculosis* (Detanico et al. 2004)(Motta et al. 2007) (Borges et al. 2010) (Borges et al. 2012) (Lopes et al. 2014)(Borges et al. 2016)(Lopes et al. 2016). Em 2018, o grupo publicou na *Nature Communications* (Borges et al. 2018) o trabalho descrevendo o mecanismo pelo qual isso ocorre, nesta e outras células inatas. Em resumo, a DnaK liga-se a um receptor de superfície que sinaliza via TLR2, induzindo IL-10 que ativa MARCH-1, que ubiquitina e induz a degradação de MHC II e CD86, levando à inibição da ativação de linfócitos T e da rejeição de transplante. Dessa forma, temos grande experiência nessa rota imunossupressora, com ampla validação internacional. Nosso grupo desenvolveu nesse processo uma parceria com a Universidade de Harvard, com o Laboratório do Dr. Leonardo Riella, atual endereço do nosso colaborador Thiago Borges, egresso do laboratório.

A partir dos resultados de MARCH1 como um potente inibidor da resposta imune, **nós hipotetizamos que MARCH1 estaria aumentado em pacientes de câncer, inibindo a resposta imune que rejeita o tumor.** Iniciamos assim uma colaboração com o Dr. José

Alexandre Mazargão Barbuto, do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. O Dr. Barbuto é um pioneiro no Brasil no estudo de terapias imunológicas para o tratamento de câncer, focando em células dendríticas (DCs) de pacientes com tumores.

Em nosso laboratório, avaliamos os níveis de MARCH1 em células dendríticas diferenciadas a partir de sangue periférico de pacientes com câncer de mama, estudadas pelo grupo do Dr. Barbuto. Comparamos ainda como essas células se comportam frente a um estímulo de maturação (adição da citocina TNF- α na cultura), em relação às DCs de indivíduos controle.

A expressão de MARCH1 é difícil de ser detectada em células em repouso. Contudo, quando as células são ativadas por um estímulo inflamatório como TNF ou um agonista de receptores do tipo Toll, podemos quantificar diferenças no grau de diminuição de expressão de MARCH1. Observamos que DCs de pacientes com câncer de mama são mais resistentes à diminuição da expressão de MARCH1 após um estímulo inflamatório (Figura 4). Ou seja, quando presentes no microambiente tumoral essas células são provavelmente ineficientes para gerar uma resposta imunológica contra o tumor, mesmo na presença de TNF.

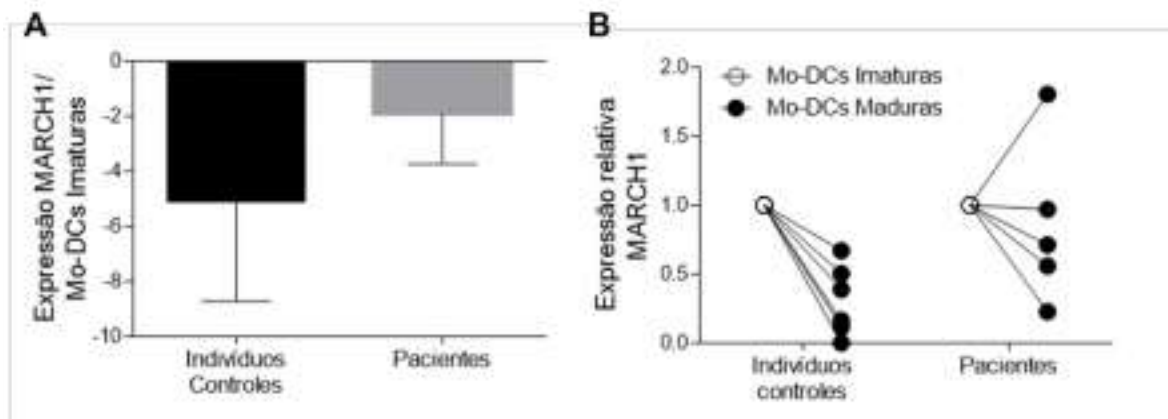


Figura 4: A expressão de MARCH1 foi analisada por PCR tempo real pelo grupo de Porto Alegre em células dendríticas derivadas de monócitos de sangue periférico (Mo-DCs) de pacientes com câncer de mama ou indivíduos controle obtidas pelo grupo de São Paulo. (A) Expressão de MARCH1 em Mo-DCs maduras (estimuladas com a citocina TNF- α) em relação às Mo-DCs imaturas. Os números negativos indicam que as células tiveram uma diminuição da expressão de MARCH1. (B) Expressão de MARCH1 em Mo-DCs antes (imaturas) ou depois (maduras) da adição do estímulo inflamatório (citocina TNF- α).

Do ponto de vista imunoterápico, essa diminuição é desvantajosa, uma vez que menos peptídeos serão apresentados pelo MHC-II, diminuindo assim a probabilidade de antígenos da célula tumoral serem reconhecidos pelo sistema imunológico e, assim, induzirem resposta que leve à eliminação do tumor. Na verdade, é ainda mais intrigante o fato de que mesmo células dendríticas derivadas *in vitro*, a partir de monócitos de pacientes com câncer, apresentem desvios fenotípicos e funcionais (Neves et al. 2005) e sejam propensas a induzir linfócitos Treg (Ramos et al 2012). Nesse sentido, a inibição seletiva de MARCH1 no microambiente tumoral pode restaurar a expressão de MHC II, assim como também *in vitro*, permitindo a utilização de células dos próprios pacientes em estratégias de vacinação baseadas em células dendríticas (Barbuto 2013) aumentando a eficácia da apresentação antigênica e constituindo, assim, mais uma estratégia para buscar um melhor desfecho para pacientes com câncer.

Serão avaliadas, simultaneamente, a relação da expressão e atividade de MARCH1 e os níveis de MHC-II, CD83 e CD86 com o estado de ativação de células dendríticas do microambiente tumoral, no sangue e das células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer. O conhecimento obtido ao nível molecular e clínico sobre indução de tolerância através do bloqueio do *checkpoint* na sinapse imunológica é, neste projeto de pesquisa, combinado com fortes evidências experimentais que apontam para o envolvimento do aumento da expressão de MARCH1 por células do microambiente tumoral como estratégia para a supressão da resposta imune antitumoral orientada por células dendríticas tolerogênicas e células T regulatórias (Tregs). As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs) responsáveis por gerar respostas T, sejam elas efetoras/anti-tumorais ou imunomoduladoras como as Tregs que são pró-tumorais. Os tumores possuem uma série de mecanismos imunomoduladores, os quais tornam o microambiente a sua volta imunossuprimido, evitando resposta imunes anti-tumorais (Souza and Bonorino 2009). Uma estratégia é a diminuição da expressão de MHC-II (Kambayashi and Laufer 2014) e de moléculas co-estimuladoras, como o CD86 (Kelner 2008), pelas DCs infiltrantes nos tumores. Esses resultados experimentais fornecem fortes evidências de que MARCH1 tem um papel relevante na modulação do sistema imune, contribuindo para a indução de tolerância e, consequentemente, sua inibição dirigida poderia gerar um cenário clínico comparável àquele gerados pelos desbloqueadores dos *checkpoints* imunes. Um esquema do racional da proposta pode ser visualizado na Figura 5, abaixo.

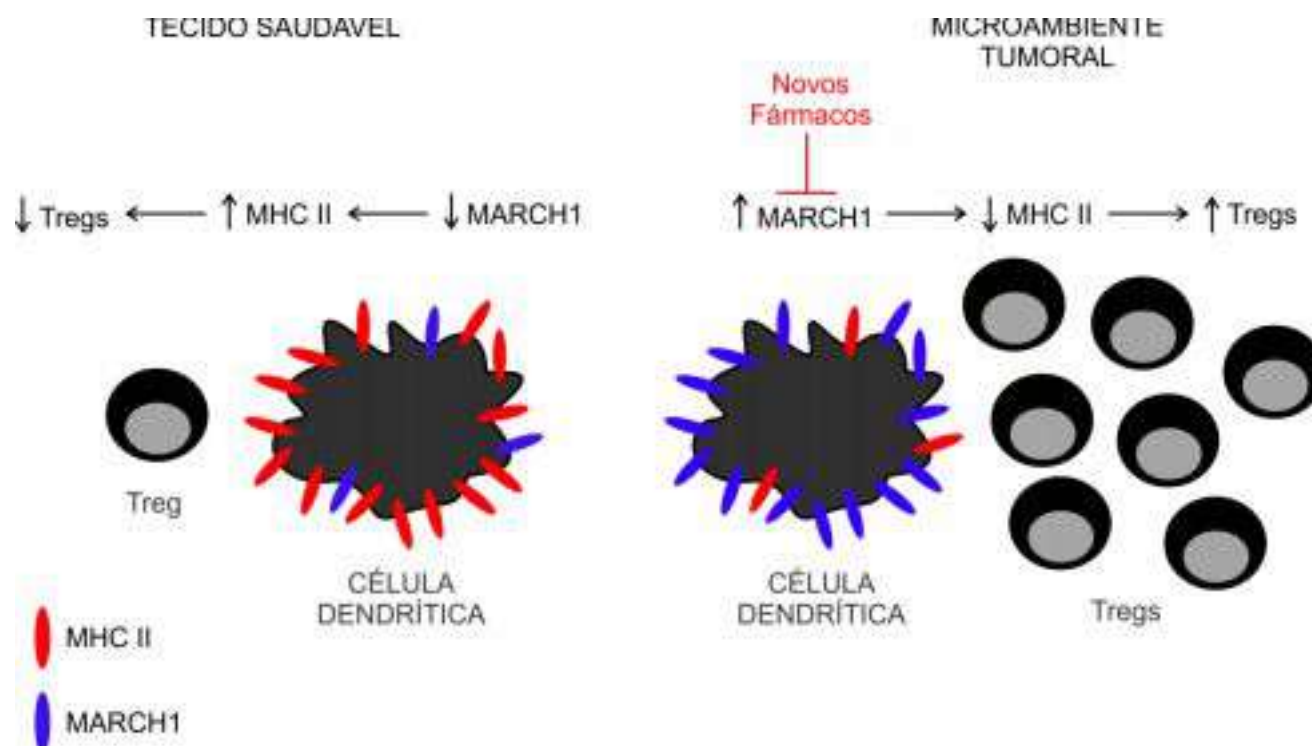


Figura 5: Esquema demonstrando o mecanismo de ação a ser explorado nesta proposta.

Queremos determinar se a inibição de MARCH-1 pode **restabelecer a capacidade de ativação das células dendríticas, tanto das infiltrantes nos tumores, quanto das geradas *in vitro*, a partir dos monócitos de pacientes aumentando sua capacidade de induzir a resposta de células T efetoras em detrimento das Tregs** seletivamente no microambiente tumoral pela inibição de sua indução. Para isso, nosso grupo analisou de forma preliminar, *in silico*, a interação de MARCH1 com suas moléculas alvo. A compreensão dessas interações fornece informações cruciais para o desenho de inibidores. Embora a relação entre a interação MARCH1/MHC-II tenha sido abordada na literatura, a utilização dos dados estruturais da interação entre essas duas proteínas para o desenvolvimento de um fármaco anticâncer ainda não foi explorada. Dados do grupo da Dra. Cristina, que conta com pesquisadores que trabalham *in silico*, coordenados pelo Dr. Maurício Rigo, apontam para interação específica entre o aminoácido lisina, presente na posição 225 da cadeia beta do MHC-II, e o domínio catalítico

RING de MARCH1 (Figura 5). Para desenvolvimento de um fármaco inovador, pretendemos explorar essa região buscando moléculas de baixo peso molecular e análogos peptídicos que mimetizem a ligação da lisina 225 à MARCH1, interferindo diretamente na interação com o

MHC

II, visando o aumento da sua expressão e apresentação na superfície celular.

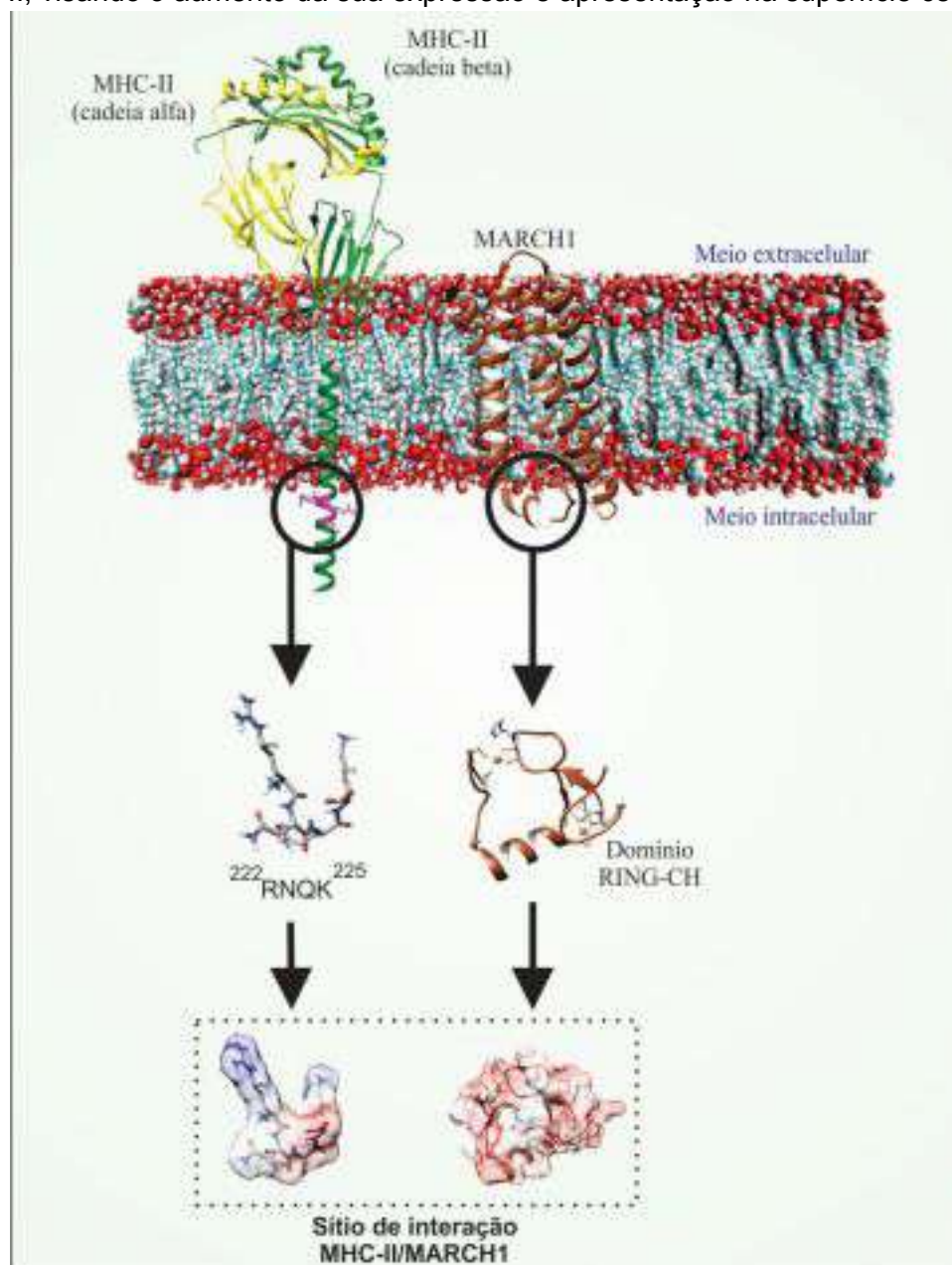


Figura 6: Ilustração

esquemática da interação entre MHC-II e MARCH1. A cadeia beta do MHC II carrega em sua porção citoplasmática uma região composta pelos resíduos ²²²RNQK²²⁵. Nessa região, o aminoácido lisina interage com o domínio RING-CH de MARCH1, o qual medeia a ubiquitinação do MHC-II e sua respectiva endocitose. Abaixo, a superfície das duas regiões está representada, evidenciando o seu panorama topográfico e eletrostático (-10 kT a +10kT).

Contribuirá ainda para este trabalho o Dr. Salomão Doria Jorge, do grupo do Dr. Barbuto, que tem expertise em CADD e desenvolveu um candidato a fármaco, inibidor simultâneo de BRAF e PD-L1 em seu pós-doutorado (processo FAPESP 2014/14267-1: Agentes antitumorais

potencialmente multialvos para melanoma: planejamento racional, síntese e ensaio biológico de novos derivados benzofuroxanos).

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral:

Investigar o papel biológico de MARCH-1 em células dendríticas, tanto em modelos experimentais de tumores, quanto em pacientes com câncer, buscando sua correlação com a progressão tumoral e com a resposta à imunoterapia, gerando conhecimento para o desenvolvimento de novos candidatos à fármacos para uso em oncologia.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Investigar a expressão de MARCH1 em células dendríticas de modelo murino de tumor de mama e em células dendríticas presentes em diferentes tumores humanos (mama, glioblastoma multiforme, melanoma);
2. Estudar a correlação da expressão de MARCH1 com o fenótipo funcional de células dendríticas em modelo de câncer de mama murino e com o de células dendríticas derivadas de monócitos humanos, de doadores saudáveis e de pacientes com câncer;
3. Determinar assinaturas transcricionais em células dendríticas de sangue, derivadas de monócitos e infiltrantes de tumores de pacientes tratados com imunoterapia (anti CTLA4, anti-PD-1 e anti-PD-L1 ou vacina baseada em células dendríticas alogeneicas) buscando a relevância dessa expressão com a resposta ao tratamento;
4. Desenvolver sistemas experimentais murinos que nos permitam aprofundar o conhecimento do mecanismo de ação das rotas bioquímicas identificadas ao longo do estudo.
5. Prospectar moléculas inovadoras com atividade sobre a função de MARCH1 com prova de conceito robusta para avançar em etapas de desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer que atuem na interface entre o as células tumorais e a modulação do sistema imune.
6. Testar essas moléculas no modelo de câncer de mama murino, sozinhas e em

combinação com anticorpos anti-CTLA4, anti-PD-1 e anti-PD-L1 e, *in vitro*, sobre células dendríticas humanas, derivadas de monócitos;

7. Proporcionar ao RS e a SP a oportunidade de desenvolver, a custo reduzido, tecnologia inovadora para a imunoterapia do câncer;
8. Proporcionar ao setor produtivo opções para desenvolver moléculas e tecnologias em parceria, incorporando-os em seus pipelines pré-clínicos e clínicos.

5. Plano de Trabalho:

Este estudo tem característica translacional, operando em **três frentes experimentais**:

1) análises em pacientes de tumor, recrutados junto a estudos clínicos de imunoterapia com anti-PD-1 e anti-PD-L1 para tratamento de tumor de mama; **2) modelos murinos *in vitro* e *in vivo*** para os mesmos tumores, de forma a aprofundar estudos mecanísticos a partir dos resultados de correlação que encontrarmos em estudos em pacientes; e **3) estudos de inibição enzimática**, incluindo os estudos de interação molecular *in silico* e posteriormente *in vitro*, para confirmação da atividade inibitória das molécula selecionadas.

Contribuição Esperada de Cada Equipe

As equipes envolvidas neste projeto são duas das únicas equipes do Brasil desenvolvendo projetos em imunoterapia tumoral. O trabalho do Dr. Barbuto, da USP, com terapia de células dendríticas tem ampla validação nacional e internacional, sendo pioneiro no país. O grupo da Dra. Cristina, atualmente na UFCSPA, tem tradição no estudo de células dendríticas e ativação de linfócitos T anti-tumorais, tendo mapeado a rota de ativação de MARCH-1 em um sistema de aloenxerto. Os dois grupos já tem colaborado anteriormente e produziram alguns dos dados preliminares apresentados na proposta. Neste projeto, o histórico de trabalho dos dois grupos converge de forma admirável para criar novas entidades moleculares em um tema de interesse mútuo, a modulação de células dendríticas para controlar o crescimento tumoral. O grupo de SP está estudando os efeitos da alteração da expressão de CD83, o regulador de MARCH1, em células dendríticas tumorais. A contribuição do grupo de SP vem da sua experiência com células dendríticas humanas e seu uso para imunoterapia oncológica.

A contribuição do grupo de Porto Alegre é a idéia principal, a hipótese de trabalho, e sua experiência com modelos tumorais murinos e células dendriticas *in vivo*. Assim, a contribuição esperada de cada grupo fica dentro de suas respectivas especialidades, de acordo com o plano de trabalho detalhado a seguir.

Participação de Cada Equipe na Proposta

A participação do grupo de Porto Alegre será a coordenação geral do estudo, agindo nas três frentes experimentais, mas principalmente nas frentes 2 e 3. Os modelos *in vitro* e *in vivo* de tumor de mama 4T1 são utilizados rotineiramente pelo grupo, que está preparando para publicação um manuscrito sobre os efeitos da terapia anti-PD-1 em células dendriticas, e outro sobre as interações *in cis* de PD-1 e PD-L1 nas células dendriticas. Ainda em Porto Alegre serão realizados os estudos *in silico* de desenho de moléculas. Enquanto isso, a principal colaboração do grupo de São Paulo será em sua especialidade, dentro da frente 1 – analisando a expressão de MARCH1 em células dendriticas de pacientes de câncer de mama, tratados ou não com imunoterapia; e interagindo com outro grupo da USP, do Dr. Helder Nakaya, para investigação de assinaturas moleculares nesses pacientes que envolvam MARCH1. Os estudos de pesquisa básica realizados pelos dois grupos gerarão novo conhecimento com potencial de publicação de alto impacto; e a interação SP-POA garante o teste pré-clínico em modelos murinos e humanos das drogas obtidas por estudos de ancoramento molecular e *virtual screening*.

Contribuição da parceria para o desenvolvimento científico e tecnológico do RS e SP

A imunoterapia oncológica representa hoje um mercado que mobiliza 98 bilhões de dólares mundialmente, com previsão de crescimento de aproximadamente 10% ao ano, ao menos até 2022 (Grilo and Mantalaris 2019). O Brasil, contudo, encontra-se atualmente alijado desse mercado, despreparado tecnologicamente para inserir-se na área dos monoclonais imunooncologicos; poucos imunologistas brasileiros trabalham na área de câncer ou de desenvolvimento de monoclonais. Finalmente, a competitividade nesse mercado hoje está na inovação: no surgimento de novas opções que expandam

o sucesso atual dessa terapia.

Nosso projeto traz uma ideia original, desenvolvida por grupos brasileiros, validada internacionalmente, mas que ainda necessita de pesquisa básica para validação de prova de conceito. O financiamento aqui é necessário para que possamos proporcionar ao RS e SP opções de acesso a tecnologias oncológicas e de custos reduzidos inovadores e nacionais. A médio e a longo prazo, a geração de propriedade intelectual prevista no projeto irá proporcionar ao setor produtivo opções para desenvolver moléculas e tecnologias em parceria, incorporando-os em seus pipelines pré-clínicos e clínicos.

6. Detalhamento da Metodologia

Dividimos em 5 as etapas que divisamos para a execução do projeto.

ETAPA 1. Análise da expressão de MARCH1 em pacientes com câncer de mama, tratados ou não com imunoterapia e estudos do efeito da sua modulação na progressão tumoral

Cronograma: Meses 01 – 18

Justificativa/Descrição : Para o estudo em **pacientes**, é importante salientar que o fluxo de recrutamento e preservação de material de pacientes em ensaios clínicos de investigação da resposta imune contra o tumor e de imunoterapia já é atualmente rotina no Laboratório do Dr. Barbuto, que conta também com bio-bancos aprovados para material dos pacientes de diferentes estudos. Os ensaios clínicos foram aprovados nas Comissões de Ética do ICB-USP e dos Hospitais colaboradores, e, para inclusão no presente estudo, os pacientes serão informados e seu material usado apenas após assinatura de um TCLE específico.

Serão coletados 10 mL de sangue de cada paciente, dos quais 1 mL será usado para extração de RNA total, preservado em RNA later. As células mononucleares serão separadas em gradiente de densidade e as células criopreservadas em soro fetal bovino com 10% de DMSO ou utilizadas imediatamente para diferenciação em células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DC). As amostras serão colocadas em tubos cônicos de 50 mL, diluídas 1:2 em salina tamponada com fosfato (PBS) e submetidas à

centrifugação sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus para obtenção de células mononucleares. O material passará por processos de centrifugação e lavagem e, em seu último ciclo de centrifugação o pellet celular será coletado. As células serão ressuspensas em meio AIM-V, colocadas em cultura e mantidas em estufa de CO₂ (5%) por 2h a 37° C, para aderência em placas de plástico. Após esse período, as células não-aderentes serão retiradas e as células aderentes serão cultivadas por 7 dias em meio de cultura AIM-V, contendo GM-CSF (PeproTech Inc.) e IL-4 (PeproTech Inc.), em estufa de CO₂ (5%) a 37° C para obtenção de DCs imaturas. Para obtenção de Mo-DCs maduras, no quinto dia de cultura, as células serão estimuladas com TNF- α na concentração de 50ng/mL (PeproTech Inc.). Estas células, como as DCs imaturas, serão recuperadas das culturas no sétimo dia, utilizando-se PBS gelado, lavadas e sua viabilidade testada por exclusão com Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich). De pacientes submetidos aos diferentes protocolos de tratamento, serão realizadas coletas antes do início dos mesmos e a intervalos de 1, 2 e 4 meses.

Também amostras tumorais de pacientes incluídos no protocolo serão analisadas. Para tanto, as amostras serão dissociadas em suspensões de células isoladas. Os fragmentos tumorais serão colocados imediatamente em meio de cultura estéril (RPMI 1640), contendo antibióticos e antimicóticos, e transportados ao laboratório onde os espécimes tumorais serão recortados, com uso de bisturi, em fragmentos de, no máximo, 1 mm³. Estes serão, então, submetidos à digestão por collagenase (tipo VIII, 0,56 mg/mL) em 5-10 mL de meio RPMI-1640 por grama de tecido (a 37° C). As suspensões celulares assim obtidas serão filtradas em gaze, para remoção dos restos de tecido. Posteriormente, as células serão contadas, marcadas com anti-CD45 microbeads (Kit Miltenyi) e isoladas por coluna de separação magnética positiva. Estas serão as células utilizadas para análise.

Para análise por citometria de fluxo, as subpopulações de linfócitos e células mielóides do sangue e infiltrantes de tumores e as Mo-DC serão analisadas. Para análise de cada população (subpopulações de linfócitos T, DC sanguíneas, Mo-DC) serão usados os marcadores adequados e, especialmente, para as células dendríticas, PD-L1, CD83, CD80, CD86 e HLA-DR, além de MARCH1. Quando possível (dependendo do número de células obtidas dos pacientes), das amostras do sangue serão separadas as DC circulantes - por FACS (FACS Aria) - e usadas para ensaios funcionais *ex vivo*. Com os citômetros disponíveis (FACS Canto, LSR Fortessa e FACS Aria) podemos analisar

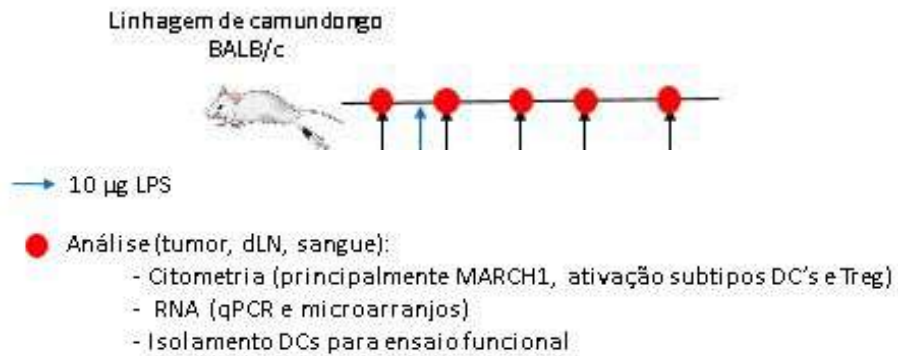
até 20 parâmetros. O RNA será processado para análise de microarranjos buscando assinaturas de ativação e supressão imunes que se correlacionem com a expressão de MARCH1. Os dados gerados serão analisados em parceria com o grupo de Porto Alegre (Dr. Mauricio Rigo e doutorando Matheus Guthierres)

ETAPA 2. Análise da expressão de MARCH1 em modelos tumorais murinos e estudos do efeito da sua modulação na progressão tumoral

Cronograma: Meses 03 – 20

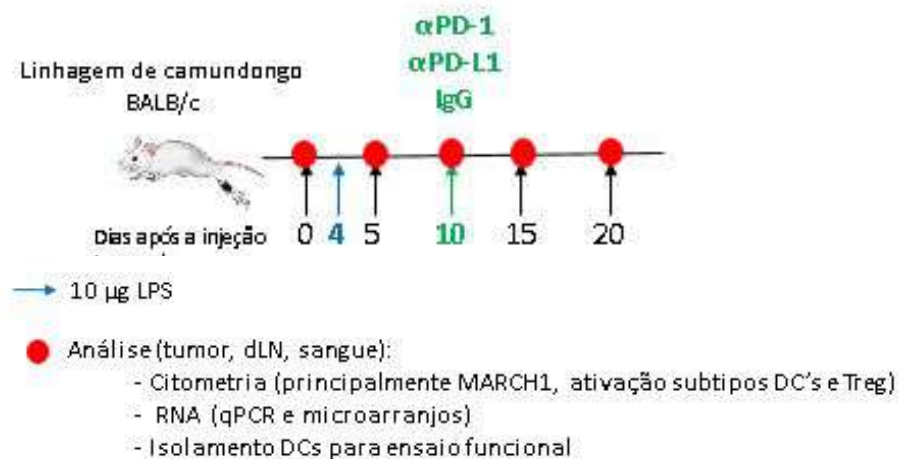
Justificativa/Descrição: Utilizando **modelos murinos de tumores**, faremos avaliação do efeito da expressão e modulação de MARCH1 na ativação de células dendríticas, na progressão do tumor e diferenciação de Tregs. Utilizaremos o modelo tumoral de tumor de mama 4T1. Há um importante elemento de originalidade nesta etapa porque ainda não foi relatado o efeito direto da modulação da expressão de MARCH1 sobre células dendríticas infiltrantes do tumor e a consequência sobre a geração de Tregs. Além disso, a etapa é importante para corroborar as correlações encontradas em células dendríticas de pacientes, e aprofundar estudos mecanísticos.

Células da linhagem 4T1 inoculadas em camundongos BALB/c e os níveis de MARCH1 e o grau de ativação das células dendríticas será avaliado tanto nas células do microambiente tumoral como nas células dendríticas do sangue e do linfonodo drenante, que serão analisadas por citometria de fluxo, em animais divididos em grupos a serem eutanasiados em intervalos de 0, 5, 10, 15 e se possível 30 dias. Em paralelo, será avaliado o número de Tregs, no infiltrado tumoral, bem como a serão caracterizadas as sub-populações de linfócitos e células mielóides, e especialmente as células dendríticas, por citometria de fluxo. Será coletado RNA das células de cada compartimento (tumor, linfonodo e sangue) que será posteriormente analisado por microarranjos, comparando achados com o encontrado no material dos pacientes. As células dendríticas totais serão purificadas utilizando colunas magnéticas de CD11c, e ensaios funcionais de ativação de linfócitos T serão realizados, investigando o impacto da expressão de MARCH-1 sobre a sua função.



De acordo com o cálculo amostral de $n=8$ animais por grupo, o total de animais BALB/c para esse experimento é de 40 animais, e será realizado em duplicata experimental totalizando **80 animais BALB/c**.

Em alguns experimentos, os animais serão tratados ou não com anti-PD-1 e anti-PD-L1, e as mesmas análises serão realizadas antes e depois do tratamento com esses imunoterápicos, investigando como essa terapia interfere ou se beneficia dos níveis de MARCH1.



De acordo com o cálculo amostral de $n=8$ animais por grupo, o total de animais BALB/c para esse experimento é de 120 animais, e será realizado em duplicata experimental totalizando **208 animais BALB/c**.

Temos utilizado com sucesso (documentado em vários artigos publicados) como modelo *in vitro* de estudos de apresentação de antígenos ensaios em que células T

OT-I e OT II, marcadas com CFSE, são colocadas em cultura com DCs murinas purificadas e ainda o antígeno, ovalbumina. A posterior análise de proliferação T por diluição do corante mede indiretamente a capacidade de apresentação de antígenos para células T CD8+ e T CD4+, respectivamente. Análise por citometria de fluxo de marcadores de ativação em células T e dendríticas será realizada, acompanhando os resultados de proliferação, bem como produção de citocinas.

Os mesmos modelos serão utilizados posteriormente para testes *in vivo* e *in vitro* dos inibidores selecionados nas etapas 3 e 4 (ver a seguir).

ETAPA 3. Avaliação estrutural *in silico* e design de inibidores de MARCH1 baseado na estrutura do alvo (*virtual screening*)

Cronograma: Meses 01 - 12

Justificativa/Descrição: Realizaremos a modelagem de estruturas de MHC-II, como por exemplo o HLA-DRB04*01:01, que interagem especificamente com MARCH1. Para os estudos de ancoramento molecular serão usadas as coordenadas espaciais, oriundas de cristalografia e já disponibilizadas para a porção enzimática RING-CH presente no MARCH1(PDB ID: 2D8S). Ainda, para a busca de compostos de baixo peso molecular, a identificação de estruturas com maior possibilidade de ligar-se ao alvo molecular (*virtual screening*) será inicializada com o auxílio de programas específicos e usando bancos de dados de ligantes disponíveis (ZINC, BindingDB, PubChem, SuperNatural, ChEMBL). A flexibilidade da relação sítio-ativo/ligantes de MARCH1 versus ligantes avaliados será considerada usando estratégias consagradas na literatura e outras a serem investigadas no contexto de “conformational ensemble” (Boehr et al., 2009).

ETAPA 4. Implementação e validação do ensaio para avaliação da inibição da atividade enzimática de ligase de ubiquitina

Cronograma: Meses 06 - 18

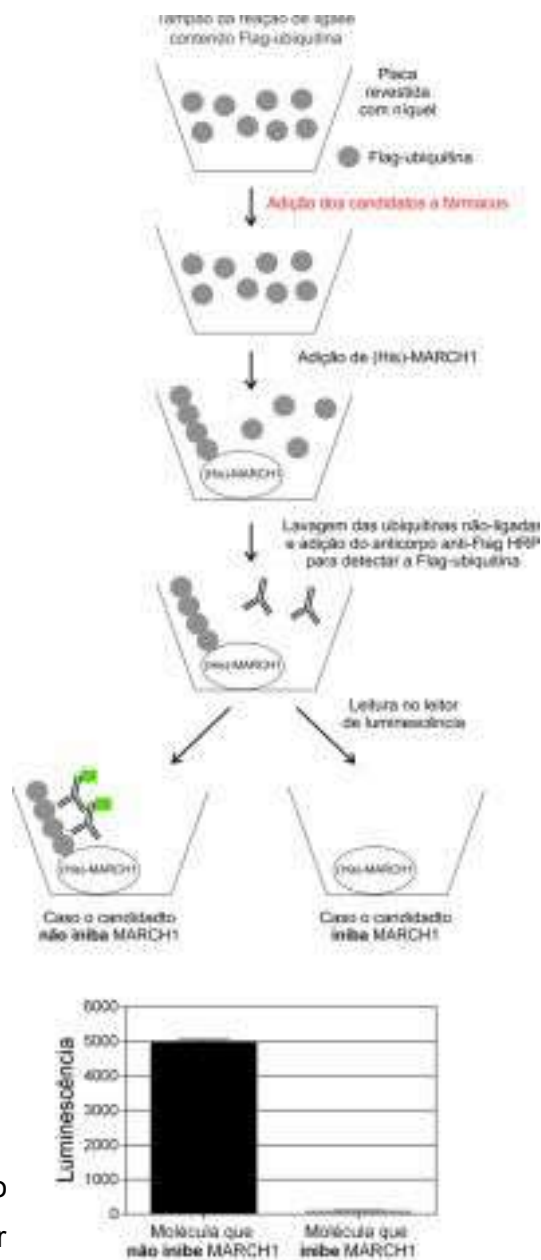
Justificativa/Descrição:

A avaliação da atividade enzimática isolada é fundamental para desenhar ligantes específicos para a MARCH1 excluindo outros alvos moleculares. Primeiramente, utilizaremos um método *in vitro*, colorimétrico através de espectrofotômetro, seguindo protocolo descrito na literatura (Eletr et al. 2005). Nesse ensaio, a enzima MARCH1 humana produzida de forma recombinante

será imobilizada em uma placa de 96 poços, e sua atividade de ligase de ubiquitinas será avaliada através a incorporação de moléculas de ubiquitina marcadas com Flag, formando uma cadeia poliubiquitina na própria MARCH1, como resultado de uma auto ubiquitinação. A incorporação de ubiquitinas será detectada utilizando um anticorpo anti-Flag conjugado com HRP(Huang et al. 2005). Para isso, a MARCH1 e a Flag-ubiquitina humanas serão produzidas de forma recombinante. Brevemente, o gene da MARCH1 humana (Gene ID: 55016) será sintetizado e clonado no plasmídeo pET 9. A ubiquitina será fusionada com Flag utilizando o vetor pFlag-Mac vector da Sigma.

Figura 7. Ensaio in vitro para avaliação da atividade de ligase de ubiquitina de MARCH1 através da auto ubiquitinação

A expressão e purificação de ambas proteínas serão padronizadas em *E. coli* BL21. A MARCH1 gerada terá uma cauda de histidina e será denominada (His)-MARCH1. Posteriormente, a atividade de cada proteína recombinante obtida será avaliada segundo (Ohta et al., 1999). Um resumo do ensaio pode ser observado na Figura 7 acima. Imobilizaremos a (His)-MARCH1 em uma placa de 96 poços revestida com níquel.



Uma vez estabelecido este ensaio, os compostos identificados por ancoramento ou obtidos pelo *screening* das bibliotecas virtuais serão sintetizados de forma terceirizada, e testados nesse ensaio, restringindo assim o número de moléculas que será depois efetivamente testado em sistemas *in vitro* e *in vivo*, nos modelos descritos acima.

ETAPA 5. Avaliação do efeito da modulação de MARCH1 na ativação de células dendríticas e diferenciação de Tregs murinas e humanas

Cronograma: Meses 12 - 24

Justificativa/Descrição: Há um importante elemento de originalidade nesta etapa porque ainda não foi relatado o efeito direto do MARCH1 sobre células dendríticas infiltrantes do tumor e a consequência sobre a geração de Tregs. Além disso, a etapa é importante para corroborar as etapas 1 e 2 do projeto e confirmar a utilidade e eficiência do conceito inovador do uso da inibição de MARCH1 para tratamento. As evidências coletadas através destes experimentos servirão não somente para testar mais efeitos *in vivo* de

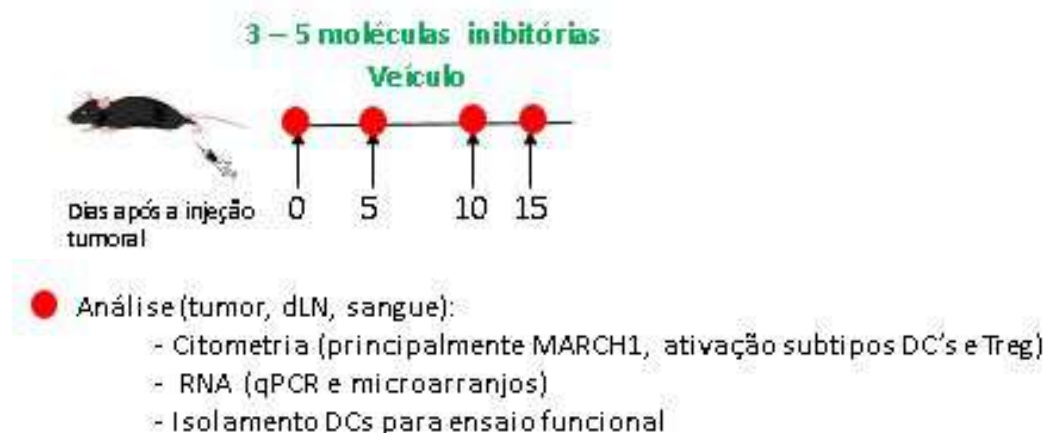
novos ligantes sintetizados neste projeto, mas também para comprovar um novo mecanismo de ação, via inibição da ação de MARCH1, para induzir o sistema imunológico a tratar o câncer.

Será estabelecido um modelo murino em que células da linhagem de melanoma B16F10 serão inoculadas em camundongos C57BL/6 e os níveis de MARCH1 e o grau de ativação das células dendríticas será avaliado tanto nas células tumorais como nas células dendríticas infiltrantes do tumor e linfonodo drenante, que serão analisadas por citometria de fluxo, em animais divididos em grupos a serem eutanasiados em intervalos de 5, 10 e 15 dias. Em paralelo, será avaliado o número de Tregs.



De acordo com o cálculo amostral de $n=8$ animais por grupo, o total de animais C57BL/6 para esse experimento é de 32 animais, e será realizado em duplicata experimental totalizando **64 animais C57BL/6**.

No mesmo modelo estabelecido, neste estágio de pesquisa, serão testados entre 3 a 5 ligantes candidatos a fármacos selecionados dos experimentos descritos acima. Com isso, se testará se os compostos inibem a atividade de MARCH1, aumentam os níveis de MHCII na superfície e se diminuem o tamanho dos tumores.



De acordo com o cálculo amostral de n=8 animais por grupo, o total de animais C57BL/6 para esse experimento é de **152 animais C57BL/6**. Não será realizada uma duplicata experimental.

Como prova de conceito, será transfectada a linhagem de células dendríticas JAWSII de forma estável com um vetor expressando MARCH1. Para isso, o gene já descrito anteriormente será clonado no vetor pcDNA3.1, as células serão transfectadas com esse clone utilizando Lipofectamine 3000, e posteriormente selecionadas com o antibiótico G418 (Neomicina). A expressão de MARCH1 pela linhagem transformada será quantificada por PCR quantitativo, utilizando *primers* disponíveis comercialmente e comparada com a expressão basal de células não transfectadas. Com isso, realizaremos experimentos de co-injeção de células tumorais com células dendríticas (Lopes et al., 2014) transfectadas ou não, e será acompanhado o crescimento *in vivo* do tumor por duas semanas. A previsão é que as células dendríticas transfectadas irão fazer com que o tumor cresça de maneira mais agressiva e isso induza a formação/recrutamento de Tregs, o que será também analisado tanto no infiltrado tumoral, quanto no linfonodo drenante, por citometria de fluxo, em animais divididos em grupos a serem eutanasiados em intervalos de 5, 10 e 15 dias.



- Análise (tumor, dLN, sangue):
 - Citometria (principalmente MARCH1, ativação subtipos DC's e Treg)

De acordo com o cálculo amostral de n=8 animais por grupo, o total de animais C57BL/6 para esse experimento é de 48 animais, e será realizado em duplicata experimental totalizando **96 animais C57BL/6**.

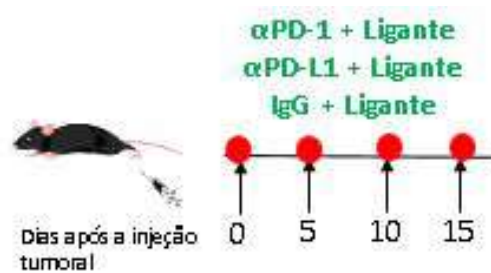
No mesmo modelo estabelecido, neste estágio de pesquisa, serão testados com os dois melhores ligantes candidatos a fármacos selecionados dos experimentos descritos acima.



- Análise (tumor, dLN, sangue):
 - Citometria (principalmente MARCH1, ativação subtipos DC's e Treg)

De acordo com o cálculo amostral de n=8 animais por grupo, o total de animais C57BL/6 para esse experimento é de 72 animais, e será realizado em duplicata experimental totalizando **144 animais C57BL/6**.

Em adição, testaremos a combinação do melhor ligante com imunoterápicos anti-PD-1 e anti-L1.



- Análise (tumor, dLN, sangue):
 - Citometria (principalmente MARCH1, ativação subtipos DC's e Treg)

De acordo com o cálculo amostral de $n=8$ animais por grupo, o total de animais C57BL/6 para esse experimento é de 96 animais, e será realizado em duplicata experimental totalizando **192 animais C57BL/6**.

Em paralelo, os mesmos candidatos serão avaliados sobre Mo-DC derivadas de pacientes. Como previamente descrito, estas células, quando obtidas de pacientes com câncer, apresentam um desvio funcional e tendem a estimular, preferencialmente, linfócitos Treg (Ramos et al., 2012). Assim, uma avaliação da capacidade de reversão desta tendência pelo tratamento das células dos pacientes com os candidatos a fármacos viria a reforçar seu possível papel terapêutico *in vivo*, assim como abrir a possibilidade de seu uso em estratégias de tratamento baseadas em Mo-DC dos pacientes.

Total de animais solicitados para este projeto, adicionando 20% levando em consideração que quando há a indução tumoral em camundongos uma média de 20% não sobrevivem ao final do experimento. Dessa forma, como medida de segurança adicionamos 20% a mais.

TOTAL:

		Adição de 20%
BALB/c	288	345
C57BL/6	616	739

7. Resultados esperados

7.1 Solicitar **2 (dois) pedido de patente de alta competitividade**, precedidas de busca de anterioridade especializada e contemplando aspectos de novidade, atividade inventiva e aplicabilidade diagnóstica preditiva/prognóstica e, preferencialmente, respaldada por resultados *in vivo* ou corroborado biomarcador com amostras clínicas preliminares;

7.2. Publicar **3 (três) trabalhos em periódicos “peer reviewed”** de alto impacto na área de oncologia;

7.3. Formar **2 (dois) profissionais** com mestrado ou doutorado na área da biologia do câncer focada na descoberta/desenvolvimento de novos fármacos.

8. Orçamento Detalhado 5.000,00 Kits de separação celular

8.1. Solicitado à FAPERGS 3.000,00

Descrição do Solicitado a **FAPERGS** Valor
aproximado USD Valor aproximado R\$

CONSUMO 8.000,00 (b) (R\$ 32.000,00) (a) 19.000,00
Anticorpos monoclonais para citometria **(a+b) 49.000,00**

Meios de cultura, sais e suplementos 5.000,00 Plásticos descartáveis 4.000,00

Reagentes para biologia molecular 8.000,00 **TERCEIROS (c+d) 15.000,00**

SERVIÇOS DE TRANSPORTE (d)(R\$ 12.000,00)
(Amostras) (c) 3.000,00

Serviços de Transcriptômica 3.000,00

SOFTWARE (e+f) 12.000,00

Software Flowjo (Licença) 2.500,00

Assinaturas (2 anos) GraphPad Prism e (e) 10.000,00
Illustrator (f) 2.000,00

MATERIAL PERMANENTE 23.000,00

Centrifuga (3 rotores: 15 mL, 20 mL, 1.5 mL) 6.000,00

Mini-centrifuga spin bancada 1.500,00 pHmetro de bancada 1.500,00 Balança analítica 6.000,00

Computador para análises de 8.000,00
ancoramento molecular e bioinformática

TOTAL SOLICITADO 99.000,00

8.2. Solicitado à FAPESP 4,052.16

Descrição	Valor aproximado USD	Valor aproximado R\$
Anticorpos monoclonais para citometria		
6,700.00 Kits de separação celular		

Meios de cultura, sais e suplementos 15.000,00 Plásticos descartáveis 25.000,00

Citocinas recombinantes 3,300.00 Reagentes para biologia molecular 5,300.00

Subtotal Material de consumo 40.000,00

19,352,16 (R\$ 72.377,08)

SERVIÇOS DE CITOMETRIA 13.000,00 SERVIÇOS DE TRANSPORTE

(Amostras) 5.000,00 **Subtotais** 19,300.00 58.000,00

TOTAL (R\$) (1 USD = R\$ 3,74) 130.377,08

Descrição do Solicitado a **FAPESP** Valor 6,700.00 Kits de separação celular

aproximado USD 4,000.00

Anticorpos monoclonais para citometria Valor aproximado R\$

Meios de cultura, sais e suplementos 15.000,00 Plásticos descartáveis 25.000,00

Citocinas recombinantes 3,300.00 Reagentes para biologia molecular 5,300.00

Subtotal Material de consumo 40.000,00

19,300.00 (R\$ 72.182,00)

SERVIÇOS DE CITOMETRIA 13.000,00 SERVIÇOS DE TRANSPORTE (Amostras)

5.000,00 **Subtotais** 19,300.00 58.000,00

TOTAL (R\$) (1 USD = R\$ 3,74) 130.182,00

Contrapartida da Instituição RS: A UFCSPA construiu um prédio só de laboratórios, todos eles com uma filosofia de compartilhamento de espaços, criando uma excelente infraestrutura para os pesquisadores, contando com apoio técnico e cada um dos laboratórios multiusuários. Este ano, a UFCSPA designou um laboratório de 100 m² apenas para imunoterapia, sob coordenação da proponente, que o equipou parcialmente. O presente projeto será desenvolvido ali, contando com a estrutura comum de toda a Universidade.

Todos os experimentos realizados na UFCSPA se iniciarão após o início das atividades presenciais na Universidade.

9. Bibliografia

- Baleeiro, R. B., and J. A M Barbuto. 2008. "Local Secretion/Shedding of Tumor-Derived CD83 Molecules as a Novel Tumor Escape Mechanism." *Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.04.005>.
- Baleeiro, R. B., P. C. Bergami-Santos, M. Y. Tomiyoshi, J. L. Gross, F. Haddad, C. A.L. Pinto, F. A. Soares, R. N. Younes, and J. A.M. Barbuto. 2008. "Expression of a Dendritic Cell Maturation Marker CD83 on Tumor Cells from Lung Cancer Patients and Several Human Tumor Cell Lines: Is There a Biological Meaning behind It?" *Cancer Immunology, Immunotherapy*. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0344-x>.
- Baleeiro, Renato B., Karl Heinz Wiesmüller, Lars Dähne, Jürgen Lademann, José A. Barbuto, and Peter Walden. 2013. "Direct Activation of Human Dendritic Cells by Particle-Bound but Not Soluble MHC Class II Ligand." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063039>.
- Baravalle, G., H. Park, M. McSweeney, M. Ohmura-Hoshino, Y. Matsuki, S. Ishido, and J.-S. Shin. 2011. "Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells." *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101643>.
- Barbuto JAM. 2013. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? *Immunotherapy*. 5(2):105–7
- Borges, Thiago J., Benjamin J. Lang, Rafael L. Lopes, and Cristina Bonorino. 2016. "Modulation of Alloimmunity by Heat Shock Proteins." *Frontiers in Immunology* 7 (AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00303>.
- Borges, Thiago J., Naoka Murakami, Felipe D. Machado, Ayesha Murshid, Benjamin J. Lang, Rafael L. Lopes, Laura M. Bellan, et al. 2018. "March1-Dependent Modulation of Donor MHC II on CD103+ Dendritic Cells Mitigates Alloimmunity." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05572-z>.
- Borges, Thiago J., Bárbara N. Porto, César A. Teixeira, Marcelle Rodrigues, Felipe D. Machado, Ana Paula Ornaghi, Ana Paula D. de Souza, et al. 2010. "Prolonged Survival of Allografts Induced by Mycobacterial Hsp70 Is Dependent on CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *PLoS ONE* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014264>.
- Borges, Thiago J., Lotte Wieten, Martijn J.C. Van Herwijnen, Femke Broere, Ruurd Van derZee, Cristina Bonorino, and Willem Van Eden. 2012. "The Anti-Inflammatory Mechanisms of Hsp70." *Frontiers in Immunology* 3 (MAY): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00095>.
- Clavijo-Salomon, Maria A., Rodrigo N. Ramos, Alexandre Crippa, Celia R. Pizzo, Patricia C. Bergami-Santos, and Jose Alexandre M. Barbuto. 2014. "Monocyte-Derived Dendritic Cells

- Reflect the Immune Functional Status of a Chromophobe Renal Cell Carcinoma Patient: Could It Be a General Phenomenon?" *Cancer Immunology, Immunotherapy*.
<https://doi.org/10.1007/s00262-014-1625-9>.
- Corcoran, Kathleen, Maurice Jabbour, Candida Bhagwandin, Martin J. Deymier, Debra L. Theisen, and Lonnie Lybarger. 2011. "Ubiquitin-Mediated Regulation of CD86 Protein Expression by the Ubiquitin Ligase Membrane-Associated RING-CH-1 (MARCH1)." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204040>.
- Detanico, T., L. Rodrigues, A. C. Sabritto, M. Keisermann, M. E. Bauer, H. Zwickey, and C. Bonorino. 2004. "Mycobacterial Heat Shock Protein 70 Induces Interleukin-10 Production: Immunomodulation of Synovial Cell Cytokine Profile and Dendritic Cell Maturation." *Clinical and Experimental Immunology* 135 (2): 336–42.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02351.x>.
- Drake, C. G. 2012. "Combination Immunotherapy Approaches." In *Annals of Oncology*.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds262>.
- Eletr, Ziad M., Danny T. Huang, David M. Duda, Brenda A. Schulman, and Brian Kuhlman. 2005. "E2 Conjugating Enzymes Must Disengage from Their E1 Enzymes before E3-Dependent Ubiquitin and Ubiquitin-like Transfer." *Nature Structural and Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nsmb984>.
- Grilo, António L, and A Mantalaris. 2019. "The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market." *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>.
- Huang, Jianing, Julie Sheung, Guoqiang Dong, Christina Coquilla, Sarkiz Daniel-Issakani, and Donald G. Payan. 2005. "High-Throughput Screening for Inhibitors of the E3 Ubiquitin Ligase APC." *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)99049-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)99049-6).
- Kambayashi, Taku, and Terri M. Laufer. 2014. "Atypical MHC Class II-Expressing Antigen Presenting Cells: Can Anything Replace a Dendritic Cell?" *Nature Reviews Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/nri3754>.
- Kelner, Katrina L. 2008. "T Regulation of Dendritic Cells." *Science Signaling*, 2008.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.141ec358>.
- Khalil, Danny N., Eric L. Smith, Renier J. Brentjens, and Jedd D. Wolchok. 2016. "The Future of Cancer Treatment: Immunomodulation, CARs and Combination Immunotherapy." *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.25>.
- Lipson, Evan J., and Charles G. Drake. 2011. "Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma." *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR11-1595>.
- Liu, Haiyin, Justine D. Minter, and Jose A. Villadangos. 2019. "MARCH Ligases in Immunity." *Current Opinion in Immunology* 58 (Box 1): 38–43.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.03.001>.
- Lopes, Rafael L., Thiago J. Borges, Jessica F. Araújo, Nathana G. Pinho, Letícia S. Bergamin, Ana Maria O. Battastini, Stéfanie P. Muraro, Ana Paula D. Souza, Rafael F. Zanin, and Cristina Bonorino. 2014. "Extracellular Mycobacterial DnaK Polarizes Macrophages to the M2-like Phenotype." *PLoS ONE* 9 (11): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113441>.
- Lopes, Rafael L., Thiago J. Borges, Rafael F. Zanin, and Cristina Bonorino. 2016. "IL-10 Is Required for Polarization of Macrophages to M2-like Phenotype by Mycobacterial DnaK

- (Heat Shock Protein 70)." *Cytokine* 85: 123–29.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.018>.
- Mahoney, Kathleen M., Paul D. Rennert, and Gordon J. Freeman. 2015. "Combination Cancer Immunotherapy and New Immunomodulatory Targets." *Nature Reviews Drug Discovery*.
<https://doi.org/10.1038/nrd4591>.
- Metzger, Meredith B., Jonathan N. Pruneda, Rachel E. Klevit, and Allan M. Weissman. 2014. "RING-Type E3 Ligases: Master Manipulators of E2 Ubiquitin-Conjugating Enzymes and Ubiquitination." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.026>.
- Motta, Adriana, Carla Schmitz, Luiz Rodrigues, Flávia Ribeiro, Cesar Teixeira, Thiago Detanico, Carla Bonan, Heather Zwickey, and Cristina Bonorino. 2007. "Mycobacterium Tuberculosis Heat-Shock Protein 70 Impairs Maturation of Dendritic Cells from Bone Marrow Precursors, Induces Interleukin-10 Production and Inhibits T-Cell Proliferation in Vitro." *Immunology* 121 (4): 462–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02564.x>.
- Neves, Andreia R., Luis Felipe C. Ensina, Luciene B. Anselmo, Katia R.M. Leite, Antonio C. Buzaid, Luiz H. Câmara-Lopes, and José Alexandre M. Barbuto. 2005. "Dendritic Cells Derived from Metastatic Cancer Patients Vaccinated with Allogeneic Dendritic Cell-Autologous Tumor Cell Hybrids Express More CD86 and Induce Higher Levels of Interferon-Gamma in Mixed Lymphocyte Reactions." *Cancer Immunology, Immunotherapy*.
<https://doi.org/10.1007/s00262-004-0550-8>.
- Oh, Jaehak, Nan Wu, Günther Baravalle, Benjamin Cohn, Jessica Ma, Bryan Lo, Ira Mellman, Satoshi Ishido, Mark Anderson, and Jeoung-Sook Shin. 2013. "MARCH1-Mediated MHCII Ubiquitination Promotes Dendritic Cell Selection of Natural Regulatory T Cells." *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20122695>.
- Pardoll, Drew M. 2012. "The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 252–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- Pinho, Mariana Pereira, Isabella Katz Migliori, Elizabeth Alexandra Flatow, and José Alexandre M. Barbuto. 2014. "Dendritic Cell Membrane CD83 Enhances Immune Responses by Boosting Intracellular Calcium Release in T Lymphocytes." *Journal of Leukocyte Biology*.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0413239>.
- Pinho, Mariana Pereira, Bala Sai Sundarasetty, Patricia Cruz Bergami-Santos, Karen Steponavicius-Cruz, Adilson Kleber Ferreira, Renata Stripecke, and José Alexandre M. Barbuto. 2016. "Dendritic-Tumor Cell Hybrids Induce Tumor-Specific Immune Responses More Effectively than the Simple Mixture of Dendritic and Tumor Cells." *Cytotherapy*.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.01.005>.
- Postow, Michael A., Margaret K. Callahan, and Jedd D. Wolchok. 2015. "Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy." *Journal of Clinical Oncology*.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358>.
- Ramos RN, Chin LS, Santos Dos APSA, Bergami-Santos PC, Laginha F, Barbuto JAM. 2012. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 92(3):673–82
- Ribas, Antoni, and Jedd D. Wolchok. 2018. "Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>.

- Souza, Ana Paula De, and Cristina Bonorino. 2009. "Mechanisms of Tumor Immune Suppression," 1317–32. <https://doi.org/10.1586/ERA.09.88>.
- Thibodeau, Jacques, Marie Claude Bourgeois-Daigneault, Gabrielle Huppé, Jessy Tremblay, Angélique Aumont, Mathieu Houde, Eric Bartee, et al. 2008. "Interleukin-10-Induced MARCH1 Mediates Intracellular Sequestration of MHC Class II in Monocytes." *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.200737902>.
- Tze, Lina E., Keisuke Horikawa, Heather Domaschenz, Debbie R. Howard, Carla M. Roots, Robert J. Rigby, David A. Way, et al. 2011. "CD83 Increases MHC II and CD86 on Dendritic Cells by Opposing IL-10–Driven MARCH1-Mediated Ubiquitination and Degradation." *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20092203>.
- Webber, Andrea L., Erin Murphy, Andrey Loboda, Nageatte Ibrahim, Antoni Ribas, Tanguy Y. Seiwert, Patrick A. Ott, et al. 2018. "Pan-Tumor Genomic Biomarkers for PD-1 Checkpoint Blockade–Based Immunotherapy." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aar3593>.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**Biodegradação de plástico por *Galleria mellonella*: caracterização do processo e
aplicação biotecnológica**

Projeto de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências

Andressa Fernandes Pivato

Orientadora: Prof^a Dr^a Danielle da Silva Trentin

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Seixas

Porto Alegre

2021

Biodegradação de plástico por *Galleria mellonella*: caracterização do processo e aplicação biotecnológica

Aluna: MSc. Andressa Fernandes Pivato

Orientadora: Prof^a Dr^a Danielle da Silva Trentin

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Seixas

Colaboradores da UFCSPA:

- Dr^a Janira Prichula: Realiza pós-doutorado e é técnica de laboratório da Microbiologia. Auxiliará nas análises de biologia molecular.

Colaboradores externos à UFCSPA:

Ressalta-se que nosso grupo de pesquisa já possui em colaboração com os grupos abaixo citados:

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Escola Politécnica, Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR)

- Prof^a Dr^a Rosane A. Ligabue e Prof^a Dr^a Jeane E. A. Lima: Contribuirão na avaliação da biodegradação de materiais poliméricos através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de infravermelho.

- MSc. Gabriela M. Miranda: Atualmente é aluna de doutorado. Contribuirá na realização das análises físico-químicas de amostras de materiais plásticos e biológicos acima citadas.

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM)

- Prof^a Dr^a Denise Brentan Silva: Desenvolverá a avaliação por técnicas hífenadas de cromatografia e espectrometria de massas de metabólitos de biodegradação de plástico presentes em amostras biológicas (análise metabolômica).

Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM), Departamento de Química y Centro de Biotecnología Daniel Alkalay Lowitt, Valparaíso, Chile.

- Dr^a. Beatriz Cámara: Pesquisadora científica e MSc. Andrés Cumsille: Atualmente é aluno de doutorado. Ambos contribuirão nas análises de dados gerados sobre o sequenciamento do gene *rRNA 16S* bacteriano (análise de dados metagenômicos).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana.

- Prof. Dr. Alexandre José Macedo: Colaboração para escalonamento dos ensaios de biodegradação de PE com micro-organismos e utilização de reator em escala piloto.

Além disso, com o desenvolvimento deste projeto, pretende-se propor colaboração com a empresa de base biotecnológica mencionada a seguir:

Befer Agroindustrial e Comercial Ltda - Empresa incubada na Incubadora Empresarial do Centro de Biotecnologia (IE-CBiot) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - https://ossopim.com.br/?page_id=310

- Edmundo Fernando Amaral da Silva: Graduado em Gestão em Negócios Internacionais (Universidade do Vale do Rio dos Sinos) e em Tecnologia em Alimentos (UFCSPA). Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em aproveitamento de subprodutos. A colaboração tem como intuito auxiliar na avaliação do potencial de aplicação biotecnológica de larvas de *G. mellonella* como fonte nutricional para animais.

Vigência: agosto/2021 a agosto/2025

Fontes de financiamento: Serrapilheira (grant Serra-1811-26226) e INCT-Entomologia Molecular.

ODs a que se vincula: 3, saúde e bem-estar; 9 indústria, inovação e infraestrutura; 11 cidades e comunidades sustentáveis; 14 vida na água; 15 vida terrestre.
http://www.agenda2030.org.br/os_ods/

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
Resumo Leigo.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. METODOLOGIA	14
3.1 MATERIAIS	14
3.2 ESTUDO DA METABOLIZAÇÃO DO PE POR LARVAS DE <i>G. mellonella</i> E SUA DEPENDÊNCIA COM A MICROBIOTA	14
3.2.1 Análises físico-química para detecção de PE e/ou produtos de biodegradação	15
3.3 ESTUDO SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS E BIODEGRADADORES DE PE PRESENTES NA MICROBIOTA LARVAL	16
3.3.1 Identificação taxonômica de micro-organismos degradadores de PE	17
3.4 BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS PLÁSTICOS EM ESCALA PILOTO: AVALIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E LARVAS VIVAS.....	18
3.4.1 Avaliação de micro-organismo biodegradantes em escala piloto	18
3.4.2 Avaliação de larvas de <i>G. mellonella</i> após processamento de resíduos plásticos como fonte nutricional para alimentação animal	18
4. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.....	18
5. POTENCIAIS DESAFIOS PARA EXECUÇÃO DA PROPOSTA	19
6. CRONOGRAMA	19
7. ORÇAMENTO	20

REFERÊNCIAS	21
ANEXO I:.....	26

ABREVIATURAS

PE: polietileno

PS: poliestireno

PEAD: PE de alta densidade

PEBD: PE de baixa densidade

FAO: Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

OMS: Organização Mundial da Saúde

SDS: Dodecilsulfato de sódio

LCFBM: Liquid Carbon Free Basal Medium (Meio líquido basal isento de carbono)

LCFBA: Liquid Carbon Free Agar Medium (Meio sólido basal isento de carbono)

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)

SEM-FEG-DES: Scanning Electron Microscopy with Field Emission coupled with Dispersive Energy Spectroscopy (Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo juntamente acoplada a espectroscopia de energia dispersiva)

LC-DAD-MS: Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detection and Mass Spectrometry; (Cromatografia líquida acoplada à detector de arranjo de diodos e espectrometria de massa)

CG-MSRI: Gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry (Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas de razão isotópica)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RESUMO

Em 2019, 368 milhões de toneladas de plástico foram produzidas no mundo, sendo 30% atribuído ao polietileno (PE). Características físico-químicas desse polímero o tornam inerte e resistente à biodegradação. Assim, o acúmulo de plásticos na natureza traz danos à vida, e estudos visando alternativas ao gerenciamento desses resíduos ganham destaque. A capacidade de larvas do inseto *Galleria mellonella* em biodegradar PE, a uma taxa superior às já descritas para micro-organismos, foi reportada em 2017. No entanto, o entendimento do processo de digestão de polímeros por este animal ainda é limitado. Este projeto visa caracterizar a biodegradação de PE por larvas de *G. mellonella* e avaliar a aplicação de (i) micro-organismos provenientes da microbiota das larvas e (ii) de larvas vivas na biodegradação de resíduos plásticos em escala piloto, assim como o aproveitamento destas larvas como fonte nutricional. Para isso, sítios corporais de larvas alimentadas com diferentes dietas (PE, celulose, cera de abelha e dieta laboratorial, ou em jejum) serão submetidos às análises físico-químicas (FTIR, MEV-FEG-EDS e LC-DAD-MS). Para avaliar o envolvimento da microbiota, serão incluídos grupos de animais livres de microbiota (tratados com antimicrobianos ou obtidos por cultura axênica), será também realizada análise metagenômica, pelo sequenciamento do gene *rRNA 16S* de bactérias intestinais. Micro-organismos da microbiota larval capazes de crescer com PE como única fonte de carbono serão identificados e a biodegradação de PE será avaliada em espécie única e em consórcio. Micro-organismos que se destacarem serão avaliados em reatores em escala piloto. Adicionalmente, será avaliada a possibilidade de utilização de larvas que consomem PE como fonte nutricional para alimentação animal. Para tanto, serão realizadas análises centesimais (teor de proteínas, lipídios e carboidratos) de larvas liofilizadas e teste de toxicidade em modelo murino. Esse projeto aliará conhecimento básico e aplicado para propor soluções biotecnológicas visando o gerenciamento de resíduos plásticos.

Palavras-chaves: polietileno, biodegradação, larvas de insetos, microbiota, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

In 2019, 368 million tons of plastic were produced in the world, 30% was attributed to polyethylene (PE). Physicochemical characteristics of this polymer make it inert and resistant to biodegradation. Thus, the plastic accumulation in nature is harmful to life, and studies aiming at alternatives for managing this waste are highlighted. The ability of *Galleria mellonella* insect larvae to biodegrade PE, at a rate higher than those described for microorganisms, was reported in 2017. However, the understanding of the polymer digestion process by this animal is still limited. This project aims to characterize the PE biodegradation by *G. mellonella* larvae and evaluate the application of (i) microorganisms from the larval microbiota and (ii) live larvae in the plastic biodegradation on a pilot scale, as well as the use of these larvae as a nutritional source. For this, body sites of larvae fed with different diets (PE, cellulose, beeswax and laboratory diet, or fasting) will be submitted to physicochemical analyzes (FTIR, SEM-FEG-EDS and LC-DAD-MS). To assess the involvement of the microbiota, animals groups of microbiota free (treated with antimicrobials or obtained by axenic culture) will be included. Metagenomic analysis will also be performed, by sequencing the *16S rRNA* gene of intestinal bacteria. Microorganisms from the larval microbiota capable of growing with PE as the only carbon source will be identified and PE biodegradation will be evaluated in a single species and in a consortium. Microorganisms that stand out will be evaluated in pilot scale reactors. Additionally, the possibility using larvae that consume PE as a nutritional source for animal feed will be evaluated. Therefore, proximate analyzes (protein, lipids and carbohydrates) of lyophilized larvae and toxicity test in a murine model will be performed. This project will combine basic and applied knowledge to propose biotechnological solutions aimed at managing plastic waste.

Keywords: polyethylene, biodegradation, insect larvae, microbiota, *Galleria mellonella*.

Resumo Leigo

Na natureza o plástico fica susceptível à biodegradação ambiental, processo que ocorre de forma extremamente lenta. Estima-se que uma sacola plástica leva 500 anos para ser biodegradada. De forma interessante, estudos mostram a capacidade de larvas de insetos, como as larvas de *Galleria mellonella*, em biodegradar plásticos de forma muito mais rápida, podendo realizar esse processo em alguns dias. Nosso objetivo é entender como as larvas de *Galleria mellonella* biodegradam o plástico presente em sacolas descartáveis e avaliar potenciais aplicações de seus micro-organismos ou dos próprios animais como alternativa para auxiliar no tratamento desses resíduos.

1. INTRODUÇÃO

Este é um projeto de pesquisa focado em inovação na área de biotecnologia da saúde e meio ambiente, buscando alternativas para o gerenciamento de resíduos plásticos através do uso indireto ou direto de larvas de inseto. De 1950 até 2018, estima-se que a produção mundial de plástico atingiu a marca de 8,3 bilhões de toneladas métricas, e há uma projeção de aumento dessa produção de 5% ao ano, até 2050^{1,2,3}. Dessa produção, 76% já foi descartada, sendo que 72% desse montante teve como destino o depósito em aterros sanitários ou no meio ambiente⁴. Assim, o acúmulo desses resíduos plásticos constitui uma ameaça aos ecossistemas naturais e à saúde pública⁵ e, a busca por alternativas para o gerenciamento de resíduos plásticos é evidente.

Em 2010 surgiu o primeiro relato sobre a capacidade de larvas de alguns insetos em consumir e biodegradar plásticos e desde 2019, nosso grupo de pesquisa tem investigado a capacidade de larva do inseto *Galleria mellonella* em biodegradar o polietileno (PE)⁶. De modo a continuar nossos estudos na área de biodegradação de plástico por esses animais, temos como objetivo, a curto prazo, determinar se o processo de metabolização do PE por larvas de *G. mellonella* é dependente da microbiota. Para tanto serão realizados estudos para analisar a presença de PE e/ou produtos de biodegradação (metaboloma) em sítios corporais de larvas alimentadas com PE, com hexadecano marcado (¹³C₁₆H₂₄) ou com outras dietas. Para verificar a dependência da microbiota, serão incluídos grupos de animais livres de microbiota, seja por tratamento com antimicrobianos ou obtidos por cultura axênica. Neste ponto,

algumas análises físico-químicas serão realizadas na PUCRS e outras na UFMS, mediante colaboração estabelecida. Análises da microbiota intestinal (metagenômica) de animais alimentados com distintas dietas evidenciarão se a potencial mudança de microbiota se deve ao plástico ou como efeito de uma alimentação pobre nutricionalmente, podendo confirmar o direcionamento da dieta para uma microbiota biodegradante de PE. Os experimentos serão realizados na UFCSPA e analisados em colaboração com a UFTSM-Chile. Por fim, trabalharemos com micro-organismos cultiváveis da microbiota de larvas de *G. mellonella* a fim de caracterizar a atividade enzimática envolvida na biodegradação de PE, por espécies únicas e em consórcio. A médio e a longo prazo, estudaremos a aplicação (i) dos micro-organismos selecionados e (ii) de larvas vivas na biodegradação de resíduos plásticos em escala piloto, assim como o aproveitamento destas larvas como fonte nutricional. Para tanto, o escalonamento de ensaios com micro-organismos cultiváveis, em espécie única ou em consórcio, será realizado em reator de escala piloto mediante colaboração estabelecida com o Prof. Alexandre Macedo (UFRGS). Para os estudos em escala piloto de avaliação do uso de larvas vivas, alimentadas ou não com PE, como fonte nutricional para animais, temos a pretensão de estabelecer parceria com a empresa Befer Agroindustrial e Comercial Ltda, *startup* instalada na IE-CBiot. Os resultados obtidos serão publicados em revistas científicas de impacto na área e, dado ao caráter original e inovador do projeto, pode-se prever a redação e depósito de patente.

Em 2019 cerca de 368 milhões de toneladas de plástico foram produzidas no mundo⁷. Nesse mesmo ano, o mercado global de plástico foi avaliado em US\$ 568,9 bilhões, com uma projeção de crescimento anual de 3,2% de 2020 a 2027^{7,8}. Plásticos são substâncias poliméricas de cadeia longa, comumente obtidos pela polimerização de adição de ligações duplas de carbono na olefina inicial para formar novas ligações C-C⁹. Dentre esses materiais, o PE ganha destaque, pois corresponde a cerca de 30% da produção mundial de 2019, sendo amplamente utilizado em embalagens de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, dentre outros⁷. O formador da macromolécula do PE é o etileno (C₂H₄), dando origem a um material pouco reativo em baixas temperaturas devido a sua estrutura química: hidrocarboneto saturado com alto peso molecular de natureza parafínica^{10,11}. Além disso, polímeros ricos em ligação do tipo C-C, como é o caso do PE, são resistentes à hidrólise e biodegradação¹². Desse modo, o grande

contraste entre a longa duração e o rápido e elevado consumo de materiais de PE acarreta o acúmulo de resíduos no meio ambiente e ameaça os ecossistemas naturais e a saúde pública⁵.

O gerenciamento de resíduos plásticos se dá por 3 processos: reciclagem, incineração e depósito em aterros sanitários⁷. Apesar da reciclagem ser o processo de tratamento de resíduos sólidos mais recomendado, dados indicam que esse não é amplamente aplicado e, conseqüentemente, uma grande quantidade de resíduos é depositada na natureza¹². Considerando o Brasil, dados de 2018 apontam que o país reciclou apenas 1% de resíduo plástico¹³, embora a Associação Brasileira da Indústria de Plástico reporta que o país atingiu 22% de reciclagem de resíduos de origem plástica¹⁴. No mesmo ano, 67% dos resíduos plásticos gerados no Brasil foram depositados em aterros sanitários e na natureza¹³. Em todo o planeta, estima-se que 4,5 bilhões toneladas de resíduos plásticos tenham esse destino, afetando negativamente o conteúdo microbiano do solo, já que mais de 500 anos são necessários para a decomposição completa de uma garrafa de polietileno de alta densidade (PEAD)¹⁵.

Interessantemente, o primeiro relato na literatura mostrou a capacidade da larva do inseto *Zophobas atratus* em biodegradar poliestireno (PS)¹⁶. Em 2017, Bombelli, Howe e Bertocchini¹⁷ realizaram o primeiro estudo relatando a capacidade de larvas de *G. mellonella* em biodegradar PE, a uma taxa de $0,23 \text{ mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, que é considerada muito superior quando comparada àquelas relatadas na literatura para micro-organismos. No entanto, esse trabalho sofreu diversas críticas da comunidade científica^{18,19}, uma vez que os dados se mostraram inconclusivos para a confirmação da biodegradação de PE. Esse fato criou a perspectiva de investigar esse processo e desse modo, nosso grupo de pesquisa iniciou a padronização de metodologias para avaliar este processo de biodegradação. Durante o mestrado que cursei no PPGBio (2019-2021), realizei análises físico-químicas (FTIR, LC-MS, FEG-SEM-EDS e XPS), em diferentes sítios corporais (hemolinfa, casulo e fezes) de larvas alimentadas com PE ou com dieta laboratorial e assim detectamos a presença de substâncias de metabolização distintas exclusivamente em larvas alimentadas PE⁶. No entanto, ainda não está elucidado se a atividade digestória do PE por *G. mellonella* deriva da ação enzimática (i) do próprio animal ou de (ii) de sua microbiota ou (iii) de atividade conjunta de ambos. Assim, vem sendo observado um avanço crescente nos estudos sobre o tema.

G. mellonella pertence a ordem dos Lepidópteros, e pode ser encontrada em todo o mundo²⁰. Esse animal possui quatro fases em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa. Dependendo de fatores externos como temperatura, exposição à luz e disponibilidade de alimento, os diversos estágios larvais podem durar semanas a meses²¹. As pupas transformam-se em mariposas machos ou fêmeas, os quais acasalam, as fêmeas realizam ovoposição e o ciclo de vida recomeça. Essas larvas são popularmente conhecidas como traça da cera, pois possuem como nicho natural colmeias, onde alimentam-se de pólen e cera de abelha²². A cera de abelha é constituída majoritariamente por substâncias como cerina e miricina, as quais são quimicamente ricas em ligações C-C e C-H²². Apesar da estrutura química dos componentes da cera de abelha ser semelhante com a estrutura química do PE, o que poderia sugerir uma capacidade inata destes animais em hidrolisar este tipo de ligação química, uma dieta de favo de mel fornece às larvas também outros nutrientes, como açúcares e proteínas²³.

LeMoine e colaboradores (2020)²³ demonstraram que após o processamento inicial de PE pela comunidade microbiana intestinal de *G. mellonella*, as larvas utilizam várias enzimas-chave, para decompor ácidos graxos de cadeia curta. Além disso, enzimas com capacidade de quebrar alcanos de cadeia longa foram identificadas em microrganismos, incluindo lacases, peroxidases de lignina e peroxidases de manganês, mas ainda não foram identificadas em animais²³. Em contraste, Kong e colaboradores (2019)²⁴ sugeriram que essas larvas metabolizam o PE na ausência da microbiota intestinal. Através da análise transcriptômica de larva alimentadas com cera de abelha, os autores mostraram que as famílias de genes relacionadas à formação de ácidos graxos de cadeia longa, a partir de hidrocarbonetos de cadeia longa, não foram superexpressas na microbiota intestinal de *G. mellonella*. Portanto, eles propuseram que a cera de abelha é primeiramente hidrolisada em ácidos graxos de cadeia longa pelo hospedeiro, e não pela microbiota intestinal. No entanto, ambos podem atuar na decomposição de ácidos graxos de cadeia curta, sugerindo uma vantagem para a microbiota²⁴. No entanto, estudos recentes indicam que o microbioma intestinal desse animal é capaz de conduzir o processo de biodegradação plástica, mas não parece ser o único responsável pela biodegradação acelerada do PE, mostrando a participação da larva nesse processo^{25,26}. Aliado a isso, Zhang e colaboradores (2019)²⁷ mostraram que

a presença de *Aspergillus flavus* na microbiota de larvas de *G. mellonella* auxilia esse processo de biodegradação e que o fungo seria responsável pela produção de lacases e oxidases. Cassone e colaboradores (2020)²⁸ atribuem atividade biodegradadora de PE à presença de *Acinetobacter* sp. na microbiota larval. O entendimento sobre como ocorre a clivagem da cadeia polimérica de plásticos, incluindo o PE, por larvas de *G. mellonella* é foco atual de estudos no mundo, dada a relevância do tema. Além disso, as enzimas envolvidas nesse processo, suas origens (larval ou microbiana), bem como a rota digestória do PE neste animal, permanecem desconhecidos.

Na escrita de um artigo de revisão da literatura, nosso grupo de pesquisa compilou 46 estudos que mostram a capacidade de larvas de inseto da ordem dos Coleópteros e Lepidópteros em biodegradarem plásticos⁶. Curiosamente, insetos dessas ordens são amplamente utilizados como fonte de alimento para humanos e animais no mundo e juntos representam aproximadamente 50% deste consumo²⁹.

Pesquisas indicam um grande potencial no uso de farinhas de inseto como alimento, principalmente por ser excelente fonte de proteína. Para fazer uso de insetos como ingrediente alimentar, é importante aumentar a escala de produção, reduzindo o custo da criação. Ainda, fatores como a produtividade de biomassa, viabilidade econômica, composição bromatológica e hábitos alimentares dos insetos, devem ser observados^{30,31,32}. O *Codex Alimentarius*, estabelecido por um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS), não normatiza as disposições legais específicas em relação ao uso de insetos na produção de alimentos humanos e rações animais²⁹. Por isso é preciso avaliar os riscos potenciais associados ao uso de insetos^{32,33}. Sendo assim, esse projeto aliará conhecimento básico e aplicado e de forma inovadora propõe avaliar aplicações biotecnológica, através do uso indireto (micro-organismos) ou direto (larvas vivas com subsequente reaproveitamento como fonte nutricional para alimentação animal), visando novas alternativas para o gerenciamento de resíduos plásticos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o processo de biodegradação de PE por larvas de *G. mellonella* e avaliar a aplicação biotecnológica no processamento de resíduos plásticos e como fonte nutricional para alimentação animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se o processo de metabolização do PE por larvas de *G. mellonella* é dependente da microbiota;
- Isolar e identificar micro-organismos cultiváveis da microbiota de larvas de *G. mellonella* e caracterizar a atividade enzimática envolvida na biodegradação de PE, por espécies únicas e em consórcio;
- Avaliar a aplicação (i) dos micro-organismos selecionados e (ii) de larvas vivas na biodegradação de resíduos plásticos em escala piloto, assim como o aproveitamento destas larvas como fonte nutricional.

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Larvas de *G. mellonella* serão cultivadas em laboratório e durante todo o ciclo de vida as larvas estarão a 28 °C. Previamente aos experimentos as larvas serão alimentadas com dieta laboratorial, a qual é composta farinhas e açúcar mascavo.

Filmes de PEBD (PB-608 Brasken) serão obtidas por colaboração estabelecida com o Laboratório de Organometálicos e Resinas da PUCRS. Além disso, serão utilizados hidrocarbonetos de cadeia longa, como substrato marcado (hexadecano $^{13}\text{C}_{16}$, Sigma-Aldrich).

3.2 ESTUDO DA METABOLIZAÇÃO DO PE POR LARVAS DE *G. mellonella* E SUA DEPENDÊNCIA COM A MICROBIOTA

Com o intuito de avaliar a metabolização do PE por larvas de *G. mellonella* e as possíveis alterações na fisiologia no animal após a ingestão deste plástico, serão utilizados de grupos de larvas com peso médio de 130 mg. Esses animais serão alimentados por 7 dias com: (i) PE, (ii) celulose (papel), o qual como é pobre

nutricionalmente como o PE, (iii) cera de abelha, que é a utilizada como fonte de nutrientes pelas larvas em seu nicho natural, (iv) dieta laboratorial, que é a ração artificial utilizada para criação desses animais e (v) larvas em jejum, condição de alto estresse nutricional. Além disso, de modo a controlar a rota de digestão do PE, um grupo específico e animais será alimentado com (vi) hidrocarboneto de cadeia longa (hexadecano $^{13}\text{C}_{16}\text{H}_{34}$, Sigma-Aldrich), como substrato marcado.

3.2.1 Análises físico-química para detecção de PE e/ou produtos de biodegradação

A partir dos grupos de animais citados no item (3.2), serão coletadas amostras de sítios corporais (hemolinfa, casulo e fezes) para serem realizadas análises físico-químicas (FTIR, FEG-SEM-EDS, LC-DAD-MS e CG-MSRI, descritas posteriormente). Isso de modo a verificar mudanças estruturais, bem como, traçar o metaboloma destes animais pela identificando os produtos de metabolização do PE. Para verificar a dependência da microbiota no processo de metabolização do PE, a microbiota larval será reduzida ou eliminada, e os sítios corporais destes animais serão coletados e analisados pelas mesmas técnicas físico-químicas. Esses animais com redução ou livres de microbiota, serão obtidos por (i) tratamento com coquetel antimicrobiano já padronizado⁶: injeção de 10 μL de solução contendo ampicilina, canamicina, polimixina B, neomicina, vancomicina, e voriconazol ou (ii) por cultura axênica de animais utilizando solução com 5,25% de hipoclorito de sódio para 0,1% de cloreto de benzalcônio em ovos recém eclodidos³³.

A análise FTIR será feita em equipamento Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR Spectrometer (USA) e a aquisição do espectro será realizada com o acessório de amostras UATR (acessório de refletância atenuada total universal) no intervalo de número de onda de 2000 a 600 cm^{-1} . Para análise de MEV-FEG-EDS, as amostras serão metalizadas com ouro e as imagens serão obtidas em equipamento FEI Inspect F50 no modo de elétrons secundários. As análises de LC-DAD-MS serão realizadas utilizando UFLC Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de arranjo de diodos e um espectrômetro de massa MicroTOF-Q III (Bruker Daltonics) com coluna Kinetex C18 (2,6 μm , 150 mm x 2,1 mm, Phenomenex). A avaliação da digestão do substrato marcado com ^{13}C e seus respectivos produtos de degradação será realizada com CG-MSRI na PUCRS.

3.2.2 Sequenciamento de região do gene *rRNA 16S* da comunidade bacteriana presente no intestino de larvas de *G. mellonella*

Recentemente nosso grupo de pesquisa realizou um estudo piloto metagenômico para verificar a diversidade bacteriana no intestino de larvas de *G. mellonella* após alimentação com PE. Apesar de nossos resultados indicarem que a alimentação com PE promove mudanças na composição do microbioma em comparação ao grupo de larvas alimentadas com dieta laboratorial, vimos a necessidade de incluir grupos de animais alimentados com outra dieta pobre nutricionalmente, assim como o PE⁶. Desse modo, grupos de 10 larvas com peso médio de 130 mg serão alimentados com: (i) PE, (ii) celulose (papel), (iii) cera de abelha, (iv) dieta laboratorial e (v) jejum, por 7 dias. Cada amostra corresponderá a um *pool* de 10 intestinos transferido para um tubo eppendorf contendo 200 µL de solução de PBS estéril. A extração de DNA será realizada usando o E.Z.N.A. Stool DNA Kit de acordo com o protocolo padrão do fabricante. A amplificação parcial do gene *16S rRNA* (região V4) será realizada com os primers 515F e 806R usando termociclador BioRad MyCycler (BioRad, EUA). Os amplicons serão purificados por esferas Agencourt AMPure XP seguindo as instruções do fabricante. A biblioteca será construída usando o kit de preparação de amostra Nextera XT Index Kit (Illumina) e o sequenciamento será conduzido em uma plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, EUA), usando o MiSeq Reagent Nano Kit, v2 -500 ciclos. A análise de bioinformática de amplicons de *16S rRNA* será realizada usando Mothur v1.4323^{34,35}.

3.3 ESTUDO SOBRE OS MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS E BIODEGRADADORES DE PE PRESENTES NA MICROBIOTA LARVAL

Com o objetivo de obter micro-organismos biodegradadores de PE a partir da microbiota deste animal, serão utilizadas amostras de (i) intestinos e (ii) glândulas salivares de larvas de *G. mellonella*. As larvas serão imergidas em etanol 70% por 1 min e serão extraídos um *pool* de 10 intestinos (inóculo 1) e de 10 glândulas salivares (inóculo 2). Estas amostras serão inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo meio de cultivo líquido e PE como única fonte de carbono (LCFBM). Os frascos serão mantidos a 28 °C e 120 rpm. Após 30, 60 e 120 dias, partes residuais do PE serão

removidas, juntamente com o sobrenadante das culturas e serão semeados em meio ágar distintos para o isolamento microbiano (batata-dextrose, sangue de carneiro e triptona de soja), incubados durante 24 h a 28 °C e as colônias formadas serão transferidas para ágar fresco até a obtenção de colônias puras.

Para a triagem da atividade biodegradadora de PE, uma suspensão de células microbianas de 10^8 UFC/mL (DO de 0,150 a 600 nm) será incubada em meio LCFBA, contendo filme de PE, previamente pesado (28 °C durante 7, 15 e 30 dias). Grupos controles serão incluídos: controle 1 (sem inoculação microbiana) e controle 2 (sem adição de PE no meio de cultivo). Os filmes de PE serão lavados com água destilada, álcool 70% e SDS 2% e secos em temperatura ambiente, por 12 h. A atividade de biodegradação se dará por gravimetria e análises físico-químicas da superfície do PE, como FTIR e MEV-FEG-EDS. Por fim, a capacidade de biodegradação do PE será avaliada em consórcios microbianos, utilizando os isolados prévios.

3.3.1 Identificação taxonômica de micro-organismos degradadores de PE

O DNA dos micro-organismos selecionados como biodegradadoras de PE será extraído usando o kit comercialmente disponível (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit, EUA). A identificação taxonômica bacteriana e fúngica será inferida através do sequenciamento dos genes *16S* e *18S*, respectivamente^{36,37}. Os produtos de PCR serão purificados com o DNA Illustra™ GFX™ PCR e o kit de purificação de banda de gel (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O sequenciamento será realizado pelo kit de reação ABI PRISM® BigDye® em um sequenciador ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems®). A identificação taxonômica das sequências será realizada pela ferramenta BLAST, comparando com as sequências depositados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.3.2 Estudo sobre enzimas bacterianas

A atividade enzimática secretada obtida dos micro-organismos cultiváveis será determinada usando ensaios *in vitro*. Diferentes metodologias serão selecionadas baseada em classes de enzimas conhecidas envolvidas na biodegradação de plástico descritas na literatura, como lipases, lacases, esterases e assim confirmaremos ou não, a produção dessas enzimas pela microbiota cultivável de *G. mellonella*.

3.4 BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS PLÁSTICOS EM ESCALA PILOTO: AVALIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E LARVAS VIVAS

3.4.1 Avaliação de micro-organismo biodegradantes em escala piloto

Os micro-organismos que tiverem atividade destacada nos testes de triagem de biodegradação de PE serão selecionados para avaliação de escalonamento utilizando reator de volume de 5 L. As condições de cultivo serão otimizadas e alíquotas de filmes de PE e de meio líquido serão removidos em períodos pré-determinados para avaliação da taxa de biodegradação.

3.4.2 Avaliação de larvas de *G. mellonella* após processamento de resíduos plásticos como fonte nutricional para alimentação animal

A fim de determinar o teor nutricional da larva de *G. mellonella* alimentadas ou não com PE, serão realizadas análises centesimais para quantificação de proteínas, lipídios e carboidratos, cinzas e umidade em 100g de larvas. As amostras serão secas até peso constante, a 105° C por 24 h (procedimento 930.15)³⁸. Para determinação de proteína bruta, será realizada a quantificação de nitrogênio, usando (procedimento 984.13)³⁸. O teor de cinzas será determinado usando mufla a 550-600 ° C (procedimento 924.05)³⁸. O perfil lipídeos, será avaliado pelo método de extração Soxhlet, (procedimento 920.39)³⁸.

Para o estudo de toxicidade seguirá será estabelecida colaboração com grupo de pesquisa da área da toxicologia e o projeto será submetido à CEUA-UFCSPA. Brevemente, serão utilizados ratos machos (6 semanas de idade). As amostras de larvas serão previamente autoclavadas e liofilizadas, o conteúdo se dará por gavagem oral uma vez ao dia durante 13 semanas (20 mL/kg de peso corporal). Os ratos serão observados diariamente para sinais clínicos, incluindo mortalidade, aparência geral e anormalidade comportamental até o sacrifício terminal para avaliação de órgãos. Pesos corporais e o consumo de comida/água será registrado semanalmente ao longo do estudo³⁹.

4. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Com o desenvolvimento deste projeto, esperamos caracterizar o processo de biodegradação de PE usando larvas de *G. mellonella*, determinando a rota de ingestão

desse plástico e se esse processo é dependente da microbiota larval. Além disso, iremos isolar e identificar micro-organismos cultiváveis por: (i) glândulas salivares e (ii) intestinos das larvas, fazendo isso por espécies únicas e em consórcio. Desse modo, há a expectativa de se obter resultados para a biodegradação do PE e a melhoria dessa atividade quando em consórcio microbiano. Por fim, pretendemos avaliar a aplicação dos micro-organismos selecionados e de larvas vivas na biodegradação de resíduos plásticos em escala piloto, o que fornecerá grande impacto científico e social devido a possibilidade do aproveitamento das larvas como fonte para ração animal. Com isso, esse projeto irá gerar avanço científico e biotecnológico inovador para o tratamento de plásticos usando larvas de inseto.

5. POTENCIAIS DESAFIOS PARA EXECUÇÃO DA PROPOSTA

- Comprovação que esses animais estão utilizando o PE como fonte nutritiva para o desenvolvimento de seu organismo; para isso, foram incluídos nos ensaios grupos de larvas com alimentação por celulose, que é pobre nutritivamente;
- Elevada quantidade de larvas que serão utilizadas nos experimentos; para isso, estamos ampliando a criação desses insetos em nosso laboratório e realizando testes de modo a melhorar essa criação;
- Realização de análises que comprovassem a despolimerização do plástico, como cromatografia de gel permeação serão importantes; para isso, estamos verificando possíveis parcerias internacionais.

6. CRONOGRAMA

Quadro 1: Cronograma das atividades propostas para esse projeto de doutorado

Atividade	1º Semestre	2º Semestre	3º Semestre	4º Semestre	5º Semestre	6º Semestre	7º Semestre	8º Semestre
Criação das larvas	X	X	X	X	X	X	X	X
Estudo da metabolização do PE por larvas de <i>G. mellonella</i> e sua dependência com a microbiota	X	X	X	X				
Análises físico-química para detecção de PE e/ou produtos de biodegradação	X	X	X	X				

Sequenciamento de região do gene <i>rRNA 16S</i> da comunidade bacteriana presente no intestino de larvas de <i>G. mellonella</i>	X	X						
Estudo sobre os micro-organismos cultiváveis e biodegradadores de PE presentes na microbiota larval		X	X	X	X			
Identificação taxonômica de micro-organismos degradadores de PE			X	X				
Estudo sobre enzimas bacterianas				X	X			
Biodegradação de resíduos plásticos em escala piloto: avaliação de micro-organismos e larvas vivas					X	X	X	
Avaliação de micro-organismo biodegradantes em escala piloto					X	X	X	
Avaliação de larvas de <i>G. mellonella</i> após processamento de resíduos plásticos como fonte nutricional para alimentação animal					X	X	X	
Redação da Tese							X	X
Redação de Artigo Científico	X	X	X	X	X	X	X	X
Disciplinas	X	X	X	X				
Defesa Final							X	X

7. ORÇAMENTO

Quadro 2: Orçamento proposto para esse projeto de doutorado que terá apoio financeiro do Instituto Serrapilheira (grant Serra-1811-26226).

Material a ser adquirido	Preço (R\$)	Material já adquirido	Preço (R\$)
Material para análise cromatográfica Solventes HPLC; filtros de seringa; frascos para análise de HPLC e GC; cartuchos de guarda C18	10.000,00	Material Consumível Suprimentos para alimentação artificial da <i>G. mellonella</i>	6.000,00
Reagentes de Biologia Molecular Kit para extração de DNA; primers, Taq DNA polimerase; dNTPs; Kit purificação de PCR	15.000,00	Cultura Microbiológica Meios sólidos e líquidos	8.000,00
Material Descartável Alça bacteriológica, ponteira, tubos de falcon, eppendorfs, placas de Petri	10.000,00	Material para Metagenômica Kit para sequenciamento do gene <i>rRNA 16 s</i>	10.000,00
Substrato marcado	5.500,00	Material para quantificação de macromoléculas	2.000,00
Total	45.000,00	Total	26.000,00

REFERÊNCIAS

- [1] Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Sci.*, 2015, (347), 6223.
- [2] Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.*, 2017, (3), 7.
- [3] Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., Pillai, S. Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes. *Sci. Total Environ.*, 2021, (759), 143536.
- [4] World Economic Forum, Ellen MacArthur Foundation and McKinsey & Company. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics, 2016. Disponível em: <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/publications/the-new-plastics-economy-rethinking-the-future-of-plastics>.
- [5] Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, 2008, (3), 246–265.
- [6] Pivato, A, F. Consumo e biodegradação de plástico por larvas de inseto: um estudo sobre *Galleria mellonella*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2021. 216 p.
- [7] Plastics the Facts 2020. Uma análise da produção europeia e dados de resíduos e consumo. Disponível em: www.plasticeurope.org.
- [8] Grand Review Research: Plastic market size, share & trends analysis report by product (PE, PP, PU, PVC, PET, Polystyrene, ABS, PBT, PPO, Epoxy Polymers, LCP, PC, Polyamide), By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2020–2027, 2020. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/global-plastics-market>.
- [9] AlMa'adeed, M.A., Krupa, I. Polyolefin compounds and materials. Springer series on polymer and composite materials. Springer, Cham, 2016, 1-11.
- [10] Doak, K.W. Ethylene polymers, in: Mark, H.F. (Ed.), Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Emulsion Polymerization to Fibers, Manufacture. Wiley–Blackwell, New York, 1986, (864).
- [11] Krueger, M.C., Harms, H., Schlosser, D. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, (99), 8857–8874.
- [12] Ragaert, K., Delva, L., Van Geem, K. Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste Manag.*, 2017, (69), 24–58.
- [13] Cuffari, B. How Brazil Is Tackling Pollution. Editorial Feature AZoCleantech. Manchester UK, 2019, 1–3.

- [14] Abiplast. Associação Brasileira da Indústria de Plásticos - Perfil 2018, 2019.
- [15] Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Giu, Y., Tabassum, T., Jang, Jh, Suh, S. Degradation Rates of Plastics in the Environment. ACS Sustain. Chem. and Engin., 2020, (8), 3494–3511.
- [16] Miao, S., Zhang, Y. Feeding and degradation effect on plastic of *Zophobas morio*. Journal of Environ. Entomol., 2010, (32), 435–444.
- [17] Bombelli, P., Howe, C.J., Bertocchini, F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. Curr. Biol. Cell Press, 2017, (27), 292–293.
- [18] Weber, C., Pusch, S., Opatz, T. Polyethylene bio-degradation by caterpillars? Current Biology, 2017, (27), 744–745.
- [19] Billen, P., Khalifa, L., Van Gerven, F., Tavernier, S., Spatari, S. Technological application potential of polyethylene and polystyrene biodegradation by macro-organisms such as mealworms and wax moth larvae. Scien. of the Total Environm, 2020, (735), 139521.
- [20] Kwadha, C.A., Ong'Amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K., Fombong, A.T. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Insects, 2017, (8), 1–17.
- [21] Nielsen, R.A.; Brister, C. Greater wax moth: Behavior of larvae. Annals of the Entomol. Soci. of Amer., 1979, (72), 811–815.
- [22] Dickman, A. Studies on the waxmoth, *Galleria mellonella* with particular reference to the digestion of wax by the larvae. Journal of Cellular and Comparat. Physiol., 1933, (3), 223–246.
- [23] Lemoine, C.M.R., Grove, H.C., Smith, C.M., Cassone, B.J. A Very Hungry Caterpillar: Polyethylene Metabolism and Lipid Homeostasis in Larvae of the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*). Environmen. Scie. and Technol., 2020, (54), 14706–14715.
- [24] Kong, H.G., Kim, H.H., Chung, J., Jun, J.H., Lee, S., Kim, H.M., Jeon, S., Park, S.G., Bhak, J., Ryu, C.M. The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax. Cell Reports, 2019, (26), 2451-2464.
- [25] Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., Wang, B., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, W., 2019. Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. International Jour. of Environmen. Research and Public Health, 1941, 16.

- [26] Montazer, Z., Habibi Najafi, M.B., Levin, D.B. *In vitro* degradation of low-density polyethylene by new bacteria from larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Canad. Journ. of Microbiol.*, 2020, 1–10.
- [27] Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Yixuan, Li, L., Lin, H., Bi, Q., Zhao, Yucheng. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Scien. of the Total Environm.*, 2020, 704.
- [28] Cassone, B.J., Grove, H.C., Elebute, O., Villanueva, S.M.P., LeMoine, C.M.R. Role of the intestinal microbiome in low-density polyethylene degradation by caterpillar larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Proceed. of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2020, (287), 20200112.
- [29] Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, et al. Edible insects: prospects for food and feed security Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. Disponible en: <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/258042>
- [30] Sánchez-Muros MJ, Barroso FG, Manzano-Agugliaro F. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *J Clean Prod.* 2014; (65), 16-27.
- [31] Collavo A, Glew RH, Huang YS, Chuang LT, Bosse R, Paoletti MG. House cricket small-scale farming [Internet]. In: Paoletti MG, editor. *Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails*. New Hampshire: Science Publishers; 2005, 519-44.
- [32] Dossey AT, Morales-Ramos JÁ, Rojas MG, editors. *Insects as sustainable food ingredients: production, processing and food applications*. London: Academic Press Elsevier; 2016.
- [33] Brust, M., and G. Fraenkel. "The nutritional requirements of the larvae of a blowfly, *Phormia regina* (Meig.)." *Physiologi. Zool.* 1955, 186-204.
- [34] Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., Schloss, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 2013, 79(17), 5112.
- [35] Schloss, P. D. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PloS one*, 2009, 4(12), 8230.
- [36] Abraham, W.R., Strompl, C., Meyer, H., Lindholm, S., Moore, E.R., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B.J., Bennasar, A., Smit, J., Tesar, M. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* sp. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Internat. Journal of Systemat. Bacteriolo.*, 1999 (49), 1053–1073.

- [37] White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 1990, 315-322.
- [38] AOAC. Official Methods of Analysis, 18th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, USA, 2005.
- [39] Kim, S. Y., Kwak, K.-W., Park, E.-S., Yoon, H. J., Kim, Y.-S., Park, K., ... Kim, S.-D. Evaluation of Subchronic Oral Dose Toxicity of Freeze-Dried Skimmed Powder of *Zophobas atratus* Larvae (frpfdZAL) in Rats. Foods, 2020, 9(8), 995.

O projeto guarda-chuva, intitulado “Como as larvas de *Galleria mellonella* degradam plástico sintético?”, foi anteriormente registrado na Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (Anexo I). No entanto, como o presente estudo prevê a utilização de modelos murinos, passará, posteriormente para avaliação Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), da mesma universidade.

ANEXO I:**Registro do projeto guarda-chuva no Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
COMISSÃO DE PESQUISA

Atestado

Atestamos que o projeto de pesquisa intitulado "*Como as larvas de Galleria mellonella são capazes de degradar plástico sintético?*" está registrado na Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre com o número 066/2019, sob responsabilidade de Danielle da Silva Trentin.

Salientamos que este registro **não autoriza o pesquisador a coletar ou analisar dados oriundos de sujeitos de pesquisa.**

Salientamos ainda que este registro **não garante a concessão de recursos financeiros por parte da UFCSPA a este projeto de pesquisa.**

Porto Alegre, 20 de maio de 2019.

Dinara Jaqueline Moura
Dinara Jaqueline Moura
Coordenadora
Comissão de Pesquisa
UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Avaliação da eficácia da temozolomida acoplada a ferrocenos no tratamento de glioblastomas

Proponente: Prof^a Dra. Dinara Jaqueline Moura

Porto Alegre, abril de 2021.

RESUMO: As doenças complexas têm se mostrado um grande desafio para a medicina e ciência na atualidade, uma vez que os esquemas terapêuticos atuais apresentam relativa ineficácia, contribuindo para a elevação da taxa de mortalidade por essas patologias. No que diz respeito ao avanço nos métodos terapêuticos, os gliomas compreendem um tipo de câncer onde o tratamento quimioterápico é praticamente o mesmo de décadas atrás, tendo como base a tríade composta por ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia com o fármaco temozolomida, o que na maioria dos casos se mostra ineficiente em razão da presença da barreira hematoencefálica, que impede o alcance de doses adequadas do medicamento no ambiente tumoral. Estudos recentes indicaram que o uso de compostos a base de ferrocenos apresentaram importante atividade antitumoral em diversas linhagens celulares, principalmente pela alteração no estado redox do ambiente tumoral. Desta forma, modificações na estrutura da temozolomida, como o seu acoplamento a ferrocenos com posterior incorporação em nanoestruturas de caráter lipídico ou poliméricas, podem vir a vetorizar e potencializar a ação do quimioterápico diretamente sobre o tumor. Este projeto visa, portanto, construir, avaliar a eficácia e compreender a ação do quimioterápico temozolomida acoplado a ferrocenos no tratamento de gliomas.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células anormais, apresentando desorganização parenquimal de tecidos e órgãos e o consequente comprometimento fisiológico do sistema acometido (Druker, 2001). No Brasil, dados de 2015 estimaram o surgimento de 596 mil novos casos de câncer (INCA, 2015), e em nível mundial, o período de 2012 a 2030 tem uma previsão de aumento de 50% em novos casos da doença, bem como de 60% nos óbitos (NIH, 2012). Quando observados apenas os tumores do sistema nervoso central, os gliomas compõem 28% de todos os tumores cerebrais primários e 80% de todos os tumores malignos (Ostrom, 2015). De um modo geral, o termo glioma engloba todos os tumores benignos ou malignos que surgem de células gliais, e embora sua incidência relativa seja baixa, possui um mau prognóstico gerando um impacto negativo na qualidade de vida e função cognitiva dos pacientes (Guntuko, 2016).

Os gliomas têm origens celulares diferentes, e são classificados como oligodendroglioma, astrocitoma, ependimoma, glioblastoma, entre outros menos incidentes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas de grau I-IV de acordo com a taxa crescente de diferenciação e natureza maligna (Guntuko, 2016). Glioblastoma, também conhecido como astrocitoma grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM), é altamente prevalente (54,7%) entre todos os gliomas e é a forma mais agressiva com pior prognóstico (Globocan, 2013). O GBM tem baixas taxas de sobrevivência com apenas 4,7% dos pacientes com sobrevida superior a cinco anos (Edick, 2005). A exposição a altas doses de radiação ionizante e a presença de algumas

síndromes genéticas raras causadas por mutações genéticas hereditárias são fatores de risco aceitos para a patogênese dos gliomas (Ostrom, 2015).

A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia à base de temozolomida (TMZ) são opções de tratamento fundamentais no manejo clínico. No entanto, a maioria dos gliomas são cirurgicamente irresssecáveis e, quando diagnosticados em estágio avançado, o nível de resistência à quimioterapia convencional aumenta. Além disso, pelo difícil acesso à radioterapia, os gliomas tornam-se um dos cânceres mais difíceis de tratar (Ohka, 2012). Embora não esteja relacionado entre os tumores de maior incidência na população em geral, os pacientes com GBM têm a peculiar e preocupante característica de baixa sobrevida (em média 14 meses), fato este que tem apresentado pouca alteração nas últimas quatro décadas, justificando a necessidade da obtenção de novos alvos terapêuticos para o tratamento desta neoplasia (Zinn et al., 2013).

A existência da barreira hematoencefálica (BHE), a complexa rede de múltiplas vias de sinalização alteradas e a presença de células-tronco de glioma são os principais fatores causadores da resistência tumoral e, por conseguinte, dos maus resultados com as terapias atuais (Ohka, 2012). Alguns mecanismos celulares importantes estão modificados em células tumorais afetando diretamente o tratamento com quimioterápicos, como, por exemplo, o transporte da droga pela membrana celular, alteração da expressão de enzimas-chave, alteração no metabolismo da droga, aumento do reparo de DNA e inabilidade de entrar na via apoptótica (Housman, 2014), justificando a busca por novos modelos de terapia, como novos alvos terapêuticos e alterações nas moléculas utilizadas no tratamento da doença. Neste contexto, a incorporação da TMZ a compostos vetorizados caracteriza-se como uma alternativa promissora na busca pelo melhoramento terapêutico de pacientes portadores de GBM.

Os ferrocenos (Fc), descobertos em 1951 e inicialmente empregados na ciência de materiais, têm apresentado características favoráveis no tratamento de diversas doenças. Por serem estáveis em meio aquoso e aeróbico, e por apresentarem propriedades eletroquímicas que favorecem a interação com moléculas biológicas, seu uso já evidenciou atividades antifúngica, antibacteriana, antimalárica, anticâncer e supressora do HIV (Ornelas, 2011).

Apesar dos resultados indicarem que os Fc possuem relativa ação supressora tumoral, ainda há uma ausência de dados concretos quanto à sua interação com diferentes agentes quimioterápicos, bem como o seu comportamento frente a tumores cerebrais devido à necessidade de atravessar a BHE. Uma vez que a busca por alternativas terapêuticas para o câncer ainda representa um obstáculo no avanço clínico, é de suma importância o aprofundamento no estudo destes novos compostos, a fim de se encontrar novos meios de tratamento para diversos tipos tumorais, ainda mais àqueles com elevada mortalidade, como os gliomas.

Neste contexto, as nanoemulsões (NE) apresentam aplicações biomédicas e farmacológicas, podendo atuar como reservatório de fármacos e levando a um controle de liberação das moléculas de interesse, com a finalidade de obter resultados terapêuticos

melhorados bem como efeitos adversos reduzidos. Para alcançar esses objetivos, as nano emulsões devem ter características específicas como por exemplo: capacidade de incorporação de fármaco sem perda de bioatividade, estabilidade *in vivo*, biocompatibilidade, degradabilidade e a capacidade em atingir tecidos e órgãos específicos em concentração constante. A liberação controlada e constante de fármacos permite, em muitos casos, a redução da dose e consequentemente dos efeitos indesejados de certos fármacos. Dentre as variedades de nanopartículas, as nano cápsulas poliméricas têm sido amplamente estudadas por causa de seus potenciais terapêuticos, ganhando destaque (Espuelas et al., 2002). Um tipo específico de nanocápsulas poliméricas que se mostrou promissor são as nanocápsulas de núcleo lipídico, compostas por um núcleo orgânico e gelatinoso formado por um lipídeo sólido e um lipídeo líquido e este núcleo, por sua vez, é revestido por um polímero.

Da mesma forma, vários estudos têm demonstrado a eficácia de nanoproductos no diagnóstico e terapia antitumoral (Ohka et al., 2012; Chen et al., 2015; Zhang et al., 2016; Bahrami et al., 2017). Nanopartículas (NP) são materiais na escala nano que podem conter drogas, sondas fluorescentes, genes, proteínas, entre outros. As NP podem resolver os maiores problemas da quimioterapia convencional, incluindo a biodistribuição não específica, células resistentes e efeitos adversos (Bahrami et al., 2017), sendo também capazes de transportar drogas através da barreira hematoencefálica o que as tornam estratégias promissoras no tratamento de tumores.

Devido à capacidade das NP de liberar as drogas de maneira local-específica elas são eficazes no tratamento de GBM (Singh & Lillard, 2009). Além disso, existem grandes variedades de estruturas de NP e estratégias de composição que podem ser usadas em vários estudos. Tendo em vista as características das NP, estas novas ferramentas ganharam ampla aceitação no campo de entrega de droga direcionada, especialmente na terapia antitumoral (Tzeng & Green, 2013). As NP têm a capacidade de armazenar e manter os agentes terapêuticos em sua estrutura de forma eficiente, permitindo a liberação prolongada destas drogas. Além disso, sua superfície pode ser manipulada facilmente por meio da adição de ligantes especiais, que são responsáveis pelo aumento da permeabilidade das NP no tumor. Neste contexto, as NP podem ser exploradas para o tratamento de GBM, sendo aplicados em diversas vias de administração, possibilitando alcançar locais-alvo celulares e intracelulares específicos transportando através da barreira hematoencefálica (Zlokovic, 2008).

As NP poliméricas (PNP) são uma das abordagens mais promissoras na terapia do câncer, devido à sua capacidade de automontagem, direcionamento específico ao tumor, biocompatibilidade, pequenas dimensões, produção rápida e simples, além da fácil encapsulação e do baixo custo. As PNP podem ser divididas em biodegradáveis e não biodegradáveis. As PNP biodegradáveis são utilizadas para o sistema de liberação de fármacos, tais como a TMZ que é hidrofóbica, devido à baixa imunogenicidade, alta estabilidade, alta biodisponibilidade, boa encapsulação, liberação controlável e baixas propriedades tóxicas (Pourgholi et al., 2016). Neste contexto, o álcool polivinílico (PVA) é uma escolha interessante, uma vez que este polímero é

muito biocompatível, não tóxico e tem um excelente histórico de aplicações biomédicas, especificamente na forma de materiais de hidrogel que são usados para aplicações clínicas (Chen et al., 2015; de Lima et al., 2015; Canillas et al., 2016).

Entre os diferentes tipos de nanotecnologias para produzir PNP, a eletrofiação mostrou sua utilidade na criação de nanoprodutos de uma maneira simples e direta, sendo também uma técnica ecologicamente correta. A fácil implementação da eletrofiação implica em seu notável potencial para a criação de nanoprodutos com essas nanoestruturas complexas em escala industrial (Liu et al., 2018). Além disso, a eletrofiação proporciona grande flexibilidade na produção de nanoprodutos poliméricos com tamanho, porosidade, concentrações de fármacos e mecanismos de liberação personalizáveis, levando à possibilidade de modificação da taxa de liberação do fármaco para cada aplicação (Zhang et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A história do câncer na saúde pública é marcada pelo incessante esforço da medicina em controlá-lo pela via da prevenção, aliada ao uso das mais modernas tecnologias médicas de tratamento. No entanto, as dificuldades técnicas para a cura de muitas de suas formas, o alto custo das tecnologias empregadas com este objetivo e seu caráter individual mostram-se como limitadores da ação terapêutica, fazendo com que a doença se vincule cada vez mais ao campo da prevenção e da saúde pública. Tumores cerebrais são um grande problema de saúde pública, uma vez que sua maioria (principalmente os gliomas) são cirurgicamente irresssecáveis e, quando diagnosticados em estágio avançado, o nível de resistência à quimioterapia convencional aumenta. Além disso, pelo difícil acesso à radioterapia, os gliomas tornam-se um dos cânceres mais difíceis de tratar. Apesar dos recentes desenvolvimentos nestas terapias, atualmente o GBM tem uma sobrevivência média de 14,6 meses a partir do diagnóstico. Dentro deste contexto, é importante buscar novas opções terapêuticas para propor alternativas de tratamento em tumores que ainda possuem alta taxa de mortalidade usando novas formulações que carreguem o fármaco como mais efetividade pela barreira hematoencefálica, alcançando o SNC e melhorando a resposta terapêutica, como no caso dos gliomas e da estratégia aqui proposta.

3. OBJETIVOS E METAS

Objetivo geral: preparar e caracterizar formulações do tipo NE a base de água e acetona, bem como nanoestruturas poliméricas de PVA contendo o quimioterápico TMZ acoplado a Fc e avaliar a eficácia destas formulações em modelos *in vitro* de GBM.

Meta 1: preparar e caracterizar NE de núcleo lipídico para incorporação de TMZ, Fc e TMZ+Fc.

Meta 2: avaliar a citotoxicidade utilizando linhagens celulares humanas de GBM tratadas com TMZ e Fc em suas formas livres, bem como das NE de TMZ, Fc, e TMZ+Fc em diferentes tempos de tratamento.

Meta 3: avaliar a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e os mecanismos de morte celular causados pelas NE em diferentes tempos de tratamento.

Meta 4: preparar e caracterizar PNP de PVA contendo TMZ, Fc e TMZ+Fc.

Meta 5: avaliar a citotoxicidade utilizando linhagens humanas de GBM tratadas com TMZ e Fc em suas formas livres, bem como das PNP de TMZ, Fc, e TMZ+Fc.

Meta 6: avaliar a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e os mecanismos de morte celular causados pelas PNP.

4. METODOLOGIA

Preparação e caracterização das NE de núcleo lipídico: as formulações serão constituídas de duas fases, uma orgânica (FO) e uma aquosa (FA). Na FO serão misturados acetona (27 mL), Span-60 (38 mg), triglicerídeo de cadeia média do ácido cáprico (160 μ L), a TMZ e/ou o Fc, sendo esses dois últimos em proporções variadas. A FA, por outro lado, será composta de água ultrapura (53 mL) e polissorbato-80 (70 μ L). Ambas as fases serão colocadas sob agitação e aquecimento a 40 °C. Após completa homogeneização das fases, a fase orgânica será vertida na fase aquosa lentamente com auxílio de funil para que ocorra uma emulsão. Posteriormente, a solução final será levada ao rotaevaporador e seu volume será reduzido a 10 mL. A distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas será determinada pelo método de espalhamento de luz dinâmica (DLS) e difração de laser, e testes de pH também serão realizados para a determinação da acidez das NE, avaliando a possível nocividade frente às células saudáveis.

Preparação e caracterização das PNP: as PNP serão formadas pela metodologia de eletrofiação utilizando uma agulha de calibre 21 gauge de extremidade romba, e uma taxa de fluxo de massa de 0,5 mL/h. A morfologia das nanoestruturas será observada mediante microscopia eletrônica (Tescan Mira XMU SEM, TESCAN, Brno, CZ). O modo de retrodifusão eletrônica será utilizado, com ampliações variando de 10kX a 30kX. Antes da análise, as nanoestruturas serão recobertas com ouro, e o tamanho dessas será analisado com o auxílio do software ImageJ (Version 1.48v). A estabilidade das moléculas após a encapsulação será analisada mediante espectroscopia por ressonância magnética nuclear (Bruker 400 MHz Avance III HD equipado com sonda H/X CPMAS 3.2 mm). Já as propriedades mecânicas serão mensuradas por um reômetro (Discovery HR-2, TA Instruments, DE, USA). Os experimentos serão feitos usando o método da placa paralela. Como componente de aquecimento, será utilizada uma placa Peltier e, como a geometria do topo, será utilizada uma placa de aço de 60 mm. As amostras serão carregadas na placa Peltier após 15 minutos em tampão PBS (pH 6,8 ou 7,4). Após um passo de equilíbrio, as propriedades viscoelásticas (módulo de elasticidade G' e módulo viscoso G'') em função da frequência serão medidas através de testes de varredura de frequência em uma faixa de 0,01 a 10

Hz. Para construir curvas de fluxo de dados de viscosidade aparente de cada amostra, avaliações de cisalhamento estáveis serão realizadas no intervalo de taxa de cisalhamento 1 - 100 s⁻¹. Para medir a eficiência percentual de encapsulação (EE%) e a quantidade total de TMZ e ferrocenos carregados, as formulações serão completamente dissolvidas em água destilada e a quantidade de TMZ e ferrocenos liberada será medida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O EE (%) da TMZ e ferrocenos será determinado da seguinte forma:

$$EE(\%) = \frac{\text{actual amount of loaded in NFs}}{\text{theoretical amount of loaded in NFs}} \times 100$$

O perfil de dissolução será analisado usando Distek Model 2500 Dissolution System (Distek, Inc., USA). As amostras serão testadas em PBS (pH 6,8 ou 7,4) a 37°C, e serão utilizados 900 mL de meio de dissolução por vaso e a taxa de agitação será estabelecida em 50 rpm. As amostras coletadas serão analisadas por CLAE.

Linhagens celulares: serão utilizadas as linhagens celulares T98G (resistente à TMZ) e U87 (sensível à TMZ) para os experimentos obtidas do banco da *American Type Culture Collection* (ATCC).

Protocolos de tratamento: as linhagens serão tratadas com as formulações preparadas em concentrações estabelecidas conforme ensaios prévios de viabilidade celular. Os esquemas de tratamento seguirão protocolos de 6 e 24h, além de um esquema com 5 dias de tratamento seguido de 2 dias de recuperação, mimetizando o protocolo clínico.

Viabilidade celular por captação do vermelho neutro: este ensaio é baseado na incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos de células viáveis. Após o tratamento as células serão lavadas com PBS e incubadas com 250 µL da solução de vermelho neutro (25 µg/mL) a 37 °C por 3 h. Depois disso, as células serão lavadas novamente e incubadas por 30 min, protegidas da luz, com a solução de desadsorção (ácido acético: etanol: água, 1:50:49). A absorbância será medida a 540 nm no espectrofotômetro Spectramax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Avaliação do estresse oxidativo mitocondrial: a geração de ânion superóxido mitocondrial será determinada utilizando a sonda fluorescente *Mitosox*, de acordo com recomendações do fabricante. Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS Calibur e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10000 eventos serão coletados por amostra.

Avaliação do dano mitocondrial: o potencial de membrana mitocondrial será avaliado usando o ensaio de incorporação de *Mitostatus*, uma sonda fluorescente rapidamente sequestrada por mitocôndrias ativas sem indução de efeitos tóxicos. Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS Calibur e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10000 eventos serão coletados por amostra.

Análise do tipo de morte celular: o tipo de morte será avaliado pela marcação com anexina V-PE e 7-AAD. Após tratamento, células serão coletadas e incubadas com tampão de ligação, anexina V-PE e 7-AAD, de acordo com recomendações do fabricante (BD Biosciences, San

Diego, CA). Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10000 eventos serão coletados por amostra.

Análise estatística: Os resultados quantitativos serão apresentados de forma descritiva, representados por média aritmética com seu respectivo desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$). Serão avaliados utilizando Anova de uma via (*Oneway*), seguido de teste de *Tukey*, no programa estatístico *Prism GraphPad* versão 5.0. Todos os testes estatísticos serão considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. INFRAESTRUTURA E APOIO TÉCNICO

O centro destinado às atividades de Pesquisa e Pós-Graduação da UFCSPA caracteriza-se por possuir uma estrutura de laboratórios do tipo multiusuário, onde são compartilhados vários equipamentos, entre eles, balanças de precisão, aparelhos de eletroforese para géis de DNA e proteínas, microcentrífugas, autoclave, termocicladores, incubadoras e destiladores. A organização laboratorial vigente é composta por um professor/pesquisador responsável pelo laboratório, pessoal técnico (corresponsáveis pelo gerenciamento do laboratório e as condições de biossegurança), bem como os alunos de pós-graduação (pós-doutorado, doutorado e mestrado) e graduação (iniciação científica e trabalho de conclusão de curso). Os pesquisadores e estudantes envolvidos neste projeto possuem experiência no cultivo celular, no estudo de mecanismos de reparação de DNA em eucariotos e em química inorgânica e orgânica.

Além disso, parte do projeto será realizada em colaboração com o *Materials Research Intitute*, localizado no *Athlone Institute of Technology* (AIT), na Irlanda, onde o aluno de doutorado do PPG Biociências da UFCSPA, Jeferson Gustavo Henn (orientado pela Dra. Dinara Jaqueline Moura), se encontra realizando doutorado-sanduíche com bolsa financiada pelo CNPq. O local é um centro de referência no estudo de polímeros com aplicação médica, e esta etapa da pesquisa será supervisionada pelo Dr. Michael Nugent, professor do Departamento de Engenharia e Informática do AIT, com mais de 20 anos de experiência na área, tendo já estabelecido diversas parcerias com indústrias farmacêuticas.

6. CRONOGRAMA

Atividade	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Preparação e caracterização das NE	x	x	x					x	x			
Avaliação da citotoxicidade das NE			x	x	x				x	x		

Avaliação da disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e morte celular das NE				X	X	X			X	X		
Preparação e caracterização de PNP de PVA			X	X	X	X	X					
Avaliação da citotoxicidade de PNP de PVA					X	X	X					
Avaliação da disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e morte celular de PNP de PVA								X	X	X	X	X
Análise de resultados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração e manuscrito e relatórios							X				X	X

7. ORÇAMENTO e FINANCIAMENTO

Este projeto está orçado em R\$10.000,00 e será executado com recursos do Edital FAPERGS/MS/CNPq/SESRS PPSUS nº 03/2017, processo nº 17/2551-0001388-3.

8. EQUIPE

- Profa. Dinara Jaqueline Moura: docente do departamento de Farmacociências, UFCSPA
- Profa. Tanira Aguirre: docente do departamento de Farmacociências, UFCSPA
- Msc. Jeferson Henn: doutorando PPG Biociências, UFCSPA
- Matheus Bernardes Ferro: graduando do curso de Farmácia, UFCSPA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi, H. Catalase *in vitro*. Methods In Enzymology v.105, p.121-126, 1951.

Bahrami, B. et al. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. Immunology letters, v.190, p.64-83, 2017.

Canillas, M. et al. Bioactive Composites Fabricated by Freezing-Thawing Method for Bone Regeneration Applications. Polym Phys., v.54, p.761-73, 2016.

Chen, W. et al. Charge-conversional and reduction-sensitive poly(vinyl alcohol) nanogels for enhanced cell uptake and efficient intracellular doxorubicin release. J. Controlled Releas., v.205, p.15-24, 2015.

de Lima, G.G. et al. A novel pH-sensitive ceramic-hydrogel for biomedical applications. Polym Advan Tech., v.26, p.1439-46, 2015.

Druker, B. J. Imatinib: A Viewpoint by Brian J. Druker. *Drugs*, v.61, n.12, p.1775-1776, 2001.

Edick M. J. et al. Lymphoid gene expression as a predictor of risk of secondary brain tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, v.42, n.2, p.107-116, 2005.

Espuelas, M. S. et al. *In Vitro* Antileishmanial Activity of Amphotericin B Loaded in Poly(1-Caprolactone) Nanospheres. *Journal of Drug targeting*, v.10, n.8, p.593-599, 2002.

Flohé, L.; Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, v.105, p.114-121, 1984.

GLOBOCAN 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. International Agency for Research on Cancer, v.1.0, n.11, 2013.

Guntuku, L., Naidu, G. M., Yerra, V. G. Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds. *Current Neuropharmacology*, v.14, n.6, p.567-583, 2016.

Housman, G. et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*, v.6, p. 1769-1792, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA– BRASIL. INCA estima quase 600 mil casos novos de câncer para 2016. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/inca_estima_quase_600_mil_casos_novos_de_cancer_em_2016. 2015.

Junttila, M. R.; de Sauvage, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, v.19, n.501, p.346-354, 2013.

Liu, Y. et al. Self-assembled AgNP-containing nanocomposites constructed by electrospinning as efficient dye photocatalyst materials for wastewater treatment. *Nanomaterials*, v.8, n.35, p.1-14, 2018.

Misra, H. P., Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v.247, n.10, p.3170-3175, 1972.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH – ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Cancer Statistics. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. 2012.

Negrini, S. et al. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Molecular Cell Biology*, v.11, p.220-228, 2010.

Ohka, F., et al. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int*. ID 878425, 2012.

Ornelas, C. Application of ferrocene and its derivatives in cancer research. *New J. Chem*, v.35, p.1973-1985, 2011.

Ostrom, Q. T. et al. Current Understanding and Treatment of Gliomas. *Epidemiology of gliomas*. Springer, pp. 1–14, 2015.

Pourgholi, F. et al. Nanoparticles: novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomed. Pharmacother.*, v.77, p.98-107, 2016.

Singh, R.; Lillard, J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.*, v.86, n.3, p.215–23, 2009.

Tzeng, S.Y.; Green, J.J. Therapeutic nanomedicine for brain cancer, *Ther. Deliv.*, v.4, n.6, p.687–704, 2013.

Zhang, J. et al. Antitumor activity of electrospun polylactide nanofibers loaded with 5-fluorouracil and oxaliplatin against colorectal cancer. *Drug Delivery*, v.23, n.3, p.784-90, 2016.

Zinn, P. et al. Extent of resection and radiotherapy in GBM: A 1973 to 2007 surveillance, epidemiology and end results analysis of 21,783 patients. *International Journal of Oncology*, v.42, p.929-934, 2013.

Zlokovic B.V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.*, v.57, n.2, p.178–201, 2008.

Título da Proposta: Determinação de uma assinatura imune com valor prognóstico para a quimiorresistência em glioblastoma

Equipe Executora

Coordenadora: Profa Dra Elizandra Braganhol – DCBS – UFCSPA

Research ID: <http://www.researcherid.com/rid/G-8336-2011>

Currículo: <http://lattes.cnpq.br/3081112950297594>

Dra Anelise Bergmann Araujo, PhD (Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

Prof Dr Fabrício Figueiró, PhD (Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS)

Dr. Paulo Valdeci Worm, Neurocirurgião, PhD (Hospital São José; Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – ISCMPA)

Aline Moraes de Abreu, MD (Hospital Santa Rita, Radioterapia – ISCMPA)

Priscila O. De Souza, PhD – pós-doutoranda PPG Biociências

Lorraynne L.P. da Cruz – mestranda PPG Ciências da Saúde

Gabriela S. Lenz – Iniciação Científica - graduanda Medicina UFCSPA

Caracterização do problema

O glioblastoma (GB) é a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral primário. A cirurgia representa o tratamento de primeira escolha, seguida de radio/quimioterapia com o agente alquilante temozolomida (TMZ). Entretanto, essas estratégias demonstram eficácia limitada devido ao desenvolvimento de quimioresistência, o que resulta em uma sobrevida média de apenas 12 meses (Jones and Holland, 2012). A resistência a TMZ pode ocorrer via mecanismos intrínsecos e/ou adquiridos pelos gliomas, incluindo a superexpressão de O⁶-metilguanina metiltransferase (MGMT), a qual antagoniza a ação da TMZ ou mutações na p53 ou PARP (Dehdashti et al, 2006; Nagasubramanian and Dolan, 2003; Roos et al, 2007). Contudo, alguns tumores podem desenvolver resistência a TMZ independente dos fatores anteriores, sugerindo que outros mecanismos não conhecidos podem estar envolvidos.

Evidências apontam que a complexidade do microambiente dos gliomas, o qual é composto por células neoplásicas e não-neoplásicas, podem contribuir individualmente para a tumorigênese, progressão e resposta ao tratamento. A maioria das células não- neoplásicas são macrófagos e microglia associados ao tumor (TAMs/GAM), as quais criam um estroma de suporte para a progressão tumoral (Sarkaria et al 2008). TAM são recrutados para o microambiente dos GBs e podem liberar fatores de crescimento e citocinas em resposta aos fatores produzidos pelo tumor. Dessa forma, TAMs facilitam a proliferação, migração tumoral e possivelmente a quimioresistência

Hambardzumyan et al, 2016; Mantovani et al, 2017).

Fisiologicamente, os macrófagos apresentam um espectro de ativação caracterizado por dois extremos: M1 (ativação clássica/pró-inflamatória) caracterizada pela expressão de HLA-DR, produção de TNF- α e de espécies reativas podendo apresentar atividade anti-tumoral; ou M2 (ativação alternativa/anti-inflamatória) o qual apresenta elevada atividade da arginase, expressão de CD163 e CD206, produção de IL-10, TGF- β e VEGF. Tais macrófagos participam da angiogênese e do remodelamento tecidual, eventos intimamente relacionados com a progressão tumoral (Martinez and Gordon, 2014).

Em GBs, apesar da população de TAM/GAMs constituir cerca de 30-50% da massa tumoral, os mecanismos que controlam a resposta protumoral e a participação dessas células na quimioresistência permanecem pouco elucidados (Feng et al, 2005). Em modelos animais, dados sugerem que TAM podem limitar a efetividade de agentes citotóxicos e que macrófagos tipo-M2 se acumulam em áreas perivasculares após a quimioterapia, induzindo reconstituição tecidual (Hughes et al, 2015). Dados do nosso grupo indicam que gliomas resistentes a TMZ são mais eficientes em induzir um fenótipo imunossupressivo dos macrófagos os quais, por sua vez, favorecem o crescimento *in vitro* e *in vivo* dos gliomas em modelo animal (Azambuja et al, 2017). Além disso, análises *in silico* indicam que assinaturas de processos inflamatórios associados aos TAM são super-reguladas em GB de fenótipo mais agressivo e correlacionam com pior prognóstico (Zanotto-Filho et al, 2017). Assim, as interações entre células tumorais e TAM estabelecem um ecossistema tumoral único, as quais oferecem novas oportunidades para alvos terapêuticos, marcadores prognósticos e diagnósticos.

Hipótese do estudo

Apesar de muitas evidências conectarem câncer e inflamação e os macrófagos constituírem um elemento essencial da resposta imune inata, a relação entre TAM/GAM e a quimioresistência no GB ainda é pouco conhecida. Considerando que a progressão do GB resulta na formação de áreas de necrose e de morte do tecido adjacente ao tumor, nós hipotetizamos que esse processo pode modular a ativação e a imunossupressão de macrófagos e microglia associados ao tumor. Assim, a educação dos macrófagos/microglia para um fenótipo tipo-M2 culminaria na indução de NF- κ B e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que tem como principais consequências: (1) promoção da sobrevivência das células tumorais, quimioresistência e, então, progressão tumoral e (2) regulação da resposta imune no microambiente tumoral recrutamento e modulação do fenótipo imunossupressor das células imunes associadas ao tumor. A elucidação dessas vias pode ser importante para melhor compreender os mecanismos de quimioresistência e,

assim, criar estratégias terapêuticas para contornar esse grave problema no manejo clínico de pacientes com GB.

Objetivos e Metas

Objetivo geral: Analisar a participação dos TAM/GAM no desenvolvimento de resistência em GB, determinando uma assinatura imune com valor prognóstico.

Por meio da utilização de abordagens *in vitro* utilizando cultura de células (*objetivos específicos 1-3*) e *ex vivo* por meio da análise de biópsias de GB extraídas de pacientes a partir de cirurgia (*objetivos específicos 4-6*), pretendemos alcançar as seguintes metas:

1) Desenvolvimento de uma linhagem de GB humano resistente a TMZ

Meta: Obtenção de uma linhagem de GB humano (U87MG) resistente à ação do quimioterápico TMZ ao final do primeiro trimestre de execução da proposta.

2) Padronização de cultura de macrófagos humanos e avaliação de seu fenótipo frente aos estímulos clássicos de polarização pró-inflamatória (LPS+INF γ) ou anti-inflamatória (IL-4)

Meta: Inserir na rotina do laboratório a execução da cultura primária de macrófagos humanos até o final do primeiro semestre de execução da proposta.

3) Avaliação do impacto da quimioresistência em gliomas sobre a polarização de cultura de macrófagos humanos.

Meta: Implantar no laboratório a técnica de citometria de fluxo multiplex; determinar o potencial de células quimioresistentes em induzir um fenótipo anti-inflamatório dos TAM até o final do primeiro ano de execução da proposta.

4) Classificação das amostras de GB de pacientes em subclasses moleculares distintas (clássico, mesenquimal e proneural), as quais tem relação com sobrevida.

Meta: Coleta das amostras dentro do cronograma previsto; isolamento de DNA com pureza e qualidade adequada para a realização das análises de sequenciamento; disponibilização dos resultados obtidos para que os médicos responsáveis possam utilizá-los no cuidado dos pacientes participantes do estudo.

5) Avaliação fenotípica dos TAM/GAM em biópsias de GB de pacientes.

Meta: Implementação de uma logística eficiente que permita o rápido processamento de biópsias

frescas de GB; padronização do isolamento dos TAM/GAM com posterior análise por tripla marcação dos marcadores de polarização de macrófagos/microglia por FACS.

6) Avaliação de possíveis correlações entre a presença de TAM/GAM com as características de malignidade dos GBs, o desfecho clínico e o desenvolvimento de quimioresistência.

Meta: Registro correto e completo das informações clínicas e dos exames de acompanhamento dos pacientes e a adesão dos voluntários ao estudo.

Metodologia e estratégia de ação:

Conforme apresentado abaixo, uma estratégia de ação foi estabelecida para a execução de cada objetivo específico (OE) delineado. Na sequência, está apresentada a metodologia de forma mais detalhada.

OE 1. Desenvolvimento de uma linhagem de glioma resistente a TMZ: Uma linhagem celular de GB humano (U87MG) será exposta a concentrações crescentes de TMZ até tornar-se insensível a toxicidade induzida pela TMZ (Oliva et al., 2010). A linhagem controle ou resistente a TMZ será utilizada para as análises subsequentes. O desenvolvimento de quimioresistência será avaliado utilizando as seguintes metodologias:

- a) Determinação da viabilidade celular das linhagens sensíveis ou quimioresistentes a TMZ utilizando o ensaio de MTT [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-diphe-nyltetrazolium brometo];
- b) Avaliação do tipo de morte celular por ensaio de marcação de iodeto de propídeo (PI) e anexina V por citometria de fluxo.

OE 2. Padronização de cultura de macrófagos humanos e avaliação de seu fenótipo frente aos estímulos clássicos de polarização pró-inflamatória (LPS+INF γ) ou anti-inflamatória (IL-4):

Sangue de indivíduos saudáveis será utilizado para o isolamento dos monócitos mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (CEP aprovação nr: 3.204.937). Isolamento dos monócitos a partir de sangue total utilizando o gradiente de Ficoll-Histopaque.

- a) Diferenciação dos monócitos em macrófagos: os monócitos obtidos serão diferenciados utilizando o M-CSF (50 ng/mL) por um tratamento de 7 dias.
- b) Caracterização da pureza dos monócitos obtidos será determinada pela capacidade dessas células em se aderirem ao plástico e por citometria de fluxo para o marcador CD14.
- c) Análise da expressão dos marcadores de membrana por citometria de fluxo: HLA-DR - marcador fenótipo M1, CD163 - marcador fenótipo M2 após a exposição ao LPS+INF γ ou a IL-4.

OE 3. Avaliação do impacto da quimioresistência em gliomas sobre a polarização de cultura

de macrófagos humanos: As culturas de macrófagos humanos serão expostas ao meio condicionado (previamente preparado) ou cocultivados diretamente com células de glioma sensíveis ou resistentes a TMZ. Após, a polarização dos macrófagos (tipo-M1: antitumoral, tipo-M2: pró-tumoral) será avaliada utilizando as seguintes metodologias:

- a) Ensaio de determinação de expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR): Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) - marcador fenótipo M1, e FIZZ1 e Arginase-1 (Arg-1) - marcadores de fenótipo M2;
- b) Análise da expressão dos marcadores de membrana por citometria de fluxo: HLA-DR - marcador fenótipo M1, CD163 - marcador fenótipo M2;
- c) Determinação de marcadores bioquímicos: produção de ON - marcador fenótipo M1.

OE 4. Classificação das amostras de GB de pacientes em subclasses moleculares distintas, as

quais tem relação com sobrevida. Na prática clínica, os GBs são distinguidos por análise histológica e pela expressão de MGMT. Entretanto, com a identificação recente das assinaturas moleculares dos GBs, é possível estratificá-los em clássico, mesenquimal e proneural de acordo com a expressão gênica de EGFR, NF1, e PDGFRA/IDH1, respectivamente (Hu et al, 2017). Tal estratificação pode fornecer dados importantes sobre a resposta ao tratamento e auxiliar no entendimento de quais GBs são mais suscetíveis a quimioresistência e se estão associados à presença de macrófagos tipo-M2. Após coleta do TCLE (CEP aprovação 3.204.937), amostras frescas de GB obtidos de pacientes a partir de procedimento cirúrgico serão armazenadas em RNALater e processadas por seqüenciamento analisando a expressão de EGFR, NF1 e PDGFRA/IDH1.

OE 5. Avaliação fenotípica dos TAM/GAM em biópsias de GB de pacientes e dosagem de

mediadores inflamatórios séricos: Devido às características imunossupressoras e protumorais dos TAM/GAM, nós hipotetizamos que eles podem contribuir para o desenvolvimento de quimioresistência. A caracterização do fenótipo dos TAM/GAM será realizada em GBs por meio das seguintes análises: expressão de HLA-DR, CD163 e CD204 por citometria de fluxo (FACS); expressão gênica de iNOS, FIZZ1 e Arg-1 e determinação das citocinas (IL6, IL8, IL1 β , MCP1, IL10 e CHI3L1) por qPCR no tecido tumoral e por ELISA no soro. Tal painel de moléculas foi escolhido devido a sua potencial aplicação como assinatura imune de TAM/GAM em estudos *in silico*¹³.

OE 6. Avaliação de possíveis correlações entre a presença de TAM/GAM e a produção de citocinas com as características de malignidade dos GBMs, o desfecho clínico e o desenvolvimento de quimioresistência: Utilizando tratamento estatístico, os dados experimentais serão confrontados com os achados clínicos dos pacientes com o objetivo de determinar uma assinatura imune com valor prognóstico para a determinação de quimioresistência.

Metodologia detalhada

Abordagem *in vitro* - Análises utilizando cultura de células

Cultura da linhagem de gliomas: A linhagem celular de glioma humano (U87MG) adquirida da *American Type Culture Collection (ATCC)* será mantida em meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco) contendo 0,1% de fungizona e 100 U/L de penicilina e estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativo e mantida em incubadora de células a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Desenvolvimento de resistência a TMZ: Com o intuito de produzir uma linhagem celular quimioresistente, as células de U87MG serão tratadas com TMZ (Sigma-Aldrich Co) preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em DMEM sem SFB em concentrações crescentes (2,5-2,560 µM), durante 24 h e seguirão por um período de recuperação de em média 7 dias. Após induzida a resistência, a linhagem U87TMZ será mantida em 160 µM de TMZ, conforme descrito previamente por Oliva et al. (2010). A confirmação de quimioresistência será realizada através de ensaio de MTT [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-diphe-nyltetrazolium brometo] e por citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídeo e Annexin V (Zanotto-Filho et al, 2015). Células não expostas a TMZ serão utilizadas como controle.

Cultura de macrófagos humanos: Os monócitos serão isolados a partir de sangue total utilizando o gradiente de Ficoll-Histopaque previamente descrito (Menck et al., 2014). Os monócitos serão separados das demais células mononucleares utilizando a sua característica de aderência e positividade para CD14, a qual será determinada por citometria de fluxo. Para a realização da cultura de macrófagos humanos, os monócitos isolados serão diferenciados a macrófagos através do estímulo com CSF-M (50 ng/mL) em meio de cultura RPMI1640/10% SFB por uma semana conforme descrito por Jin & Kruth (2016). Controles positivos para a polarização de macrófagos M1 ou M2 será realizada a partir da exposição dos macrófagos maduros ao LPS (100 ng/mL) + INFγ (20 ng/mL) ou a IL-4 (10 ng/mL), respectivamente.

Exposição ao meio condicionado ou cocultura: Para a produção do meio condicionado (MC) de glioma das linhagens U87 e U87TMZ, as células serão semeadas em uma densidade de 5 x 10⁵ células em garrafas de cultura de 75 cm². Ao atingirem subconfluência, o meio DMEM/10% SFB

será trocado por um DMEM/10% SFB fresco o qual permanecerá em contato com as células por 24 h. O MC será então coletado, centrifugado (10 min – 1000 *g*) e mantido a -80 °C até o momento do uso.

Após a diferenciação dos macrófagos, os mesmos serão expostos ao MC da linhagem U87 ou U87TMZ, ou diretamente cocultivados com U87 ou U87TMZ na proporção 30:1 macrófagos/células tumorais. As análises serão realizadas 24 h após a exposição (Azambuja et al., 2017).

Determinação de expressão gênica: iNOS, FIZZ1 e Arg-1: O RNA total da linhagem de macrófagos após a exposição ao MC ou ao cocultivo com as linhagens U87MG sensível ou resistente a TMZ será extraído, e após quantificação, o DNA complementar (cDNA) será sintetizado pela reação da transcriptase reversa. O cDNA sintetizado será utilizado como *template* para as reações de eletroforese em gel de agarose e PCR em tempo real (qPCR) utilizando *primers* específicos para as proteínas iNOS, FIZZ1 e Arg-1 e para o gene constitutivo. Os experimentos serão realizados utilizando kits específicos e seguindo as recomendações do fabricante.

Expressão dos marcadores de membrana HLA-DR e CD163: Para avaliar os marcadores de membrana HLA-DR marcador de macrófagos tipo-M1, e CD163 marcador de macrófagos tipo-M2, serão utilizados anticorpos primários marcados com fluorescência, para posterior análise por citometria de fluxo (Grugan et al., 2012).

Aspectos bioquímicos - liberação de ON: Para determinação do ON no meio de cultura dos macrófagos submetidos ao MC ou em cocultivo, será utilizada a reação de Griess (Stuehr e Nathan, 1989), onde é adicionado ao meio coletado sulfonilamida em 5% de ácido fosfórico, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, é adicionado n-1l-naphthylethylenediamine - NED 0,1%, seguido por incubação de 10 minutos no escuro para terminar a reação. A concentração de ON será determinada em espectrofotômetro a 540 nm, e os valores determinados através de uma curva padrão de nitrato de sódio.

Abordagem ex vivo - Análises que serão realizadas em biópsias de GB de pacientes

Nesse estudo, serão recrutados pacientes em atendimento no setor de neurocirurgia do Hospital São José (Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – ISCMPA). Serão respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nº 466 de 12 de Dezembro de 2012. Todos os pacientes que aceitarem participar da pesquisa assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Será assegurado o direito à confiabilidade dos dados e o cuidado na utilização das informações nos trabalhos escritos, de modo que os participantes não possam ser identificados (CEP aprovação 3.204.937).

CrITÉRIOS de inclusÃO dos pacientes: O paciente de ambos os sexos, ter no mÍnimo 18 anos de idade e no mÁximo 75 anos. O paciente ter diagnÓstico de GB confirmado por exame histopatolÓgico, de qualquer linhagem molecular. Lactentes e grÁvidas nÃO participarÃO do estudo.

Coleta de biÓpsias de GBs: O procedimento cirÚrgico serÁ conduzido de forma habitual, sem acrescentar ou remover etapa da tÉcnica padrÃO necessÁria durante a remoÇÃO do tumor. Os fragmentos tumorais serÃO retirados e submetidos a distintos tipos de anÁlise: 1) amostras armazenadas em PFA-10% (realizaÇÃO da anÁlise histopatolÓgica por HE, a fim de caracterizar o tipo tumoral e avaliar o grau de malignidade do mesmo; 2) amostras que serÃO armazenadas em **(a)** tampÃO PBS que tem como finalidade proteger o tecido tumoral e manter a integridade celular para a extraÇÃO de macrófagos associados ao tumor e **(b)** RNAlater amostras que serÃO utilizadas para as anÁlises moleculares de qPCR e sequenciamento.

Coleta de dados clÍnicos: Os dados clÍnicos e de seguimento dos pacientes serÃO coletados pelo mÉdico responsÁvel e colaborador desse estudo ao longo do tratamento do paciente.

ObtenÇÃO dos macrófagos/microglia associados ao tumor: Os macrófagos/microglia serÃO isolados utilizando o gradiente de Ficoll, conforme previamente descrito (Lu-Emerson et al, 2013). As amostras serÃO submetidas À citometria de fluxo a fim de quantificar a expressÃO de HLA-DR, CD163 e CD206 baseado na imunodeteçÃO com anticorpo secundÁrio marcado com fluorescência. As citocinas IL6, IL8, IL1 β , MCP1, IL10 e CHI3L1 serÃO determinadas utilizando kit CBA, seguindo as recomendaÇões do fabricante (BD).

PCR em tempo real (qPCR): O RNA total serÁ extraÍdo a partir das amostras utilizando kit especÍfico e o cDNA serÁ sintetizado pela reaÇÃO da transcriptase reversa seguindo as recomendaÇões do fabricante (LifeTechnologies). O cDNA sintetizado serÁ utilizado como template para as reaÇões de qPCR utilizando primers especÍficos para os genes alvo do estudo.

Sequenciamento: serÁ realizado a partir de 1 μ g de DNA previamente purificado utilizando Illumina HiSeq 2000 conforme descrito (Cho et al, 2017).

CÁlcULO do tamanho da amostra: O CÁlcULO do tamanho amostral foi realizado com o auxÍlio do serviÇO de estatística da UFCSPA considerando um erro α de 0.05 e um poder $(1 - \beta)$ 0.90 e o valor de “N” estimado foi de 50 pacientes e 50 indivÍduos pareados por sexo e idade que serÃO utilizados como controle para as anÁlises realizadas em soro. Para a realizaÇÃO das culturas primÁrias de macrófagos humanos, o “N” estimado foi de 15 indivÍduos, utilizando os mesmos critÉrios estatísticos.

AnÁlise estatística: Os resultados obtidos neste estudo serÃO analisados atravÉS do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”). Os dados bioquÍmicos serÃO analisados

pela ANOVA de uma via seguida pelo teste múltiplo de Duncan quando indicado.

Resultados e impactos esperados

Apesar dos TAM/GAM constituírem cerca de 30-50% da população de células não-transformadas presentes no microambiente tumoral (Feng et al, 2015), a contribuição específica da microglia residente e dos monócitos/macrófagos infiltrados na progressão do GB ainda é pouca conhecida (Mantovani et al, 2017). Além disso, a participação dessas células no desenvolvimento de quimioresistência em humanos ainda não foi elucidada. Considerando que os ciclos de radio-quimioterapia resultam em extensiva morte celular com consequente liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs), como fragmentos de DNA/RNA, glutamato, ATP entre outros (Vajjahala et al, 2017), nós hipotetizamos que os DAMPs, via ativação de receptores específicos da resposta imune inata como os receptores do tipo Toll e NOD expressos por células tumorais (Lin et al, 2017), culminaria na indução de NF- κ B e consequente produção de citocinas (IL6, IL8, IL1 β , MCP1, IL10 e CHI3L1). Tais mediadores inflamatórios poderiam ter como principais consequências: (1) promoção da sobrevivência das células tumorais, quimioresistência e, então, progressão tumoral e (2) regulação da resposta imune no microambiente tumoral recrutamento e modulação imunossupressiva (tipo-M2) do fenótipo de macrófagos/microglia. Com base nessa ideia, a expectativa é que os GBs do subtipo mesenquimal, o qual apresenta fenótipo mais agressivo, apresente uma maior população de TAM/GAM do tipo-M2 associadas ao tecido tumoral, seguida de uma maior expressão gênica das citocinas (IL6, IL8, IL1 β , MCP1, IL10 e CHI3L1) quando comparado aos GBs de classificação clássica ou proneural. Com relação à análise da liberação sérica das citocinas selecionadas, um aumento progressivo dessas moléculas sinalizadoras é esperado com a progressão tumoral e com o desenvolvimento de quimioresistência. Tais citocinas presentes no soro dos pacientes, particularmente nos quimioresistentes, também poderiam ser mais efetivas em recrutar e polarizar os monócitos da periferia em macrófagos tipo-M2 associados ao tumor, completando um ciclo de retroalimentação positiva de progressão e de resistência tumoral. Assim, a prevalência desses fatores imunossupressores poderia resultar em um pior desfecho clínico dos pacientes. A elucidação dessas vias pode ser importante para melhor compreender os mecanismos de quimioresistência e, assim, determinar uma assinatura imune com valor prognóstico que auxilie o manejo clínico dos pacientes e que crie novos alvos terapêuticos de intervenção.

Cronograma, riscos e dificuldades.

Meses de Execução da Proposta

Atividades	1-6°	6-12°	12-18°	18-24°	24-30°	30-36°
Desenvolvimento de uma linhagem de glioma resistente a TMZ	X					
Padronização de cultura de macrófagos humanos e avaliação de seu fenótipo frente aos estímulos clássicos	X					
Avaliação do impacto da quimioresistência em gliomas sobre a polarização de cultura de macrófagos humanos	X	X				
Classificação das amostras de GB de pacientes em subclasses moleculares distintas		X	X	X	X	
Avaliação fenotípica dos TAM/GAM em biópsias de GB de pacientes		X	X	X	X	
Avaliação de possíveis correlações clínicas com os dados encontrados				X	X	X
Divulgação de resultados			X	X	X	X
Elaboração de relatório técnico e prestação de contas						X

Riscos e Dificuldades atrelados a cada um dos objetivos específicos delineados

1. Desenvolvimento de uma linhagem de glioma resistente a TMZ: risco da linhagem de glioblastoma humano U87MG entrar em processo de senescência após o desenvolvimento do protocolo de quimioresistência; risco de contaminação microbiológica das culturas.
2. Padronização de cultura de macrófagos humanos e avaliação de seu fenótipo frente aos estímulos clássicos: disponibilidade limitada de amostras de sangue; dificuldade em isolar

uma população enriquecida em monócitos; dificuldade em manter o padrão de diferenciação entre as diferentes culturas primárias realizadas.

3. Avaliação do impacto da quimioresistência em gliomas sobre a polarização de cultura de macrófagos humanos: dificuldade para padronizar a marcação multiplex por citometria de fluxo em culturas mistas (particularmente no protocolo de co-cultivo de macrófagos e glioma U87MG), as quais apresentarão elevada heterogeneidade tumoral.
4. Classificação das amostras de GB de pacientes em subclasses moleculares distintas: dificuldade no recrutamento, coleta de amostras de pacientes ou riscos de perda de integridade do material genético por questões de coleta ou de armazenamento indevido.
5. Avaliação fenotípica dos TAM/GAM em biópsias de GB de pacientes: dificuldades semelhantes as relatadas acima (item 3).
6. Avaliação de possíveis correlações clínicas com os dados encontrados: riscos relacionados a falta de informações na evolução dos pacientes no prontuário médico.

Orçamento

ORÇAMENTO						
Material de Consumo						
Material de Consumo						
Apagar	Especificação	Mês	Quantidade	Custo Unitário	Custo Total	Opções
☐	Meio de cultura	2º	3	R\$300,00	R\$900,00	
☐	soro fetal bovino	2º	3	R\$350,00	R\$1.050,00	
☐	placas para cultura de cél...	6º	100	R\$7,00	R\$700,00	
☐	Ficoll-Histopaque	2º	3	R\$682,00	R\$2.046,00	
☐	GM-CSF	2º	2	R\$1.250,00	R\$2.500,00	
☐	RNA latter	6º	1	R\$500,00	R\$500,00	
☐	kit reação transcriptase r...	10º	1	R\$1.500,00	R\$1.500,00	
☐	primers	6º	10	R\$300,00	R\$3.000,00	
☐	anticorpos para FACS	25º	6	R\$1.300,00	R\$7.800,00	
Total					R\$ 19.996,00	

➤ ORÇAMENTO

Material Permanente e Equipamentos

Cadastre apenas o orçamento de menor valor.

Obs. Senhor Pesquisador não esqueça de incluir no valor final do equipamento todas as taxas de importação do mesmo, caso seja necessário.

Material Permanente e Equipamentos						
Apagar	Especificação	Mês	Quantidade	Custo Unitário	Custo Total	Opções
	centrifuga de bancada	13º	1	R\$10.000,00	R\$10.000,00	
Total					R\$ 10.000,00	

Orçamento total solicitado

- Material de custeio: R\$ 19.996,00
- Capital: R\$ 10.000,00

Referências bibliográficas

- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D.T. Glioblastoma Multiforme: Pathogenesis And Treatment. Pharmacology & Therapeutics, V. 152, P.63-82, 2015.
- AUGER N. et al. Genetic Alterations Associated With Acquired Temozolomide Resistance In SNB-19, A Human Glioma Cell Line. Mol Cancer Ther, V. 5, P. 2182-2192, 2006.
- AZAMBUJA, J. H.; DA SILVEIRA, E.; DE CARVALHO, T.R; Et Al. Glioma Sensitive Or Chemoresistant To Temozolomide Differentially Modulate Macrophage Protumor Activities. Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects, P. S0304-4165, 2017.
- BURGER P.C.; COHEN K.J.; ROSENBLUM M.K.; TIHAN T. Pathology Of Diencephalic Astrocytomas. Pediatric Neurosurgery, V. 32, N.4, P. 214-9, 2000.
- Chemokine System In Diverse Forms Of Macrophage Activation And Polarization. Trends Immunol, V. 25, P. 677-86, 2004.
- CHO SY et al. High prevalence of TP53 mutations is associated with poor survival and an EMT signature in gliosarcoma patients. Exp Mol Med. 2017 Apr 14;49(4):e317. doi: 10.1038/emm.2017.9.
- CLASSEN, A.; LOBERAS, J.; CELADA, A. Macrophage Activation: Classical Vs. Alternative. Macrophages And Dendritic Cells, P.29-43, 2009.
- DEHDASHTI A et al. New trends in the medical management of glioblastoma multiforme: the

role of temozolomide chemotherapy. *Neurosurg Focus*. 2006, 20(4):E6.

FENG X, et al. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*. 2015, 6(17):15077-94.

GIERYNG, A.; PSZCZOLKOWSKA, D.; WALENTYNOWICZ, K. A.; RAJAN, W. D.; KAMINSKA, B. Immune Microenvironment Of Gliomas. *Laboratory Investigation*, V. 97, N. 5, P.498-518, 2017.

GORDON, S.; MARTINEZ F. O. Alternative Activation Of Macrophages: Mechanism And Functions. *Immunity*, V. 32, P. 593–604. 2010

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MARTINEZ, F.E. Macrophage Heterogeneity In Tissues: Phenotypic Diversity And Functions. *Immunological Reviews*. V. 262, N. 1, P.36-55, 2014.

GRUGAN, K. D.; et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Invasion While Retaining Fc-Dependent Anti-Tumor Function. *The Journal Of Immunology*, V. 189, N. 11, P.5457-5466, 2012.

HAMBARDZUMYAN, D.; GUTMANN, D. H.; KETTENMANN, H. The Role Of Microglia And Macrophages In Glioma Maintenance And Progression. *Nature Neuroscience*, V. 19, N. 1, P. 20-27, 2016.

HOLLAND E.C. Progenitor Cells And Glioma Formation. *Current Opinion In Neurology*, V. 14, N. 6, P.683-8. 2001.

HU X et al. Multigene signature for predicting prognosis of patients with 1p19q co-deletion diffuse glioma. *Neuro Oncol*. 2017, 19(6):786-795. doi: 10.1093/neuonc/now285.

HUGHES R, et al. Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res*. 2015, 75(17):3479-91. doi: 10.1158/0008- 5472.CAN-14-3587.

HUSE, J.T.; HOLLAND, E.C. Targeting Brain Cancer: Advances In The Molecular Pathology Of Malignant Glioma And Medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer*, V. 10, N. 5, P.319-331, 2010.

JIN, X., KRUTH, H.S. Culture of Macrophage Colony-stimulating Factor Differentiated Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Vis. Exp.* (112), e54244, doi:10.3791/54244 (2016).

JONES TS, HOLLAND EC. Standard of care therapy for malignant glioma and its effect on tumor and stromal cells. *Oncogene*. 2012, 31(16):1995-2006.

KOMOHARA, Y.; OHNISHI, K.; KURATSU, J.; TAKEYA, M. Possible Involvement Of The M2 Anti-Inflammatory Macrophage Phenotype In Growth Of Human Gliomas. *Journal Of Pathology*, V. 216, N. 1, P. 15–24, 2008.

LE CALVE, B.; RYNKOWSKI, M.; LE MERCIER, M.; BRUYÈRE, C.; LONEZ, C.; GRAS, T.; HAIBE-KAINS, B.; BONTEMPI, G.; DECAESTECKER, C.; RUYSSCHAERT, J. M.; KISS, R.; LEFRANC, F. Long-Term In Vitro Treatment Of Human Glioblastoma Cells With Temozolomide Increases Resistance In Vivo Through Up-Regulation Of Glut Transporter And Aldo-Keto

Reductase Enzyme Akr1c Expression. *Neoplasia*, V. 12, P. 727-739, 2010.

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER B.W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification Of Tumours Of The Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, V. 114, N. 2, P.97-109, 2007.

LU-EMERSON C et al. Increase in tumor- associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2013, 15(8):1079-87. doi: 10.1093/neuonc/not082.

MACKANESS G. B. Cellular Resistance To Infection. *J Exp Med*, V. 116, P. 381-406, 1962.

MANTOVANI A.; SICA A.; SOZZANI S.; ALLAVENA P.; VECCHI A.; LOCATI M. The MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; MALESCI, I. A.; LAGHI, L.; ALLAVENA, P. Tumour-Associated Macrophages As Treatment Targets In Oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, V. 14 N.7, P. 399-416, 2017.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 And M2 Paradigm Of Macrophage Activation: Time For Reassessment. *F1000prime Reports*, V. 13, N. 6, P.1-13, 2014.

MENCK, K., BEHME, D., PANTKE, M., REILING, N., BINDER, C., PUKROP, T., KLEMM, F. Isolation Of Human Monocytes By Double Gradient Centrifugation And Their Differentiation To Macrophages In Teflon-Coated Cell Culture Bags. *J. Vis. Exp*, V. 91, E51554, 2014.

NAGASUBRAMANIAN R.; DOLAN M.E. Temozolomide: Realizing The Promise And Potential. *Current Opinion In Oncology*, V. 15, P 412–418, 2003.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms To Therapy. *Immunity*, V. 41, P. 49–61, 2014.

OLEFSKY J.M.; GLASS, C.K. Macrophages, Inflammation, And Insulin Resistance. *Annu Rev Physiol* V. 72, P. 219–246, 2010.

OLIVA, C.R.; NOZELL S.E.; DIERS A.; Et Al. Acquisition Of Temozolomide Chemoresistance In Gliomas Leads To Remodeling Of Mitochondrial Electron Transport Chain. *Journal Of Biological Chemistry*, V. 285, N. 51, P.39759-39767, 2010.

PERAZZOLI, G.; PRADOS, J.; ORTIZ, R.; CABA, O.; CABEZA, L.; BERDASCO, M.; GÓNZALEZ, B.; MELGUIZO; C. Temozolomide Resistance In Glioblastoma Cell Lines: Implication Of MGMT, MMR, P-Glycoprotein And CD133 Expression. *Plos One*, V. 10, N. 10, P.1-23, 2015.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN I.L. Stem Cells, Cancer, And Cancer Stem Cells. *Nature*. 414, 105-111, 2001.

ROOS W.P.; BATISTA L.F.; NAUMANN S.C.; WICK W.; WELLER M.; MENCK C.F.; KAINA B. Apoptosis In Malignant Glioma Cells Triggered By The Temozolomide-Induced Dna Lesion

O6-Methylguanine. *Oncogene*, V. 26, N. 2, 186-197, 2007.

SARKARIA J.N.; KITANGE G.J.; JAMES C.D.; PLUMMER R.; CALVERT H.; WELLER M.; WICK W. Mechanisms Of Chemoresistance To Alkylating Agents In Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*, V. 14, P. 2900-2908, 2008.

STUEHR D.J.; NATHAN C.F. Nitric Oxide. A Macrophage Product Responsible For Cytostasis And Respiratory Inhibition In Tumor Target Cells, *J. Exp. Med.* V. 169, P. 1543–1555, 1989.

STUPP, R. TONN J.C.; BRADA M.; PENTHEROUDAKIS G. High-Grade Malignant Glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines For Diagnosis, Treatment And Follow-Up. *Annals Of Oncology*, V. 21, N. 5, P.190-193, 2010.

VAN GINDERACHTER, J.; MOVAHEDI, K.; HASSANZADEH GHASSABEH G.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIN, A.; RAES, G.; DE BAETSELIER, P. Classical And Alternative Activation Of Mononuclear Phagocytes: Picking The Best Of Both Worlds For Tumor Promotion. *Immunobiology*, V. 211, N. 6-8, P.487-501, 2006.

WONG, S.C.; PUAUX, A.L.; CHITTEZHATH M., Et Al. Macrophage Polarization To A Unique Phenotype Driven By B Cells. *European Journal Of Immunology*, V. 40, N. 8, P. 2296-2307, 2010.

YIP, S.; MIAO J.; CAHILL D.P.; IAFRATE A.J.; ALDAPE K.; NUTT C.L.; LOUIS D.N. MSH6 Mutations Arise In Glioblastomas During Temozolomide Therapy And Mediate Temozolomide Resistance. *Clinical Cancer Research*, V. 15, N. 14, P.4622-4629, 2009.

ZANOTTO-FILHO, A. Et Al. Autophagy Inhibition Improves The Efficacy Of Curcumin/Temozolomide Combination Therapy In Glioblastomas. *Cancer Letters*, V. 358, N. 2, P.220-231, 2015.

ZANOTTO-FILHO, A.; GONÇALVES R.M.; KLAFKE K.; Et Al. Inflammatory Landscape Of Human Brain Tumors Reveals An Nfkb Dependent Cytokine Pathway Associated With Mesenchymal Glioblastoma. *Cancer Letters*, V. 390, P.176-187, 2017.

ZENG, H.; YANG Z.; XU N.; LIU B.; FU Z.; LIAN C.; GUO H. Connective Tissue Growth Factor Promotes Temozolomide Resistance In Glioblastoma Through TGF-B1-Dependent Activation Of Smad/ERK Signaling. *Cell Death And Disease*, V. 8, N. 6, E2885, 2017.

ZHANG, L.; LIU, W.; ALIZADEH, D. S100B Attenuates Microglia Activation In Gliomas: Possible Role Of STAT3 Pathway. *Glia*, V. 59, N. 3, P. 486–498, 2011.

ZHOU, W.; KE, S. Q.; HUANG, Z.; FLAVAHAN, W.; FANG, X.; PAUL, J.; WU, L.; SLOAN A. E.; MCLENDON, R.E.; LI, X.; RICH, J. N.; BAO, S. Periostin Secreted By Glioblastoma Stem Cells Recruits M2 Tumour-Associated Macrophages And Promotes Malignant Growth. *Nature Cell Biology*, V. 17, N. 2, P.170-182, 2015.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROJETO DE PESQUISA

Investigação de metodologias alternativas para a extração de ácidos nucleicos

Dados Gerais do Projeto

Responsável: Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3106279436590490>

Líder do Grupo de Pesquisas em Espectrometria de Massas – UFCSPA
<http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/520178>

Colaboradores:

- Profa. Dr. Danielle Trentin

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3005629333520779>

- Dr. Paulo Guilherme Markus Lopes

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0280182736721337>

- Luiz Carlos Ferreira Neto (Mestrando PPG-Biociências)

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2433305920809138>

Área prioritária: Ciências Exatas e da Terra/Química

Porto Alegre, abril de 2021.

Resumo

O presente projeto engloba as atividades que serão desenvolvidas junto a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) envolvendo a proposta de uma metodologia analítica alternativa para a extração de DNA. Como relatado em diversos estudos, a extração de DNA apresenta-se como um ponto crítico nas determinações desta biomolécula em diversos tipos de amostras. Desta forma, a metodologia de extração proposta é baseada em técnicas modernas e ambientalmente corretas de preparo de amostra, as quais apresentam baixo custo, consumo reduzido de solventes e simplicidade de aplicação. Além disso, a utilização do sistema *96-well plate* permitirá a aplicação em até 96 amostras simultaneamente. Nesse projeto, será realizada a verificação da viabilidade de extração de DNA através da utilização de líquidos iônicos magnéticos (MILs), sendo também otimizações das condições de extração. Tendo em vista a grande necessidade e aplicabilidade de eficientes técnicas de extração em amostras contendo DNA, esse projeto também permitirá a colaboração com outros pesquisadores da instituição que tenham linhas de pesquisas associadas a técnicas de biologia molecular que utilizam sequências de DNA como alvo em diferentes análises.

Palavras-chave: preparo de amostras, DNA, amostras biológicas, líquidos iônicos magnéticos

Introdução

O estudo a respeito da constituição e estrutura química dos ácidos nucleicos bem como a sequência destes determinando aspectos funcionais de genes apresenta-se de grande importância em diversas áreas da ciência. Os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) constituem-se como os protagonistas dos repositórios moleculares de informação genética [1].

Particularmente em relação ao DNA, a análise e determinação dessa biomolécula pode ser aplicada em inúmeras áreas tais como as relações qualitativas e quantitativas de expressão gênica com diversas patologias, identificação de micro-organismos patogênicos, avaliações genéticas de populações ancestrais, análises de DNA em biópsias entre outros [2], sendo particularmente útil em análises forenses e em diagnóstico clínico.

Diversas técnicas são descritas para análise de ácidos nucleicos que envolvem detecção de presença e ausência, e determinação quantitativa de sequências conhecidas bem como determinação de sequências desconhecidas. Ensaio molecular que utiliza técnicas de amplificação são descritos como padrão-ouro por muitos protocolos para pesquisa e diagnóstico de patologias de diversas etiologias. A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica que realiza uma amplificação exponencial *in vitro* de sequências de ácidos nucleicos e, simbolicamente, reproduz um processo semelhante ao de replicação do DNA que ocorre nas células [3].

A técnica da PCR consiste em uma reação de termociclagem composta por três etapas principais incluindo a desnaturação do ácido nucleico, o anelamento dos *primers* e a extensão dos *primers* na direção 5' - 3' pela ação da enzima DNA polimerase. Por fim, a PCR detecta o produto de amplificação final de DNA pelo uso da eletroforese em gel de agarose [3,4].

A partir da PCR (convencional) ocorreu um grande avanço com o desenvolvimento da PCR em tempo real quantitativa (qPCR), que possibilita o monitoramento em tempo real dos produtos da PCR, além da possibilidade de quantificar cópias do fragmento de DNA pesquisado. Este monitoramento ocorre em função da utilização de sondas fluorescentes (intercalantes ou hidrólise) que se ligam ao fragmento em cada ciclo de amplificação, emitindo fluorescência que é registrada pelo equipamento em tempo real [4]. Outra variação bastante importante refere-se ao processo de PCR envolvendo a transcrição reversa (RT-PCR).

Entretanto, a eficiência das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos está diretamente relacionada aos métodos de extração de ácidos nucleicos, considerando aspectos quantitativos e qualitativos. A etapa de extração é fundamental e define a quantidade e

qualidade da sequência alvo de DNA ou RNA obtida e que será analisada [4]. Dessa forma, a etapa de extração de DNA constitui-se em importante desafio analítico. Nesse sentido, diversos métodos de extração têm sido propostos objetivando otimizar o rendimento de ácidos nucleicos resultantes na eluição final bem como a máxima remoção de interferentes presentes na matriz biológica que possam inibir as reações de amplificação.

Especificamente, referente à extração de DNA, podem ser citadas metodologias que envolvem extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos [5] e tampões, extrações utilizando cartuchos de SPE (extração em fase sólida) e também protocolos que envolvem o uso de partículas magnéticas (*magnetic beads*). Estas metodologias estão disponíveis comercialmente por inúmeros fabricantes e utilizados na rotina clínica e de pesquisa.

Em relação aos protocolos envolvendo extrações com solventes orgânicos, tipicamente é utilizada uma mistura de fenol e clorofórmio na etapa de extração/purificação do DNA. Além disso, esses protocolos têm sido amplamente adaptados com a utilização de detergentes para remoção de polissacarídeos e proteínas. Contudo, a utilização de solventes orgânicos tóxicos e prejudiciais aos analistas e, também, demoradas etapas de centrifugação resultaram na busca pelo desenvolvimento de técnicas ambientalmente corretas, seguras e rápidas.

Um aprimoramento nas técnicas de preparo de amostra para extração de DNA ocorreu com a utilização da SPE. Nesse caso, partículas sólidas geralmente formadas por sílica, são capazes de reter as biomoléculas de DNA na presença de um meio com alta concentração salina. Posteriormente, o DNA é eluído com um tampão de baixa concentração salina e avaliado quanto ao rendimento e pureza. Apesar do grande avanço na etapa de extração principalmente envolvendo menor consumo de reagentes e tempo de análise, os kits utilizados apresentam custos elevados. Além disso, esses kits podem ser ainda mais caros caso envolvam partículas magnéticas como fases extratoras (*magnetic beads*) [2].

Atualmente, tem-se uma alta demanda pelo desenvolvimento de técnicas baratas, rápidas, com baixo consumo de insumos e, paralelamente, eficiente ao objetivo proposto. Contudo, os métodos de extração comercialmente disponíveis podem ser laboriosos, ter elevado custo por amostra e apresentarem limitações de desempenho para algumas aplicações [6].

Para contornar tais problemas destacam-se técnicas com baixo custo e fácil execução destacando-se as técnicas miniaturizadas ou de microextração, tal como a microextração em fase líquida. Pode-se destacar algumas vantagens apresentadas pelas técnicas de microextração, incluindo o baixo consumo de solventes e o fato de serem ambientalmente

sustentáveis; o tempo de execução reduzido quando comparadas às técnicas convencionais de extração; versatilidade e aplicabilidade para extração de diversos compostos com alta capacidade para concentração dos analitos [7].

Outro fator muito importante a ser considerado em técnicas de microextração é a estabilidade das fases extratoras contribuindo para eficiência de extração. Fases extratoras compostas por líquidos iônicos têm apresentado inúmeras vantagens sobre solventes orgânicos convencionais. As aplicações têm crescido muito nos últimos anos e contribuíram para o rápido desenvolvimento dessa área [2].

Recentemente, uma nova classe de solventes conhecidos como líquidos iônicos magnéticos (MILs, do inglês *magnetic ionic liquids*) tem sido avaliada. Esta classe destaca-se pela versatilidade estrutural, viabilizando o desenvolvimento de novas técnicas miniaturizadas para extração de diferentes compostos, incluindo ácidos nucleicos [8-11]. Os MILs apresentam forte resposta quando submetidos a um campo magnético externo [8]. Devido às características dos MILs, frente a sua múltipla capacidade de solvatação e, paralelamente, em preservar a integridade do DNA na presença de nucleases, recentemente alguns estudos têm descrito a extração de DNA [9,11].

Notadamente, esta técnica miniaturizada pode possibilitar a realização de múltiplas extrações. Os aparatos mais utilizados para esse fim são as placas de amostragem contendo 96 poços (*96-well plate*) e uma escova metálica consistindo em 96 pinos. Recentemente, pesquisas demonstraram a produção de pentes magnetizados para a fixação de MILs [12]. Neste sistema, cada pente contém 12 pinos magnéticos nos quais podem ser colocadas as fases extratoras (MILs) que ficarão mantidas fixas devido à forte interação com o campo magnético proveniente dos pinos. A escova completa comporta até 8 pentes (12 pinos cada), com isso, até 96 amostras podem ser extraídas simultaneamente. Essa estratégia aumenta significativamente a frequência analítica de qualquer procedimento [12].

Nesse projeto está sendo proposta a utilização de pentes magnéticos para a fixação de um pequeno volume de MIL que proporcione a eficiente extração de DNA. Devido à forte resposta dos MILs frente a um campo magnético, esses solventes permanecerão fixos nos pentes e serão imersos nas amostras para a realização das extrações. Após a extração, os pentes serão recolhidos e imersos em alguns microlitros um tampão devidamente avaliado para posterior análise por qPCR.

Justificativa

Os conceitos de química verde amparam e estimulam o desenvolvimento de metodologias que minimizem os possíveis impactos negativos ao ambiente, a saúde humana e animal. Comumente, métodos de extração de ácidos nucleicos utilizam diferentes solventes e outros compostos que podem ser considerados tóxicos ou nocivos à saúde e ao meio ambiente. Considerando que a extração de DNA representa uma etapa muito importante na obtenção de um analito de boa qualidade em quantidade suficiente, estudos recentes têm demonstrado bons resultados com a aplicação de MILs nesta etapa de análise.

O emprego dessa técnica proporciona a utilização de uma pequena quantidade de solventes o que contribui com os conceitos de química verde e a redução do impacto ambiental. Outro fator bastante significativo é o reduzido custo da etapa de extração que pode ser alcançado com a utilização de líquidos iônicos magnéticos quando comparados aos tradicionais kits de extração de DNA disponíveis no mercado.

Nesse sentido, esse projeto envolve a utilização de MILs em técnicas de microextração para a determinação de DNA, adicionalmente, apresenta a proposta inovadora com a utilização do sistema semiautomatizado de extração contendo 96 poços (96 *well-plate*). Esse acoplamento inédito para a extração dessa biomolécula proporciona o preparo de até 96 amostras simultaneamente, o que é um incremento muito significativo para rotinas com altas demandas.

Outro fator importante que merece ser mencionado se refere quanto a aplicabilidade da metodologia a ser desenvolvida. Essa configuração pode ser explorada em um número muito grande e diverso de aplicações, sendo que a mesma pode ser avaliada para a extração do DNA proveniente de células eucarióticas, procarióticas e vírus. Particularmente, podem ser conduzidos muitos estudos em colaboração com outros pesquisadores da instituição que tenham linhas de pesquisas associadas a técnicas de biologia molecular que utilizem sequências de DNA como alvo em diferentes análises.

Objetivos

Objetivo geral

- Desenvolver uma metodologia alternativa para a extração de DNA baseada em microextração com a aplicação de líquidos iônicos magnéticos.

Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os líquidos iônicos magnéticos.

- Avaliar a viabilidade da extração de DNA com líquidos iônicos magnéticos e o acoplamento com o sistema de 96 poços de extração (96-*well plate*).
- Utilizar ferramentas quimiométricas para otimizar as o procedimento de extração incluindo as variáveis tempo de extração e volume de MIL.
- Avaliar as extrações em meios contendo possíveis interferentes tais como: sais e proteínas.

Métodos

Síntese e caracterização dos líquidos iônicos magnéticos

Primeiramente, a síntese do líquido iônico magnético (MIL) será realizada e, em seguida, a caracterização dos mesmos será abordada. Basicamente será feita a adição de 0.5 equivalente de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 1 equivalente de $[\text{P}_{66614}^+][\text{Cl}^-]$ em 10 mL de diclorometano em reação a temperatura ambiente durante 24h sob agitação constante. Após o processo de síntese será formado o composto $[\text{P}_{66614}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$.

Para a caracterização, a técnica de espectrofotometria de UV-Vis será utilizada, bem como a espectrometria de massas. Nesse sentido, a caracterização dos materiais obtidos será realizada na Central Analítica da UFCSPA. Após essa etapa, a verificação da compatibilidade das fases extratoras sintetizadas com a fase móvel para a cromatografia líquida será avaliada mediante testes de solubilização dos líquidos iônicos magnéticos na fase móvel empregada para a análise cromatográfica por HPLC.

Procedimento experimental

Os líquidos iônicos serão sintetizados e caracterizados de acordo com procedimentos previamente estabelecidos. Em relação à metodologia de extração, primeiramente, esta será avaliada em solução aquosa livre de interferentes e contendo apenas o DNA de interesse a ser extraído. As amostras serão submetidas às microextrações com um MIL (inicialmente $[\text{P}_{66614}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$). As extrações serão realizadas com auxílio de um sistema 96 *well-plate*, com pinos compostos por pequenas barras magnéticas.

A primeira etapa consiste na colocação de uma determinada quantidade de fase extratora composta por um líquido iônico magnético na extremidade dos pinos magnetizados do sistema 96-*well plate*, sendo os mesmos inseridos nos poços com as amostras contendo o DNA específico para a extração. A terceira etapa consiste na retirada dos pentes magnéticos da solução e a colocação em poços contendo um determinado volume de tampão devidamente

otimizado para a dessorção/solubilização do DNA. Na última etapa será realizada a análise por qPCR.

O processo de amplificação aplicando utilizando o seguinte esquema de temperatura para todas as reações: 95°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55-70°C em 20 segundos e 72°C por 45 segundos. Em cada reação com volume total de 25µL, serão incluídos os seguintes componentes: 12,5µL SYBR Supermix (enzimas, DNTPs e SYBR Green); 9,5µL de água para PCR (ultrapura livre de nucleases); 1µL de cada *primer* (*forward e reverse*); 1µL de DNA.

Os experimentos serão realizados como reações de quantificação absoluta, onde serão avaliados a positividade por ciclo de amplificação e características da curva de amplificação, considerando o CT (*Cycle Threshold*) [13].

A validação da metodologia de extração será realizada baseando-se em protocolos estabelecidos, tendo-se os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade e robustez devidamente avaliados. Esses parâmetros serão estudados utilizando-se testes estatísticos incluindo Análise de Variância (ANOVA) e também teste *t-Student*.

Viabilidade do projeto

Materiais/insumos e estrutura física

Para a realização desse projeto de pesquisa será utilizado um sistema de PCR em tempo real (7500TM – Applied Biosystems, EUA) . O sistema de extração com 96 poços de amostragem será obtido pelo pesquisador. Para alguns testes, PCR convencional utilizando eletroforese em gel será empregada. Os experimentos serão realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

Serão utilizados os seguintes reagentes para a realização desse projeto: Placas e filme para qPCR (7500), conjunto de *primers*/sonda (SYBR Green), mix de enzimas, DNTPs, água biologia molecular, oligonucleotídeos sintéticos (sequências alvo).

Amostras para o estudo

Na primeira etapa do estudo, as amostras serão constituídas apenas de uma solução aquosa contendo o DNA de interesse (amostras controle). Na segunda etapa, será avaliado o efeito de possíveis interferentes nas extrações, dessa forma além do DNA de interesse, as amostras conterão proteínas e sais.

Gestão financeira e tempo de execução

Todos os reagentes e materiais consumíveis necessários para a realização deste projeto de pesquisa já estão adquiridos pelo pesquisador mediante recursos financeiros próprios. Esse presente projeto de pesquisa foi aprovado no **Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA segundo Edital 07/2020 PROPPG**. Os instrumentos que serão utilizados para a realização dessa proposta de pesquisa já estão disponíveis na Central Analítica e no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

Quanto ao tempo de execução, as atividades vinculadas a este projeto terão duração de 12 meses contados a partir da data de implementação da bolsa.

Recursos Humanos

O professor responsável auxiliará o bolsista de iniciação científica na execução das tarefas, bem como prestará auxílio para a correção de relatórios e manuscritos que forem gerados com os resultados deste projeto. Além disso, o bolsista de iniciação científica irá interagir com alunos de pós-graduação (Mestrado e Doutorado). O professor responsável é docente permanente do PPG-Biociências e, atualmente, orienta 8 alunos de pós-graduação na UFCSPA junto a este programa. Além disso, o projeto contará com apoio dos Técnicos de Laboratórios alocados na Central Analítica da UFCSPA para o manuseio dos instrumentos analíticos mais complexos.

Colaborações

A partir da realização deste projeto poderão ser estabelecidas colaborações com docentes da UFCSPA, bem como com Instituições nacionais e internacionais. Como pode ser observado nos trabalhos recentes publicados pelo proponente, são frequentes as colaborações com o Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) através de projetos em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Carasek, bem como a colaboração internacional com o Departamento de Química da Iowa State University dos Estados Unidos mediante projetos em parceria com o Prof. Dr. Jared L. Anderson.

Resultados esperados

Através da realização desse projeto de pesquisa será possível o estabelecimento de uma linha de pesquisas inovadora no Rio Grande do Sul e no Brasil, aliando a capacidade de extração dos líquidos iônicos magnéticos (MILs) com a alta frequência analítica obtida através da utilização do sistema 96-well plate para a extração de DNA. Essa linha de pesquisa

envolvendo técnicas de microextração apresenta grande potencial de aplicabilidade, incluindo futuramente a possibilidade da extração de ácidos nucleicos em diferentes matrizes biológicas incluindo sangue, urina e saliva.

Nesse sentido, podem ser estabelecidos novos protocolos com metodologias alternativas englobando procedimentos de extração rápidos e viáveis economicamente para a determinação de DNA. Através desses protocolos otimizados, espera-se que as sejam alcançadas eficientes extrações e sejam obtidas amplificações adequadas nas análises por qPCR. Desta forma, esses protocolos podem ser aplicados e avaliados em diferentes matrizes para as mais variadas aplicações, podendo ser firmadas colaborações para futuras etapas envolvendo desdobramentos desse projeto de pesquisa.

Através do desenvolvimento dessas metodologias analíticas poderá ser viabilizada a publicação de estudos em jornais com alto fator de impacto, tendo em vista que até o momento a automatização de procedimentos envolvendo a extração de DNA com MILs ainda não foi realizada. Desta forma, com os resultados obtidos, poderá ser alcançada uma alta frequência analítica o que é essencial para o processamento de um número elevado de amostras.

O estabelecimento desta proposta apresenta base sólida em conceitos atuais de química verde, com uso reduzido de solventes e segurança do analista. Cabe ressaltar que o custo de implementação é muito inferior aos custos dos métodos tradicionalmente empregados para a extração de DNA. Desta forma, as metodologias oriundas desse projeto podem apresentar-se como ferramentas analíticas relacionadas à área da saúde, o que pode proporcionar alternativas promissoras aos métodos de extração de ácidos nucleicos empregados atualmente em amostras biológicas.

A UFCSPA possui cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação interdisciplinares que permeiam diversas áreas do conhecimento, e onde há uma grande demanda por soluções analíticas principalmente envolvendo a análise de matrizes biológicas complexas. Com isso, tem-se um cenário fértil para colaborações e formação de recursos humanos capacitados em diferentes frentes.

Além disso, o projeto permitirá a participação de alunos de Pós-Graduação e também de Graduação dos diferentes cursos da UFCSPA. Desta forma, servirá também como ferramenta para a formação de recursos humanos qualificados para que possam ingressar no mercado de trabalho em um futuro próximo, tendo em vista a experiência adquirida em um estudo interdisciplinar de caráter científico-tecnológico.

7. Referências

- [1] D.L. Nelson, M.M.Cox. Princípios de Bioquímica de *Lehninger*. Artmed, 7ª ed. 2019.
- [2] K.D.Clark, O. Nacham, H. Yu, T. Li, Me.M. Yamsek, D.R. Ronning, J.L. Anderson. Extraction of DNA by Magnetic Ionic Liquids: Tunable Solvents for Rapid and Selective DNA Analysis. ***Anal Chem***, 87 (2015) 1552 – 1559.
- [3] A. Zaha, H. B. Ferreira, L. M. P. Passaglia. *Biologia Molecular Básica*. Artmed, 5ª ed. 2014.
- [4] C. V. Carvalho, G. Ricci, R. Affonso. *Guia de Práticas em Biologia Molecular*. Yendis, 2ª Ed., 2015.
- [5] Patel, R.; Kvach, J. T.; Mounts, P. Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. ***J. Gen. Microbiol.*** 132 (1986) 541–551.
- [6] M. N. Emaus, K. D. Clark, P. Hinners, J.L. Anderson. Preconcentration of DNA using magnetic ionic liquids that are compatible with real-time PCR for rapid nucleic acid quantification, ***Anal Bioanal Chem***, 410 (2018) 4135-4144.
- [7] J.M. Kokosa, A. Przyjazny, M.A. Jeannot, *Solvent Microextraction: Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.
- [8] K. D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review, ***Anal Chim Acta***, 934 (2016) 9-21.
- [9] K. D. Clark, J. A. Purslow, S.A. Pierson, O. Nacham, J.L. Anderson, Rapid preconcentration of viable bacteria using magnetic ionic liquids for PCR amplification and culture-based diagnostics, ***Anal Bioanal Chem***, 409 (2017) 4983-4991.
- [10] S. Fuchs-Telka, S. Fister, P. Mester, M. Wagner, P. Rossmanith. Hydrophobic ionic liquids for quantitative bacterial cell lysis with subsequent DNA quantification, ***Anal Bioanal Chem***, 409 (2017) 1503-1511.
- [11] S. A. Hice, K. D. Clark, J. L. Anderson, B. F. Brehm-Stecher. Capture, Concentration, and Detection of Salmonella in Foods Using Magnetic Ionic Liquids and Recombinase Polymerase Amplification, ***Anal Chem***, 2,19 (2019) 1113-1120.
- [12] G. Mafrá, A.A. Vieira, J. Merib, J.L. Anderson, E. Carasek, Single drop microextraction in a 96-well plate format: A step toward automated and high-throughput analysis, ***Anal Chim Acta***, 1063 (2019) 159-166.
- [13] D. I. Walker, J. McQuillan, M. Taiwo, R. Parks, C. A. Stenton, H. Morgan, M. C. Mowlem, D. N. Lees, A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters, ***Water Research***, 126 (2017) 101-110,

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE –
UFCSPA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

***A susceptibilidade de *Caenorhabditis elegans* a infecções bacterianas pode ser
influenciada pela sua dieta?***

Projeto de Tese de Doutorado

Aluna: Belisa Avila Rodrigues

Orientador: Karine Rigon Zimmer

Coorientador: Eduardo Rigon Zimmer

Porto Alegre, fevereiro de 2021

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	6
1.1.1. Aspectos gerais	6
1.1.2. Alimentação	6
1.1.3. Sistema nervoso	8
1.1.4. Interação hospedeiro-patógeno	9
1.2. Infecções bacterianas.....	10
1.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.2.2. Biofilmes.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO.....	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Cepas e condições de cultivo.....	13
4.2. Sincronização e estágios do desenvolvimento.....	13
4.3. Dietas	14
4.4. Avaliação da fisiologia	15
1. Longevidade.....	15
2. Determinação do tamanho corporal	15
3. Batimentos faríngeos	15
4. Avaliação do tamanho da ninhada	15
5. Locomoção e Basal slowing response (BSR)	15
6. Estimulação mecanossensorial.....	15
7. Defecação.....	15
8. Parâmetros bioquímicos.....	15
9. Microscopia e coloração	16
10. Avaliação neuronal	16
4.5. Infecções bacterianas.....	16
4.5.1. Cepas bacterianas e condições de cultivo	16
4.5.2. Formação de biofilme mono e duo-espécie	17
4.5.3. Ensaio de preferência alimentar.....	17
4.5.4. Ensaios de sobrevivência	17

4.5.5. Medida da carga bacteriana no trato intestinal de <i>C. elegans</i>	18
4.6. Avaliação do perfil metabólico.....	18
4.7. Análise estatística	19
5. ORÇAMENTO.....	19
6. CRONOGRAMA	20
7. REFERÊNCIAS	20

RESUMO

A saúde dos indivíduos é influenciada pela sua dieta, sendo que dietas de má qualidade, como dietas ricas em açúcares, podem promover um distúrbio do metabolismo e gerar consequências negativas diversas, afetando inclusive os sistemas nervoso central e periférico. Entre as funções do sistema nervoso, encontra-se a regulação do sistema imune, com isso, dietas que prejudicam o sistema nervoso podem ter efeito negativo no sistema imune e gerar uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas. De forma contrária, dietas de restrição podem modular de forma positiva a imunidade dos indivíduos, gerando uma maior resistência a infecções bacterianas. O estudo dessas relações em mamíferos, incluindo o ser humano, é difícil, pois, entre outros fatores, há a necessidade de longos períodos de tempo de investigação. Entretanto, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) representa um modelo alternativo interessante, já que possui ciclo de vida curto e rápido tempo de geração, baixo custo de manutenção, vias de sinalização evolutivamente conservadas, e a sinalização neuronal pode ser facilmente observada. Além disso, geralmente, é infectado pelos mesmos patógenos que os seres humanos. Em *C. elegans*, dietas com altas concentrações de glicose causam uma redução da longevidade, alterações no tamanho corporal e progenia, aumento de espécies reativas de oxigênio e prejuízo neuronal. Já dietas de restrição causam um aumento da longevidade do verme e modulam sua imunidade inata. Portanto, este estudo se propõe a investigar a influência de dietas com altas concentrações de glicose e dietas de restrição na susceptibilidade de *C. elegans* a dois patógenos humanos importantes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, nas suas formas planctônicas e de biofilme. Para tal, os nematoides nas fases de desenvolvimento embrionário (ovo) e larval (L1), serão expostos às dietas por curtos e longos períodos de tempo. Após alimentados, serão avaliados quanto a sua fisiologia, através dos ensaios de longevidade, tamanho corporal, batimentos faríngeos, tamanho da ninhada, estimulação mecanossensorial, defecação, parâmetros bioquímicos e avaliação neuronal. Posteriormente, os nematoides serão desafiados com os patógenos, onde ensaios de preferência alimentar, sobrevivência, longevidade e quantificação da carga bacteriana no verme serão realizados. Após exposição aos patógenos, os parâmetros fisiológicos serão novamente avaliados. Além disso, será avaliado o perfil metabólico desses nematoides após a exposição as dietas e após o desafio com os patógenos. Na literatura, há uma carência de estudos voltados para este tipo de investigação, especialmente com as condições propostas neste estudo. Explorar fatores que podem influenciar a susceptibilidade a infecções bacterianas é cada vez mais necessário, devido à dificuldade de tratamento encontrada em infecções relacionadas a micro-organismos multirresistentes (especialmente na forma de biofilme) como os que serão utilizados nesse estudo. Portanto, os resultados deste trabalho poderão colaborar para o melhor entendimento da influência das dietas na susceptibilidade a infecções bacterianas, podendo gerar estratégias para a diminuição da incidência dessas infecções ou estratégias de intervenções alternativas.

1. INTRODUÇÃO

A saúde dos indivíduos é extremamente influenciada pela sua dieta, especialmente na sociedade moderna. Uma alimentação adequada proporciona um bom funcionamento do metabolismo, bem como promove a homeostasia do sistema imune e atua no sistema nervoso, promovendo a indução de respostas anti-inflamatórias, inibição do estresse oxidativo e gerando

uma redução na susceptibilidade a disfunções neuronais e doenças neurológicas (Estrada & Contreras, 2019).

Os sistemas imune e nervoso se comunicam entre si para gerar respostas protetoras aos indivíduos. Células imunes possuem a maquinaria molecular necessária para responder a fatores neurais, como por exemplo, receptores para neurotransmissores e neuropeptídios e o sistema nervoso central controla a resposta imune inata através das vias hormonais e neuronais. Devido a essas relações, dietas que influenciam o sistema imune, também podem ter influência no sistema nervoso (Sternberg, 2006).

Dietas com alto índice glicêmico podem promover um distúrbio do metabolismo da glicose e consequências negativas, tais quais a redução da longevidade e prejuízos na fertilidade e desenvolvimento podem ser observadas em organismos distintos como vermes, leveduras e mamíferos. Além disso, o distúrbio metabólico da glicose gera modificações metabólicas como as alterações na disponibilidade de energia sistêmica, resistência à insulina, respostas inflamatórias e estresse oxidativo, os quais são fatores importantes observados em pacientes obesos e diabéticos, estando também envolvidos com o desenvolvimento de doenças do sistema nervoso como Alzheimer, Parkinson e Huntington (Alcántar-Fernández et al., 2018; Estrada & Contreras, 2019). Já as dietas de restrição de nutrientes promovem um aumento da longevidade e uma redução dos efeitos gerados pelo envelhecimento em diferentes organismos como leveduras, invertebrados e mamíferos (Fontana & Partridge, 2015).

Tendo em vista a relação entre os sistemas imune inato e nervoso nas respostas aos patógenos e considerando os efeitos negativos das dietas com altas concentrações de glicose, incluindo o dano neuronal, pode-se hipotetizar que as mesmas teriam efeito negativo no sistema imune dos animais, e que com isso, a susceptibilidade a infecções bacterianas seria maior. De forma contrária ao mencionado acima, dietas de restrição podem modular de forma positiva a imunidade dos animais e torná-los menos suscetíveis a infecções bacterianas.

Para estudar tais relações em mamíferos seria necessário um longo período de investigação e uma maior complexidade seria observada nesta avaliação levando em conta os sistemas imune e nervoso central e periférico destes organismos. Em humanos, por exemplo, seriam necessários estudos longitudinais por longos anos e fatores intrapessoais e interpessoais constituiriam limitações importantes nos efeitos observados. Entretanto, o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans* é um modelo adequado, pois além da imunidade inata conservada, apresenta um sistema nervoso que pode ser considerado equivalente aos sistemas nervoso central e periférico dos seres humanos, com neurônios bem descritos e que podem ser investigados mais facilmente. Além disso, o custo de manutenção dos nematoides é baixo, o ciclo de vida é curto, com geração rápida (3-4 dias e longevidade de 2-3 semanas). Seu genoma foi completamente sequenciado (60-80% de seus genes possuem ortologia com os genes humanos) e possui facilidade de manipulação genética, permitindo a geração de cepas mutantes (Apfeld & Alper, 2018; Artal-Sanz et al., 2006; Chiu et al., 2011; Sifri et al., 2005; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)

1.1. *Caenorhabditis elegans*

1.1.1. Aspectos gerais

Caenorhabditis elegans é um nematoide, transparente, bastante pequeno (aproximadamente 1 mm), bacterívoro de vida livre e encontrado em vegetais e frutas em decomposição (Frézal & Félix, 2015). Em laboratório é mantido em placas de Petri com meio de crescimento específico (*nematode growth media* – NGM) e geralmente alimentado com a bactéria *Escherichia coli* OP50 (Brenner, 1974).

Esses nematoides possuem duas formas sexuais, os machos e os hermafroditas autofecundantes, sendo estes últimos os mais utilizados em laboratório. Seu ciclo de vida é curto, com tempo rápido de geração de aproximadamente três dias e longevidade de duas a três semanas. Vermes hermafroditas produzem cerca de 300 ovos, em temperatura de 20°C. A embriogênese ocorre em cerca de 14 horas, quando o ovo eclode para a primeira fase larval de desenvolvimento (L1), onde o verme começa a se alimentar e se desenvolve em mais 3 estágios larvais. Após 12 horas do estágio L4, o verme adulto passa a produzir a progênie (Figura 1) (Corsi et al., 2015). Em algumas condições, como na falta de alimento, na presença de superpopulação e aumento de temperatura, a larva L1 ativa um ciclo alternativo, se desenvolvendo em uma larva L2 chamada de *dauer*. Em *dauer* o verme não se alimenta, tem o desenvolvimento interrompido e ainda fica mais protegido de estressores, podendo sobreviver por muitos meses (Hu, 2007).

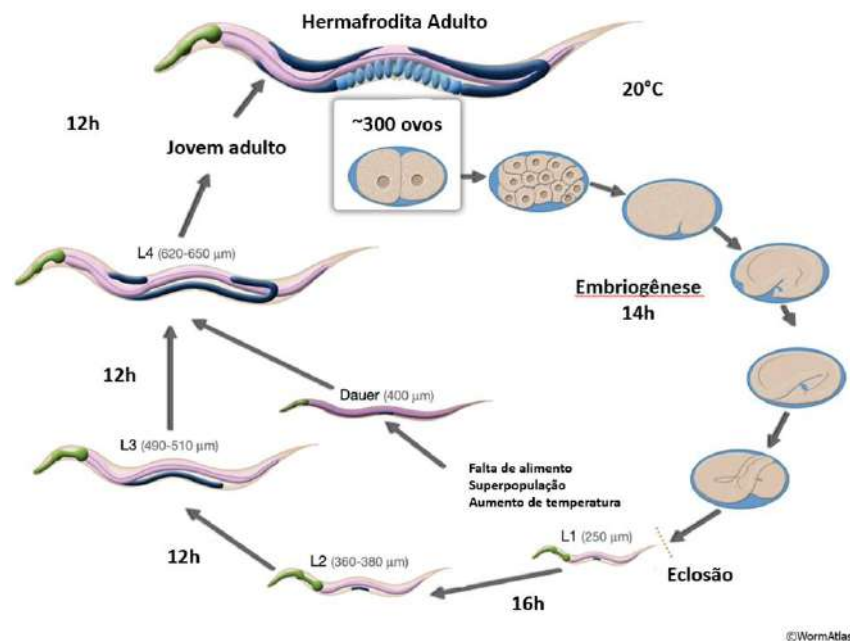


Figura 1: Ciclo de vida do *C. elegans*. Modificado de WormAtlas: Altun & Hall, 2009.

1.1.2. Alimentação

A ingestão de alimentos (bactérias) por *C. elegans* ocorre na parte anterior do animal e passa pela faringe, onde ocorre a trituração das partículas. O batimento faríngeo depende do estágio de desenvolvimento bem como de outros fatores mecânicos, gustatórios, olfatórios e principalmente da disponibilidade e qualidade do alimento (Lemieux & Ashrafi, 2015). Após a trituração das partículas na faringe, os detritos passam para o intestino onde ocorre a absorção

dos nutrientes, e posteriormente contrações musculares promovem a defecação (Houthoofd et al., 2005).

Na presença de alimento, o verme alterna entre dois comportamentos locomotores *dwelling* e *roaming*. Em *dwelling* o verme reduz sua velocidade e aumenta a frequência de voltas, enquanto que em *roaming* ele aumenta a sua velocidade e reduz as voltas para conseguir explorar o ambiente. Na ausência de alimento, exibe um comportamento exploratório, onde inicialmente faz muitas voltas (reversões) em um comportamento semelhante a exploração em uma área restrita e depois se movimenta com poucas voltas dispersando em busca de novas áreas de alimentação (Dallière et al., 2017).

Além da alimentação geralmente administrada com *E. coli* OP50, outras dietas podem ser utilizadas. Comumente algumas cepas derivadas da *E. coli* OP50 como a HB101 e a DA837 são utilizadas, sendo consideradas de maior qualidade e qualidade moderada respectivamente, de acordo com a capacidade de influenciar a taxa de crescimento dos nematoides. Outra cepa derivada da OP50, a HT115(DE3), por não apresentar RNase III, é utilizada em ensaios de RNAi. Recentemente, estudo com outras espécies bacterianas foi realizado indicando outras alternativas de dietas (Shtonda & Avery, 2006; Stuhr & Curran, 2020; Timmons et al., 2001). Além disso, dietas com concentrações elevadas de glicose também já foram elaboradas (com diferentes concentrações de glicose adicionadas ao meio NGM) para a investigação de processos básicos das vias metabólicas (Choi, 2011; Lee et al., 2009; Mendler et al., 2015; Schlotterer et al., 2009).

Vermes alimentados com altas concentrações de glicose tiveram uma redução na longevidade, apresentaram alterações no conteúdo e absorção de glicose, conteúdo de triglicerídeos, tamanho corporal, progenia e redução da locomoção (Alcántar-Fernández et al., 2018; Choi, 2011; Lee et al., 2009; Schlotterer et al., 2009). Além disso, apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (Alcántar-Fernández et al., 2018; Schlotterer et al., 2009), bem como diminuição da capacidade de aprendizado e prejuízo neuronal (Guzman et al., 2020; Mendler et al., 2017; Pinkas et al., 2018). Dois estudos que adicionaram glicose ao meio investigaram seu efeito na *performance* do verme frente a infecções bacterianas. Um destes trabalhos avaliou a infecção do verme por *Salmonella typhimurium* e mostrou que esta foi agravada pela adição de glicose através da via do fator de transcrição SKN-1, que está envolvido na longevidade, na resposta ao estresse e na regulação da imunidade inata. Contrariamente a este estudo, outro trabalho demonstrou que a glicose aumentou a resistência dos vermes a infecções por *E. coli* e *Staphylococcus aureus* e que esse efeito é dependente de DAF-16, sugerindo que o mesmo ocorre através da ativação da via semelhante à insulina/IGF-1 pelas altas concentrações de glicose (Lavigne et al., 2013; Li et al., 2018).

Outro tipo de dieta utilizada em *C. elegans*, principalmente em estudos de longevidade e envelhecimento, é a dieta de restrição, que é caracterizada como uma restrição de alimento sem que ocorra má-nutrição (Houthoofd et al., 2005). Diferentes tipos de dietas de restrição são utilizados, podendo ser administrada uma quantidade menor de bactérias através da diluição das culturas, meio axênico (ausência de bactéria) e utilizando cepas mutantes com deficiência na faringe, o que provoca a menor ingestão de alimento (Bishop & Guarente, 2007; Greer & Brunet, 2009; Houthoofd et al., 2002). Dietas de restrição provocam um aumento da longevidade, que envolve diversos fatores, alguns associados a ativação de vias que promovem

a homeostase mitocondrial ou de resposta ao estresse (Bishop & Guarente, 2007; Greer & Brunet, 2009; Weir et al., 2017). Recentemente, um estudo demonstrou outro mecanismo envolvido na promoção da longevidade através da utilização de uma dieta de restrição: a modulação de uma via da imunidade inata (p38) e o fator de transcrição ATF-7. A longevidade depende que a atividade de ATF-7 esteja reduzida e não é dependente da exposição a bactéria, mas sim da ativação via nutrientes (Wu et al., 2019). Além disso, dietas de restrição também podem preservar comportamentos saudáveis em vermes idosos, mantendo níveis altos de dopamina e serotonina (Yin et al., 2014).

1.1.3. Sistema nervoso

O sistema nervoso dos vermes hermafroditas contém 302 neurônios bem definidos e caracterizados que são agrupados em quatro categorias principais de acordo com seus circuitos: neurônios motores, neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios polimodais (Altun & Hall, 2011). A maioria desses neurônios estão reunidos no anel nervoso (*nerve ring*) na região da cabeça do animal, podendo ser considerados equivalentes ao sistema nervoso central dos seres humanos e os demais neurônios encontrados fora dessa região podem ser considerados equivalentes ao sistema periférico dos seres humanos (Altun & Hall, 2011; Chiu et al., 2011).

C. elegans possui muitos neuropeptídeos e também muitos neurotransmissores, incluindo alguns encontrados em vertebrados como a acetilcolina, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina e dopamina (Nass & Blakely, 2003). Os vermes hermafroditas possuem oito neurônios dopaminérgicos, quatro CEPs no olfato (região cefálica), dois ADEs na cabeça e dois PDEs no corpo (Figura 2), que já foram bem descritos e suas características específicas podem ser encontradas em *WormAtlas.org*. Esses neurônios são considerados mecanossensoriais já que possuem terminações ciliadas embutidas na cutícula e podem detectar movimento ou alimento (Nass & Blakely, 2003; Sulston et al., 1975).

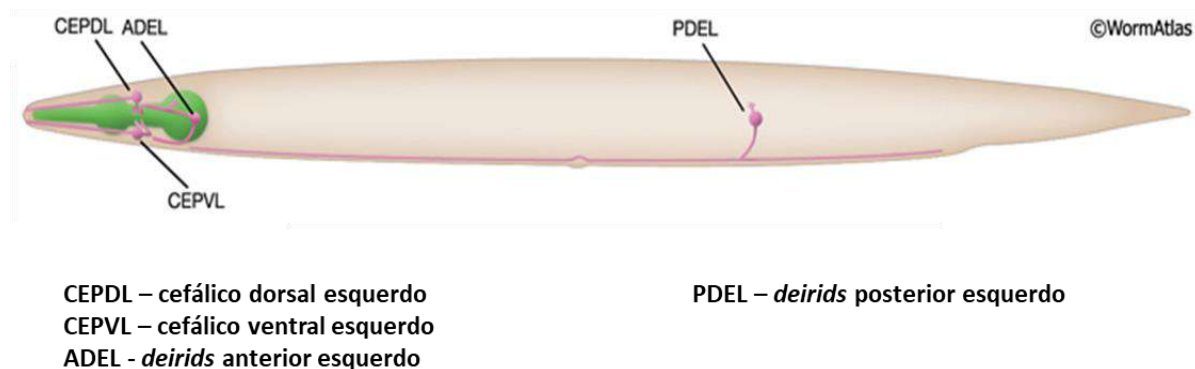


Figura 2: Neurônios dopaminérgicos dos vermes hermafroditas. Fonte: Adaptado de WormAtlas: Altun & Hall, 2011.

O sistema dopaminérgico é responsável pelo controle de locomoção, postura de ovos, defecação, aprendizado e a resposta ao encontro do tapete bacteriano, diminuindo sua locomoção, em animais bem alimentados (*Basal slowing response*) (McDonald et al., 2006). Simultaneamente a este comportamento, a dopamina também age na modulação da homeostase proteica em células epiteliais do intestino e da hipoderme promovendo a expressão de genes de resistência ao estresse xenobiótico. A homeostase proteica é necessária para a defesa contra patógenos e na ausência da sinalização dopaminérgica e da atividade de genes de resistência ao estresse xenobiótico, os nematoides tornam-se mais suscetíveis a infecções por *P. aeruginosa*.

PA14 (Joshi et al., 2016). Além disso, a sinalização dopaminérgica também modula a imunidade inata, atuando como inibidor negativo da via de sinalização da MAP quinase (p38/PMK-1) (Cao & Aballay, 2016).

A pré-exposição a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) por um curto período é capaz de causar uma resistência aumentada a uma posterior infecção pelo patógeno. Para isso, um circuito neuronal reconhece a bactéria e envia o sinal para outros tecidos como, por exemplo, o intestino. Nesse trabalho, o sistema dopaminérgico induziu a ativação de genes das vias da insulina (*daf-16*) e das vias da MAP quinase (*pmk-1*) para gerar uma resposta protetiva e persistente (Anyanful et al., 2009).

Essa interação entre circuito neuronal e células intestinais também acontece no comportamento de aprendizado e aversão ao patógeno. Esse comportamento é controlado negativamente pelo neuropeptídeo *ins-11*. O fator de transcrição *hlh-30* e a via da MAP quinase (p38) controlam a expressão do neuropeptídeo *ins-11* no intestino dos nematoides. Quando o *ins-11* é atenuado, a capacidade de aversão e sobrevivência ao patógeno é aumentada (Lee & Mylonakis, 2017).

Devido a sua transparência, a sinalização nos neurônios dos nematoides pode ser vista através de microscopia de fluorescência, utilizando-se cepas marcadas com a proteína verde fluorescente (GFP), podendo-se identificar processos neurodegenerativos ou diminuição da intensidade do sinal fluorescente e associá-los com ensaios comportamentais (Guzman et al., 2020; Mendler et al., 2017; Pinkas et al., 2018).

1.1.4. Imunidade inata

C. elegans não possui um sistema imune adaptativo e a resposta aos patógenos depende da imunidade inata. A primeira linha de defesa envolve o seu comportamento de aversão ao patógeno, no qual ao encontrar um microrganismo patogênico, o verme o reconhece e aprende a evita-lo (Kaletsky et al., 2020). Como outras estratégias, possuem barreiras físicas como a cutícula do verme, feita de colágeno e quitina, e também a faringe que promove a trituração dos patógenos impedindo que cheguem viáveis ao intestino. Além disso, ainda contam com a produção de proteínas e peptídeos antimicrobianos e a liberação de espécies reativas de oxigênio (Kumar et al., 2019).

A imunidade inata também apresenta vias de sinalização conservadas evolutivamente e bastante documentadas, que tem papel importante na regulação das respostas aos patógenos: a via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1 (que envolve o receptor de insulina DAF-2 e o fator de transcrição DAF-16), da MAP quinase (MAPK/p38), da morte celular programada e a cascata de TGF- β (Irazoqui et al., 2010). O sistema imune e o sistema nervoso usam de comunicação bidirecional para controlar as respostas aos patógenos, com diferentes circuitos neuronais ativando ou inibindo as respostas imunes (Kawli et al., 2010; Singh & Aballay, 2020).

1.1.4.a. Interação patógeno-hospedeiro

C. elegans tem sido bastante utilizado para o estudo das interações patógeno-hospedeiro já que muitos patógenos que infectam o ser humano, também infectam os vermes, como as bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, (Dasgupta et al., 2020; Jansen et al., 2002; Sifri et al., 2003) as gram-negativas

Salmonella typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (Kirienko et al., 2013; Li et al., 2018; Wong et al., 2018), além de fungos como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis et al., 2002; Pukkila-Worley et al., 2011). Nas infecções em *C. elegans*, esses patógenos utilizam os mesmos mecanismos de virulência que nas infecções humanas, incluindo a formação de biofilme (Sifri et al., 2005).

Os patógenos podem infectar a cutícula do verme, se acumular na faringe e no intestino ou podem causar a morte através da produção de toxinas (Zhang & Hou, 2013). Um dos patógenos mais estudados em *C. elegans*, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, causa a morte através da produção de toxinas (morte rápida), mas também pode acumular no intestino do animal, causando infecção prolongada que pode causar a chamada morte lenta (Tan et al., 1999). Essa diferença na virulência da bactéria é afetada pela alteração das condições do meio de cultura utilizado, sendo meios líquidos responsáveis pelo favorecimento da difusão das toxinas e meios sólidos associados a infecções prolongadas (Sifri et al., 2005). Do grupo das bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* é capaz de causar infecção no verme através da colonização do intestino, com inflamação do ânus, destruição das células intestinais e de órgãos internos (Irazoqui, et al., 2010).

Em biofilmes as infecções são dependentes dos patógenos envolvidos, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia pestis* formam biofilme na parte anterior e ao longo da superfície dos vermes, enquanto que biofilmes por *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* colonizam o intestino. Essas infecções ainda são pouco estudadas, especialmente quando a avaliação envolve mais de uma espécie formando biofilme (Atkinson et al., 2011; Holt et al., 2017; Lavigne et al., 2008; Peleg et al., 2008; Vega et al., 2013).

1.2. Infecções bacterianas

1.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa, considerada um patógeno oportunista e responsável por infecções nosocomiais que podem ser agudas ou crônicas. Devido a sua alta capacidade de adaptação e plasticidade genética e fenotípica, está associada a diferentes tipos de infecções como as de queimaduras, feridas, associadas a dispositivos médicos, sendo mais comumente encontrada em infecções respiratórias, principalmente nos pulmões, e em casos graves de fibrose cística (Stefani et al., 2017). A cronicidade dessas infecções é associada ao seu extenso arsenal de determinantes de virulência, muitos deles desempenhando um papel na formação e dispersão de biofilme (Crousilles et al., 2015). Concomitantemente, o tratamento das infecções é agravado pela capacidade que esses micro-organismos têm em tornarem-se multirresistentes aos antimicrobianos devido a mecanismos intrínsecos, adquiridos ou adaptativos (quando em condição de biofilme) (Breidenstein et al., 2011).

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva que coloniza a pele e as vias nasais de humanos, mas também é responsável por infecções nosocomiais e comunitárias, que podem ser tanto agudas quanto crônicas (Jenkins et al., 2015), incluindo bacteremia, abscessos de pele, osteomielite, endocardite e aquelas associadas a dispositivos médicos (Lister & Horswill, 2014). As infecções crônicas por *S. aureus* são complicadas não apenas devido a sua elevada resistência aos antimicrobianos, mas também pela formação de células bacterianas *persisters*.

Essas células apresentam-se em um estado transitório metabolicamente inativo, tornando ineficazes os antibióticos que atuam no crescimento celular, resultando em altas taxas de falha terapêutica (Kim et al., 2018). Além disso, assim como *P. aeruginosa*, a formação de biofilme também constitui um importante fator na virulência desse patógeno e está associada às infecções crônicas de difícil tratamento que levam a um aumento da mortalidade e morbidade das infecções, especialmente quando associadas a dispositivos médicos (Moormeier & Bayles, 2017).

Pseudomonas aeruginosa e *S. aureus* fazem parte do grupo de patógenos ESKAPE, sendo responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais em pacientes graves e imunocomprometidos e conhecidos por seu perfil de multirresistência. ESKAPE é uma sigla utilizada para reportar um grupo de bactérias, englobando as seguintes espécies gram-positivas e gram-negativas: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* (Santajit & Indrawattana, 2016).

Esses dois patógenos são comumente encontrados no mesmo sítio em diversas infecções (Jordana-Lluch et al., 2020; Yadav et al., 2017), tais como aquelas associadas a dispositivos médicos como próteses, *stents*, implantes, cateteres e tubo endotraqueal formando biofilmes duo-espécie (Percival et al., 2015). Estudos demonstraram que as interações entre esses dois patógenos podem alterar a produção de fatores de virulência por uma ou ambas as espécies, influenciando fortemente sua patogênese, persistência e/ou suscetibilidade a antibióticos. Em um modelo de co-infecção em células epiteliais brônquicas derivadas de pacientes com fibrose cística, os autores observaram que *P. aeruginosa* e *S. aureus* formaram microcolônias mistas, promovendo a sobrevivência de *S. aureus* na presença de vancomicina (Orazi & O'Toole, 2017).

1.2.2. Biofilmes

Biofilmes são comunidades organizadas de micro-organismos, com características complexas e heterogêneas, que se apresentam envoltas por uma matriz extracelular polimérica (EPS). Estes micro-organismos podem estar agregados entre si e/ou em superfícies que podem ser tanto bióticas quanto abióticas (Flemming et al., 2016). A EPS, composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA), é responsável pela arquitetura do biofilme, ocupando e moldando o espaço entre as células. Com isso, além de suporte estrutural também retém nutrientes, proporciona um ambiente de troca de materiais genéticos, facilita a comunicação celular (*quorum sensing* - QS) e auxilia na defesa contra o sistema imune de hospedeiros e agentes antimicrobianos (Flemming & Wingender, 2010).

A formação do biofilme, de modo geral, apresenta cinco etapas: a primeira etapa constitui a migração e aderência reversível de células livres denominadas planctônicas; na segunda etapa, as células aderidas se tornam agregados irreversíveis e produzem a EPS; na terceira e quarta etapa ocorre a maturação do biofilme e o aumento da densidade populacional; por último (quinta etapa), o biofilme maduro pode dispersar liberando microcolônias ou células planctônicas para o ambiente, e essas podem migrar para outros sítios e também iniciar a formação de um novo biofilme (Verderosa et al., 2019).

Um número cada vez maior de doenças associadas a biofilmes microbianos tem sido reportado, envolvendo infecções no sistema respiratório, cardiovascular, digestivo, tegumentar,

auricular, reprodutivo e urinário. Dentre essas ganham destaque infecções crônicas de feridas e infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística (Vestby et al., 2020). Além disso, infecções relacionadas a dispositivo médicos, como os cateteres urinários, cateter venoso central, próteses, marcapassos cardíacos também estão associadas a biofilmes (Azevedo et al., 2017).

A condição de biofilme, seu fenótipo distinto e sua EPS, proporciona as células proteção contra agentes antimicrobianos, podendo ser de 10 a 1000 vezes mais tolerantes que células planctônicas, bem como auxilia na proteção contra as defesas do hospedeiro, o que dificulta o tratamento das infecções associadas a biofilmes. O tempo de tratamento e internação do paciente é prolongado, e os dispositivos médicos, quando associados, precisam ser substituídos, causando um problema grave na assistência em saúde e também onerando significativamente o tratamento destes pacientes (Bjarnsholt et al., 2018; Davies, 2003).

Biofilmes podem ser formados por uma, duas ou até múltiplas espécies de micro-organismos que constituem uma comunidade com interações complexas que, dependendo das espécies envolvidas, podem ter diferentes componentes de EPS, população e fisiologia dinâmicas (Giaouris et al., 2013). Os biofilmes multiespécie maduros possuem canais aquosos dispersos que possibilitam a troca de nutrientes e metabólitos (Verderosa et al., 2019). Além disso, a proximidade das espécies permite interações diversas como a comunicação celular, principalmente através de QS e cooperação metabólica. No sinergismo, ocorre promoção da formação do biofilme por co-agregação, cooperação metabólica, aumento da tolerância a antimicrobianos, aumento da virulência e aumento da resistência a resposta imune do hospedeiro (Makovcova et al., 2017). No antagonismo, os micro-organismos podem competir pelos nutrientes e secretar substâncias que matam ou inibem o crescimento do outro (Haggart, 2017). A presença de diferentes espécies no biofilme pode levar a um aumento ou decréscimo da produção de biomassa (Magalhães et al., 2017; Makovcova et al., 2017).

Os micro-organismos raramente existem como formas planctônicas e de espécie única, sendo frequentemente encontrados como biofilmes multiespécie (Peters et al., 2012). As infecções por biofilmes multiespécie têm implicações importantes no manejo do paciente, já que essa associação modifica o curso clínico da doença, afetando a seleção da terapia antimicrobiana e a resposta prevista ao tratamento (Francolini & Donelli, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

As dietas têm grande influência no metabolismo dos indivíduos. Dietas com altas concentrações de glicose, dentre outros efeitos, provocam uma redução da longevidade, aumento de estresse oxidativo e dano neuronal. Como o sistema imune e o sistema nervoso atuam juntos na resposta aos patógenos, pode-se esperar que efeitos negativos no sistema nervoso influenciem o sistema imune e levem a uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas. Ao contrário, dietas de restrição teriam um efeito positivo no metabolismo, auxiliando na modulação da imunidade o que levaria a uma maior resistência a infecções bacterianas. Para estudar a influência de dietas de restrição e dietas com altas concentrações de glicose, *C. elegans* é considerado um modelo alternativo adequado devido as suas diversas vantagens como ciclo de vida curto e rápido tempo de geração, baixo custo de manutenção, vias de sinalização conservadas e facilidade na avaliação do sistema neuronal.

A investigação da influência das dietas na susceptibilidade a infecções bacterianas ainda é muito pouco explorada, especialmente nas condições propostas neste estudo, considerando sistema neuronal e análise metabólica. Além disso, os patógenos escolhidos para essa investigação são conhecidamente responsáveis por infecções de difícil tratamento, especialmente na forma de biofilme. Desta forma, explorar fatores que influenciem na susceptibilidade a essas infecções é de grande relevância e cada vez mais necessário. Os resultados deste trabalho poderão colaborar para o melhor entendimento da influência das dietas na susceptibilidade a infecções bacterianas, podendo gerar estratégias para a diminuição da incidência dessas infecções ou estratégias de intervenções alternativas.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência de dietas com altas concentrações de glicose e dietas de restrição na susceptibilidade de *C. elegans* a infecções bacterianas.

3.2. Objetivos específicos

Investigar o efeito de dietas com altas concentrações de glicose e dietas de restrição na fisiologia do nematoide, quando expostos por curtos e longos períodos de tempo, nas fases embrionária (ovo) e larval (L1);

Avaliar a susceptibilidade de *C. elegans* a infecções por *P. aeruginosa* e *S. aureus* (nas formas planctônicas e de biofilmes mono e duo-espécie) após serem submetidos as dietas com altas concentrações de glicose e dietas de restrição;

Avaliar os parâmetros fisiológicos de *C. elegans* após as infecções por *P. aeruginosa* e *S. aureus* (nas formas planctônicas e de biofilmes mono e duo-espécie);

Avaliar o perfil metabólico dos nematoides após exposição as dietas com altas concentrações de glicose e dietas de restrição e após o desafio com os patógenos *P. aeruginosa* e *S. aureus* (nas formas planctônicas e de biofilmes mono e duo-espécie).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas e condições de cultivo

Caenorhabditis elegans do tipo selvagem (N2 Bristol), cepas marcadas com GFP: NW1229 (pan-neuronal; permite a visualização de todos os neurônios do verme) e BZ555 (*dat-1::GFP* - visualização dos neurônios dopaminérgicos), e a cepa SS104 [*glp-4(bn2)*] (mutante estéril por temperatura) serão mantidos em Meio de Crescimento para Nematóide (NGM: NaCl, peptona, CaCl₂, colesterol, MgSO₄, KPO₄ e ágar) à temperatura de 20°C, em placas de Petri, sendo alimentados com *E. coli* OP50.

4.2. Sincronização e estágios do desenvolvimento

A sincronização dos vermes será realizada pelo método de tratamento com hipoclorito de sódio (Amrit et al., 2014). Serão utilizados nos ensaios vermes nos estágios embrionário

(ovo), L1 e L4, divididos em 4 grupos (dois grupos serão expostos as dietas por um curto período de tempo enquanto os outros dois por um período mais longo) (Figura 3):

1. Os ovos serão expostos as dietas por tempos pré-definidos, transferidos para meio NGM com *E. coli* OP50 para o crescimento até a fase larval L4 quando serão desafiados com as bactérias (exposição por curto tempo).
2. As dietas serão administradas na fase larval L1 por tempos pré-definidos e depois retirados para meio NGM, com *E. coli* OP50, para o crescimento até a fase larval L4 quando serão desafiados com as bactérias (exposição por curto tempo).
3. Os vermes serão expostos as dietas desde o ovo até a fase larval L4 quando serão desafiados com as bactérias (exposição por longo tempo).
4. As dietas serão administradas desde a fase larval L1 até a L4 quando serão desafiados com as bactérias (exposição por longo tempo).

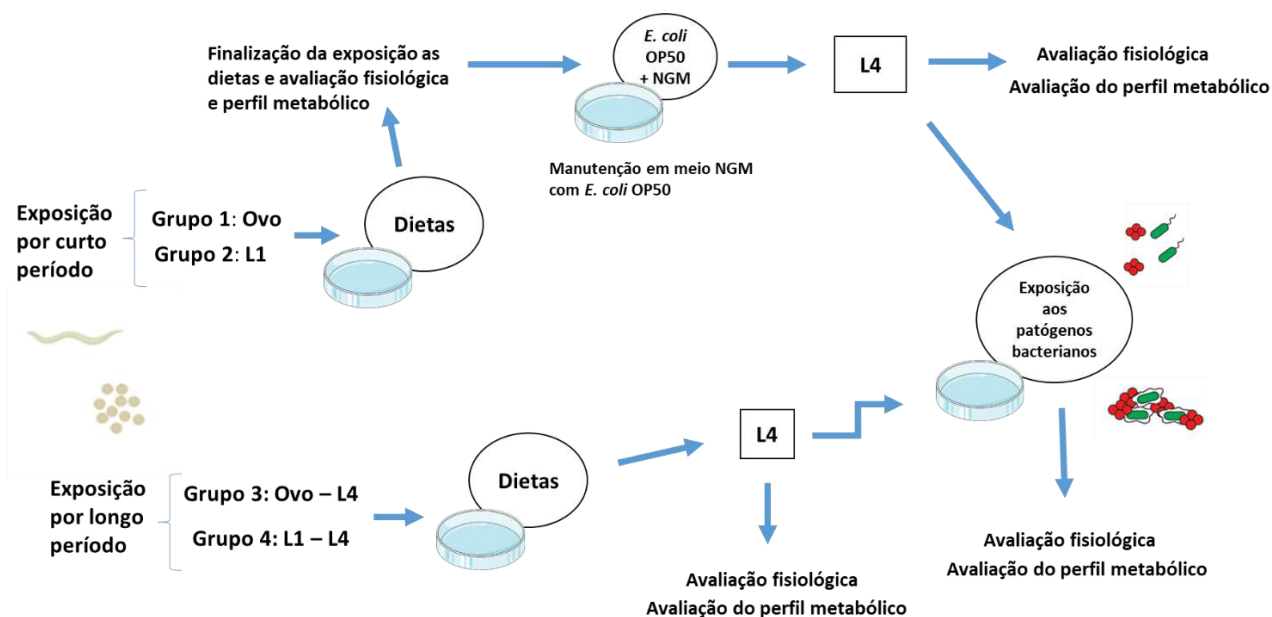


Figura 3: Representação esquemática da metodologia do projeto. Fontes: Limoli et al. (2017); BioRender.com.

4.3. Dietas

As seguintes dietas serão utilizadas neste estudo:

1. Dieta com alta concentração de glicose: será adicionada junto ao ágar NGM uma concentração de glicose de 2% (111 mM) (Salim & Rajini, 2014). *E. coli* OP50 viva ou morta pelo calor será adicionada ao meio.
2. Dieta de restrição: Será considerada dieta de restrição ou meio axênico que compreende 3% (p/v) de peptona de soja, 3% (p/v) de extrato de levedura, 2% de água e uma solução estoque de hemoglobina (5 g de hemoglobina em 100 ml de KOH 0,1 N) diluída 100x em meio basal (Houthoofd et al., 2002).
3. Dieta controle: *E. coli* OP50 em meio ágar NGM.

4.4. Avaliação da fisiologia

Após a administração das dietas, serão realizados ensaios que avaliam a fisiologia do nematoide. Os mesmos também serão realizados após o desafio com os patógenos bacterianos.

1. Longevidade: Um número fixo de vermes será transferido para placas de NGM contendo as dietas e/ou os patógenos. A cada dia, eles serão transferidos para novas placas e o número de vermes vivos será contabilizado, até que não haja mais animal vivo. Será comparada a taxa de longevidade do tratamento com o controle (*E. coli* OP50). Os nematoides serão considerados mortos quando não responderem a estímulos mecânicos (Amrit et al., 2014).

2. Determinação do tamanho corporal. Vermes serão colocados em pastilhas de agarose a 2% (em tampão M9), paralisados com uma gota de levamisol (100 mM) e fotografados com microscópio acoplado a câmera digital. Todas as medições de comprimento serão realizadas com o programa Java de processamento de imagens, ImageJ (Mörck & Pilon, 2006).

3. Batimentos faríngeos: 5 vermes serão transferidos para placa de NGM e os movimentos de batimento da faringe serão contados/min (Raizen et al., 2012).

4. Avaliação do tamanho da ninhada: 10 vermes de cada tratamento, serão individualmente transferidos para novas placas de NGM a cada 24h, contendo *E. coli* OP50 como alimento. Cada progênie do verme será contada diariamente até que nenhuma progênie adicional seja produzida (Rodrigues et al., 2018).

5. Locomoção e Basal slowing response (BSR). 30 vermes tratados serão transferidos para um meio NGM sem bactéria por exatamente 5 minutos. Após 5 minutos, metade dos vermes serão transferidos para placa com alimento (meio NGM com OP50 semeado e a outra metade para placa sem alimento (meio NGM vazio). Após 2 minutos de adaptação nas placas, o número de curvaturas do corpo (*body bend*) a cada 20 segundos será determinado. Os dados serão coletados para 30 animais por tratamento e a BSR será calculada dividindo a diferença entre as taxas de locomoção dentro e fora dos alimentos pela taxa de locomoção no alimento (Guzman et al., 2020).

6. Estimulação mecanossensorial. Um verme será transferido para um meio NGM com *E. coli* e um toque na cabeça do verme será feito com um pelo de sobancelha. Se ele se mover para trás, será o primeiro estímulo. Normalmente depois de mover para atrás, o verme se move para frente e nesse momento é realizado o próximo estímulo que é repetido até o verme parar de se mover para trás (Guo et al., 2019).

7. Defecação. O ciclo de defecação é uma contração peristáltica que começa na parte posterior do animal, propagando-se anteriormente e gerando a expulsão das fezes. Uma média de 10 intervalos entre dois ciclos de defecação serão medidos (Sellegounder et al., 2019).

8. Parâmetros bioquímicos

a. Glicose e triglicerídeos. Após serem lavados para a remoção das bactérias, os vermes tratados serão congelados, sonificados, centrifugados e o sobrenadante será utilizado para a dosagem de glicose e triglicerídeos utilizando-se de kits comerciais específicos para os mesmos (Rodrigues et al., 2018; Salim & Rajini, 2014).

b. Espécies reativas de oxigênio. As larvas serão lavadas com NaCl 0,9% para remoção das bactérias, e então transferidas para uma microplaca de 96 poços, onde será adicionando 100 µL

de diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) 0,05 Mm. A emissão de fluorescência será medida a cada 10 min, durante 90 minutos, a 485 nm de excitação e 535 nm de emissão em um leitor de microplacas (Spectramax Me2 Molecular Devices), obtendo-se o percentual de intensidade de fluorescência emitida pelas amostras testadas em relação ao controle (Boelter et al., 2020).

c. Enzimas antioxidantes. O sobrenadante será utilizado para dosagem da atividade de superóxido dismutase (SOD), através do método da xantina oxidase e a atividade de catalase (CAT) através do método de molibdato de amônio, ambos utilizando kit comercial (Song et al., 2014).

9. Microscopia e coloração

Os corantes SYTOX (Ferreira et al., 2015) e Nilo red (Escorcia et al., 2018) serão utilizados para visualizar danos nas células de *C. elegans* e quantificação de lipídeos, respectivamente. Os protocolos serão realizados conforme Ferreira e colab. (2015) e Escorcia e colab. (2018). As imagens serão obtidas em microscópio confocal.

10. Avaliação neuronal

Para a investigação de dano neuronal será utilizada a cepa pan-neuronal NW1229 marcada com GFP, o que permite a visualização de todos os neurônios do nematoide. Também será feita a visualização da sinalização neuronal dopaminérgica utilizando a cepa BZ555 (*dat-1::GFP*) (Mendler et al., 2012; Salim & Rajini, 2017).

Após a administração das dietas ou a exposição aos patógenos, os vermes serão lavados três vezes com meio M9 para retirar resíduos bacterianos. Os vermes serão colocados em lâminas de vidro (anestesiados com uma pequena alíquota de azida de sódio 100 mM) e a visualização de fluorescência (GFP) será através de microscópio confocal. As imagens serão processadas com o software Image J (Salim & Rajini, 2017).

11. Dosagem de dopamina.

A quantificação de dopamina será realizada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography* HPLC). Homogenatos dos vermes serão preparados em tampão salino tamponado com fosfato 100 mM pH 7,4 e Tween 20 a 0,1% seguido por centrifugação a 13 000 g por 10 min. O sobrenadante será utilizado após ser filtrado e uma fase móvel consistindo em NaH₂PO₄ 0,15 M, EDTA 0,25 mM, ácido 1-octanossulfônico 1,75 mM e metanol a 10% (pH 3,4) será utilizada (Salim & Rajini, 2017).

4.5. Infecções bacterianas

4.5.1. Bactérias e condições de cultivo

Cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* serão estocadas em Skim Milk com 10% (v/v) de glicerol a -20°C e cultivadas em ágar tripton de soja (TSA) aerobicamente a 37°C *overnight*.

4.5.2. Formação de biofilme mono e duo-espécie

A formação de biofilme será realizada utilizando microplacas de poliestireno. Uma suspensão bacteriana em solução salina estéril 0,9% em concentração adequada será adicionada junto ao meio de cultura aos poços da microplaca. Após incubação a 37°C por 24h, o conteúdo dos poços será retirado e lavado três vezes com solução salina estéril 0,9% para a remoção das células planctônicas. As bactérias aderidas serão fixadas a 60°C por 1h. Vancomicina (para *S. aureus*) ou gentamicina (para *P. aeruginosa*) e meio de cultura serão os controles positivos e negativo de crescimento bacteriano, respectivamente. A quantificação da biomassa do biofilme será mensurada através da técnica de cristal violeta (Zimmer et al., 2013). Esse ensaio será realizado para assegurar que as bactérias utilizadas neste estudo estão formando biofilme.

Para todos os ensaios, exceto para o de preferência alimentar, serão avaliadas três condições: (i) biofilmes serão feitos como descrito acima e as células planctônicas serão coletadas e ressuspensas em meio adequado e, então semeadas em meio NGM para formação de um tapete bacteriano; (ii) biofilmes serão feitos como descrito acima e as células do biofilme coletadas serão ressuspensas em meio adequado e, então semeadas em meio NGM para formação do tapete bacteriano, (iii) biofilmes serão realizados como descrito acima e os nematoides serão colocados na microplaca com o biofilme mono e/ou duo-espécie já formado.

Os biofilmes mono e duo-espécie serão realizados com essas mesmas condições, sendo que os biofilmes duo-espécie terão os inóculos das duas bactérias ajustados de forma que permita a coexistência das mesmas no biofilme.

4.5.3. Ensaio de preferência alimentar

Vinte nematoides serão transferidos para placas de NGM as quais terão *spots* das bactérias a serem testadas (células planctônicas e de biofilme mono e duo-espécie) e serão incubados a 20°C. O número de vermes em cada colônia bacteriana será contado como um indicador de preferência alimentar. O monitoramento será diário, durante um período de cinco dias, até que haja o desaparecimento das colônias. Paralelamente, larvas se alimentando de *E. coli* OP50 serão utilizadas como controle. O índice de escolha será calculado usando a seguinte fórmula: índice de escolha = número de vermes no teste menos número de vermes na OP50/número de vermes totais (Lewenza et al., 2014).

4.5.4. Ensaios de sobrevivência

Para os ensaios com células planctônicas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, após o crescimento em TSA, a cultura será diluída (1:100) em caldo triptona de soja e 10 µl dessa cultura será semeada em ágar NGM, incubadas por 4-6 horas a 37°C e depois deixadas em temperatura ambiente para posterior transferência dos nematoides. Depois da transferência dos nematoides as placas serão incubadas a 20°C e a visualização de vermes vivos e mortos será feita pelo menos a cada 24 h (Sifri et al., 2003).

Para os ensaios com biofilmes, as bactérias serão semeadas como nos ensaios com células planctônicas e a formação de biofilme de acordo com o item 4.5.2., após 24 h e 48 h da exposição aos biofilmes, os nematoides serão observados e o número de vermes vivos será contabilizado. Um verme será considerado morto quando ele não responder ao toque (Holt et al., 2017).

4.5.5. Medida da carga bacteriana no trato intestinal de *C. elegans*

Primeiramente, para remoção das bactérias localizadas na parte externa dos nematoides, os vermes serão lavados colocando-os em um filtro de 10 µm, seguido pela adição de M9-T misturado com 1:100 de solução de *bleaching*, durante 5 min de incubação e subsequente centrifugação. Posteriormente, os vermes serão lavados mais duas vezes com M9. Este procedimento permite uma remoção eficiente de bactérias ligadas à superfície do verme, mantendo os nematoides vivos (Dirksen et al., 2016). Após remover as bactérias da superfície, os nematoides serão lavados cinco vezes com meio M9 em uma placa de BHI, colocados em novos tubos estéreis contendo meio M9 com Triton X-100 1% e serão mecanicamente rompidos. Diluições seriadas serão realizadas em solução de NaCl estéril a 0,9% (Kim & Mylonakis, 2012) e cultivadas em agar Cetrimide e agar Sal Manitol (meios seletivos utilizados para crescimento de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente) para a contagem de UFC.

4.6. Avaliação do perfil metabólico

Para melhor compreender a influência das dietas na fisiologia dos nematoides e as respostas dos mesmos aos patógenos serão avaliados os seus perfis metabólicos. As diferenças entre os metabólitos podem indicar as vias metabólicas possivelmente envolvidas na susceptibilidade às infecções bacterianas.

Todas essas análises serão realizadas no Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (Labiomass) da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação dos Professores Carla Porto da Silva e Eduardo Jorge Pilau.

4.6.1. Amostras e preparação dos metabólitos de *C. elegans*

A avaliação do perfil metabólico será realizada nos grupos 1 e 2, após a exposição as dietas e após os nematoides atingirem o estágio L4. Nos grupos 3 e 4 (tempo de exposição a dieta até L4), o perfil metabólico será investigado no estágio larval L4. Além disso, em todos os grupos (1, 2, 3, 4) a avaliação de metabólitos será realizada após desafio com os patógenos. Os vermes serão retirados da placa utilizando tampão M9, centrifugados (2000rpm, 2min) e o sobrenadante removido. O *pellet* será ressuscitado em 200µL do tampão M9 para a extração direta dos metabólitos. Esferas de vidro de igual volume (aproximadamente 0.3g) serão adicionadas ao pellet com 100% de metanol (800 µL). A amostra será agitada (em vórtex por 3min) e o sobrenadante transferido para um microtubo de 2 mL. As esferas de vidro restantes serão agitadas (em vórtex por 1min) com 80% de metanol (1 mL) e o sobrenadante retirado para o microtubo e centrifugado (3000 rpm, 2 min) (Hughes et al., 2009).

4.6.2. Análise dos metabólitos por CLAE-EM/EM

A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e a cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) serão empregadas para garantir a detecção de metabólitos hidrofílicos e hidrofóbicos. As amostras serão analisadas em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) de geometria Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização do tipo electrospray nos modos de íons positivo e negativo. No método HILIC, as amostras mantidas a 4°C serão eluídas através de uma coluna ZIC-pHILIC (5 µm, polimérica, 150 por 4,6 mm;

SeQuant, Merck) pela fase móvel A (carbonato de amônio 20 mM) e fase móvel B (acetonitrila). A coluna Ascentis Express C8 (5 cm por 2,1 mm, 2,7 µm) (número de catálogo 53831-U; Sigma-Aldrich) será aplicada no método RPLC. As amostras serão mantidas a 4°C e eluídas pela fase móvel A (40% de isopropanol e 60% de água Milli-Q com formato de amônio 8 mM e ácido fórmico 2 mM) e fase móvel B (98% de isopropanol e 2% de água Milli-Q com formato de amônio 8 mM e ácido fórmico 2 mM). Todas as amostras serão analisadas de uma única vez na LC-MS para evitar variações. As amostras de controle de qualidade (QC), padrões internos e cromatogramas de íons totais serão utilizados para avaliar os picos cromatográficos, a reprodutibilidade do sinal e a estabilidade dos analitos. Para ajudar na identificação dos metabólitos, uma mistura de aproximadamente 600 padrões de metabólitos será colocada junto as análises (Han et al., 2019).

4.6.3. Processamento dos dados e análise estatística

As análises dos dados metabólicos serão realizadas utilizando mzMatch e IDEOM (<http://mzmatch.sourceforge.net/ideom.php>). A quantificação de cada metabólito será baseada na altura do pico bruto do cromatograma (intensidade relativa). As análises estatísticas univariadas e multivariadas serão realizadas usando o MetaboAnalyst 3.0 (Han et al., 2019) e a plataforma GNPS (Mingxun Wang, Jeremy J. Carver, Vanessa V. Phelan, Laura M. Sanchez, Neha Garg, Yao Peng, Don Duy Nguyen et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." *Nature biotechnology* 34, no. 8 (2016): 828. PMID: 27504778).

4.7. Análise estatística

Ensaios serão realizados em triplicata, em grupos de três experimentos independentes. Dados serão expressos como média ± desvio padrão e analisados por Análise de Variância (Anova) e um valor $p \leq 0,01$ será considerado estatisticamente significativo. As análises de sobrevivência e longevidade em *C. elegans* serão determinadas usando o teste log-rank e curva de Kaplan-Meier, usando o software Graphpad Prism 9.0.

5. ORÇAMENTO

Descrição	Valor (R\$)
Materiais para ensaios com <i>C. elegans</i> (placas de Petri, microplacas, meios de cultura, sais, antimicrobianos, eppendorfs, tubos cônicos)	10.000,00
Kits para avaliação bioquímica (glicose, triglicerídeos, enzimas antioxidantes)	13.000,00
Materiais para ensaios de microscopia (microplacas, lâminas, corantes)	15.000,00
Reagentes para ensaios microbiológicos (meios de cultura, placas de Petri, microplacas, eppendorfs, ponteiras, sais, antimicrobianos)	10.000,00

6. CRONOGRAMA

	2020	2021		2022		2023		2024
Atividades	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem
Pesquisa bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x
Disciplinas, seminários, referatas, prática docente	x	x	x	x	x	x	x	x
Ensaaios iniciais de padronização		x	x					
Ensaaios grupo 1			x	x				
Ensaaios grupo 2				x	x			
Ensaaios grupo 3					x	x		
Ensaaios grupo 4						x	x	
Análise de resultados			x	x	x	x	x	x
Redação científica/ Exame de qualificação					x			
Redação de artigos				x	x	x	x	x
Defesa								x

7. REFERÊNCIAS

- Alcántar-Fernández, J., Navarro, R. E., Salazar-Martínez, A. M., Pérez-Andrade, M. E., & Miranda-Ríos, J. (2018). *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PLOS ONE*, 13(7), e0199888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199888>
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009). WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction. *WormAtlas*, 1–16. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1>
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2011). WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Nervous System - General Description. *WormAtlas*, 1–47. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.18>
- Amrit, F. R. G., Ratnappan, R., Keith, S. A., & Ghazi, A. (2014). The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods*, 68(3), 465–475. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.002>
- Anyanful, A., Easley, K. A., Benian, G. M., & Kalman, D. (2009). Conditioning protects *C. elegans* from lethal effects of Enteropathogenic *E. coli* by activating genes that regulate lifespan and innate immunity. *Cell Host & Microbe*, 5(5), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.012>
- Apfeld, J., & Alper, S. (2018). What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*? *Methods Mol Biol*, 1706(1), 53–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_4
- Artal-Sanz, M., de Jong, L., & Tavernarakis, N. (2006). *Caenorhabditis elegans*: A versatile platform for drug discovery. *Biotechnology Journal*, 1(12), 1405–1418. <https://doi.org/10.1002/biot.200600176>

- Atkinson, S., Goldstone, R. J., Joshua, G. W. P., Chang, C.-Y., Patrick, H. L., Cámara, M., Wren, B. W., & Williams, P. (2011). Biofilm development on *Caenorhabditis elegans* by *Yersinia* is facilitated by *Quorum sensing*-dependent repression of type III secretion. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001250. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001250>
- Azevedo, A. S., Almeida, C., Melo, L. F., & Azevedo, N. F. (2017). Impact of polymicrobial biofilms in catheter-associated urinary tract infections. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(4), 423–439. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1240656>
- Bishop, N. A., & Guarente, L. (2007). Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*, 447(7144), 545–549. <https://doi.org/10.1038/nature05904>
- Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrêne, Y. F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M., Rumbaugh, K. P., Schulte, T., Sun, L., Åkerlund, B., & Römling, U. (2018). Biofilm formation - what we can learn from recent developments. *Journal of Internal Medicine*, 284(4), 332–345. <https://doi.org/10.1111/joim.12782>
- Boelter, J. F., Brandelli, A., Meira, S. M. M., Göethel, G., & Garcia, S. C. (2020). Toxicology study of nanoclays adsorbed with the antimicrobial peptide nisin on *Caenorhabditis elegans*. *Applied Clay Science*, 188(1), 105490. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105490>
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brenner, S. (1974). *The genetics of Caenorhabditis elegans*. 71–94. <https://doi.org/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1213120/>
- Cao, X., & Aballay, A. (2016). Neural inhibition of dopaminergic signaling enhances immunity in a cell-non-autonomous manner. *Current Biology*, 26(17), 2329–2334. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.036>
- Chiu, H., Alqadah, A., Chuang, C. F., & Chang, C. (2011). *C. elegans* as a genetic model to identify novel cellular and molecular mechanisms underlying nervous system regeneration. *Cell Adhesion and Migration*, 5(5), 387–394. <https://doi.org/10.4161/cam.5.5.17985>
- Choi, S. S. (2011). High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutrition Research and Practice*, 5(3), 214. <https://doi.org/10.4162/nrp.2011.5.3.214>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–31. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1>
- Crousilles, A., Maunders, E., Bartlett, S., Fan, C., Ukor, E. F., Abdelhamid, Y., Baker, Y., Floto, A., Spring, D. R., & Welch, M. (2015). Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Future Microbiology*, 10(11), 1825–1836. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.100>
- Dallière, N., Holden-Dye, L., Dillon, J., O'Connor, V., & Walker, R. (2017). *Caenorhabditis elegans Feeding Behaviors*. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.190>
- Dasgupta, M., Shashikanth, M., Gupta, A., Sandhu, A., De, A., Javed, S., & Singh, V. (2020). NHR-49 Transcription factor regulates immunometabolic response and survival of

- Caenorhabditis elegans* during *Enterococcus faecalis* infection. *Infection and Immunity*, 88(8), 1–16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00130-20>
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Dirksen, P., Marsh, S. A., Braker, I., Heitland, N., Wagner, S., Nakad, R., Mader, S., Petersen, C., Kowallik, V., Rosenstiel, P., Félix, M. A., & Schulenburg, H. (2016). The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC Biology*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0258-1>
- Escorcía, W., Ruter, D. L., Nhan, J., & Curran, S. P. (2018). Quantification of lipid abundance and evaluation of lipid distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(133), 1–6. <https://doi.org/10.3791/57352>
- Estrada, J. A., & Contreras, I. (2019). Nutritional modulation of immune and central nervous system homeostasis: The role of diet in development of neuroinflammation and neurological disease. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051076>
- Ferreira, S. R., Mendes, T. A. O., Bueno, L. L., de Araújo, J. V., Bartholomeu, D. C., & Fujiwara, R. T. (2015). A New methodology for evaluation of nematode viability. *BioMed Research International*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/879263>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fontana, L., & Partridge, L. (2015). Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*, 161(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.020>
- Francolini, I., & Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 227–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x>
- Frézal, L., & Félix, M. A. (2015). *C. elegans* outside the Petri dish. *ELife*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., & Nychas, G.-J. (2013). Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium chloride. *PLoS ONE*, 8(10), e77276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>
- Greer, E. L., & Brunet, A. (2009). Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*, 8(2), 113–127. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00459.x>
- Guo, N., Wang, J., & Wang, X. (2019). Effect of starvation and high-carbohydrate diet on learning ability of *Caenorhabditis elegans*. *Heliyon*, 5(3), e01289. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01289>
- Guzman, A. C. DE, Kim, E. J., Cho, J. H., Kim, J. H., & Choi, S. S. (2020). High Glucose Diet Attenuates Dopaminergic Neuronal Function in *C. elegans* Leading to Acceleration of

- Haggart, J. (2017). Biofilm metabolomics: the development of mass spectrometry and chromatographic methodology for the analysis of dual-species pathogenic biofilms. *PhD Thesis*.
- Han, M.-L., Zhu, Y., Creek, D. J., Lin, Y.-W., Gutu, A. D., Hertzog, P., Purcell, T., Shen, H.-H., Moskowitz, S. M., Velkov, T., & Li, J. (2019). Comparative metabolomics and transcriptomics reveal multiple pathways associated with polymyxin killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *MSystems*, 4(1), 1–18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00149-18>
- Holt, J. E., Houston, A., Adams, C., Edwards, S., & Kjellerup, B. V. (2017). Role of extracellular polymeric substances in polymicrobial biofilm infections of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* modelled in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pathogens and Disease*, 75(5), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx052>
- Houthoofd, K., Braeckman, B. P., Lenaerts, I., Brys, K., De Vreese, A., Van Eygen, S., & Vanfleteren, J. R. (2002). Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 37(12), 1371–1378. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00173-0](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00173-0)
- Houthoofd, K., Johnson, T. E., & Vanfleteren, J. R. (2005). Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.9.1125>
- Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 734, 1–19. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>
- Hughes, S. L., Bundy, J. G., Want, E. J., Kille, P., & Stürzenbaum, S. R. (2009). The metabolomic responses of *Caenorhabditis elegans* to cadmium are largely independent of metallothionein status, but dominated by changes in cystathionine and phytochelatins. *Journal of Proteome Research*, 8(7), 3512–3519. <https://doi.org/10.1021/pr9001806>
- Irazoqui, J. E., Troemel, E. R., Feinbaum, R. L., Luhachack, L. G., Cezairliyan, B. O., & Ausubel, F. M. (2010). Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000982>
- Irazoqui, J. E., Urbach, J. M., & Ausubel, F. M. (2010). Evolution of host innate defence: Insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 47–58. <https://doi.org/10.1038/nri2689>
- Jansen, W. T. M., Bolm, M., Balling, R., Chhatwal, G. S., & Schnabel, R. (2002). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 70(9), 5202–5207. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.5202-5207.2002>
- Jenkins, A., Diep, B. A., Mai, T. T., Vo, N. H., Warrenner, P., Suzich, J., Stover, C. K., & Sellman, B. R. (2015). Differential expression and roles of *Staphylococcus aureus* virulence determinants during colonization and disease. *MBio*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.02272-14>
- Jordana-Lluch, E., Garcia, V., Kingdon, A. D. H., Singh, N., Alexander, C., Williams, P., & Hardie, K. R. (2020). A Simple polymicrobial biofilm keratinocyte colonization model for

- exploring interactions between commensals, pathogens and antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00291>
- Joshi, K. K., Matlack, T. L., & Rongo, C. (2016). Dopamine signaling promotes the xenobiotic stress response and protein homeostasis. *The EMBO Journal*, 35(17), 1885–1901. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592524>
- Kaletsky, R., Moore, R. S., Vrla, G. D., Parsons, L. R., Gitai, Z., & Murphy, C. T. (2020). *C. elegans* interprets bacterial non-coding RNAs to learn pathogenic avoidance. *Nature*, 4(February). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2699-5>
- Kawli, T., He, F., & Tan, M.-W. (2010). It takes nerves to fight infections: insights on neuro-immune interactions from *C. elegans*. *Disease Models & Mechanisms*, 3(11–12), 721–731. <https://doi.org/10.1242/dmm.003871>
- Kim, W., Hendricks, G. L., Tori, K., Fuchs, B. B., & Mylonakis, E. (2018). Strategies against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persists. *Future Medicinal Chemistry*, 10(7), 779–794. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0199>
- Kim, Y., & Mylonakis, E. (2012). *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. *Infection and Immunity*, 80(7), 2500–2508. <https://doi.org/10.1128/IAI.06350-11>
- Kirienko, N. V., Kirienko, D. R., Larkins-Ford, J., Wählby, C., Ruvkun, G., & Ausubel, F. M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. *Cell Host and Microbe*, 13(4), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.003>
- Kumar, A., Baruah, A., Tomioka, M., Iino, Y., Kalita, M. C., & Khan, M. (2019). *Caenorhabditis elegans* : a model to understand host – microbe interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Xx. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03319-7>
- Lavigne, J.-P., Audibert, S., Molinari, N., O’Callaghan, D., & Keriél, A. (2013). Influence of a high-glucose diet on the sensitivity of *Caenorhabditis elegans* towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. *Microbes and Infection*, 15(8–9), 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.04.006>
- Lavigne, J.-P., Nicolas-Chanoine, M.-H., Bourg, G., Moreau, J., & Sotto, A. (2008). Virulent synergistic effect between *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* assayed by using the *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS ONE*, 3(10), e3370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003370>
- Lee, K., & Mylonakis, E. (2017). An intestine-derived neuropeptide controls avoidance behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Reports*, 20(10), 2501–2512. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.053>
- Lee, S.-J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell Metabolism*, 10(5), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.003>
- Lemieux, G. A., & Ashrafi, K. (2015). Neural regulatory pathways of feeding and fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Genetics*, 49, 413–438. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092244>
- Lewenza, S., Charron-Mazenod, L., Giroux, L., & Zamponi, A. D. (2014). Feeding behaviour

- of *Caenorhabditis elegans* is an indicator of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *PeerJ*, 2014(1), 1–19. <https://doi.org/10.7717/peerj.521>
- Li, L., Chen, Y., Chenzhao, C., Fu, S., Xu, Q., & Zhao, J. (2018). Glucose negatively affects Nrf2/SKN-1-mediated innate immunity in *C. elegans*. *Aging*, 10(11), 3089–3103. <https://doi.org/10.18632/aging.101610>
- Limoli, D. H., Whitfield, G. B., Kitao, T., Ivey, M. L., Davis, M. R., Grahl, N., Hogan, D. A., Rahme, L. G., Howell, P. L., O'Toole, G. A., & Goldberg, J. B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* alginate overproduction promotes coexistence with *Staphylococcus aureus* in a model of cystic fibrosis respiratory infection. *MBio*, 8(2), 1–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00186-17>
- Lister, J. L., & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(DEC), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>
- Magalhães, A. P., Lopes, S. P., & Pereira, M. O. (2017). Insights into cystic fibrosis polymicrobial consortia: the role of Species Interactions in Biofilm Development, Phenotype, and Response to In-Use Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02146>
- Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., & Cincaro, L. (2017). Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 819–832. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12705>
- McDonald, P. W., Jessen, T., Field, J. R., & Blakely, R. D. (2006). Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4–6), 591–616. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9003-6>
- Mendler, M., Schlotterer, A., Morcos, M., & Nawroth, P. (2012). Understanding diabetic polyneuropathy and longevity: what can we learn from the nematode *Caenorhabditis elegans*? *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 120(04), 182–183. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304570>
- Mendler, Michael, Riedinger, C., Schlotterer, A., Volk, N., Fleming, T., Herzig, S., Nawroth, P. P., & Morcos, M. (2017). Reduction in ins-7 gene expression in non-neuronal cells of high glucose exposed *Caenorhabditis elegans* protects from reactive metabolites, preserves neuronal structure and head motility, and prolongs lifespan. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 31(2), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.09.014>
- Mendler, Michael, Schlotterer, A., Ibrahim, Y., Kukudov, G., Fleming, T., Bierhaus, A., Riedinger, C., Schwenger, V., Herzig, S., Hecker, M., Tyedmers, J., Nawroth, P. P., & Morcos, M. (2015). daf-16/FOXO and glod-4/glyoxalase-1 are required for the life-prolonging effect of human insulin under high glucose conditions in *Caenorhabditis elegans*. *Diabetologia*, 58(2), 393–401. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3415-5>
- Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>
- Mörck, C., & Pilon, M. (2006). *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Developmental Biology*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-39>

- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J., & Calderwood, S. B. (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15675–15680. <https://doi.org/10.1073/pnas.232568599>
- Nass, R., & Blakely, R. D. (2003). The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 521–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135934>
- Orazi, G., & O'Toole, G. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* sensitivity to vancomycin in a biofilm model of cystic fibrosis infection. *MBio*, 8(4), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00873-17>
- Peleg, A. Y., Tampakakis, E., Fuchs, B. B., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., & Mylonakis, E. (2008). Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14585–14590. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805048105>
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., & Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology*, 64(4), 323–334. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000032>
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2012). Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 193–213. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>
- Pinkas, A., Lawes, M., & Aschner, M. (2018). System-specific neurodegeneration following glucotoxicity in the *C. elegans* model. *NeuroToxicology*, 68(July), 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.07.005>
- Pukkila-Worley, R., Ausubel, F. M., & Mylonakis, E. (2011). *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathogens*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002074>
- Raizen, D., Song, B. M., Trojanowski, N., & You, Y. J. (2012). Methods for measuring pharyngeal behaviors. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–13. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.154.1>
- Rodrigues, C. F., Salgueiro, W., Bianchini, M., Veit, J. C., Puntel, R. L., Emanuelli, T., Dernadin, C. C., & Ávila, D. S. (2018). *Salvia hispanica* L. (chia) seeds oil extracts reduce lipid accumulation and produce stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Nutrition and Metabolism*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0317-4>
- Salim, C., & Rajini, P. S. (2014). Glucose feeding during development aggravates the toxicity of the organophosphorus insecticide Monocrotophos in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Physiology & Behavior*, 131, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.022>
- Salim, C., & Rajini, P. S. (2017). Glucose-rich diet aggravates monocrotophos-induced dopaminergic neuronal dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Applied Toxicology*, 37(6), 772–780. <https://doi.org/10.1002/jat.3426>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International*, 2016(1155), 1–8.

<https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

- Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., Ibrahim, Y., Pfisterer, F., Rabbani, N., Thornalley, P., Sayed, A., Fleming, T., Humpert, P., Schwenger, V., Zeier, M., Hamann, A., Stern, D., Brownlee, M., Bierhaus, A., ... Morcos, M. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes*, 58(11), 2450–2456. <https://doi.org/10.2337/db09-0567>
- Sellegounder, D., Liu, Y., Wibisono, P., Chen, C., Leap, D., & Sun, J. (2019). Neuronal GPCR NPR-8 regulates *C. elegans* defense against pathogen infection. *Science Advances*, 5(11), eaaw4717. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4717>
- Shtonda, B. B. (2006). Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology*, 209(1), 89–102. <https://doi.org/10.1242/jeb.01955>
- Sifri, C. D., Begun, J., & Ausubel, F. M. (2005). The worm has turned - Microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology*, 13(3), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.003>
- Sifri, C. D., Begun, J., Ausubel, F. M., & Calderwood, S. B. (2003). *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71(4), 2208–2217. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2208-2217.2003>
- Singh, J., & Aballay, A. (2020). Neural control of behavioral and molecular defenses in *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiology*, 62, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.10.012>
- Song, S., Zhang, X., Wu, H., Han, Y., Zhang, J., Ma, E., & Guo, Y. (2014). Molecular basis for antioxidant enzymes in mediating copper detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 9(9), e107685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107685>
- Stefani, S., Campana, S., Cariani, L., Carnovale, V., Colombo, C., Lleo, M. M., Iula, V. D., Minicucci, L., Morelli, P., Pizzamiglio, G., & Taccetti, G. (2017). Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(6), 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.004>
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 318–328. <https://doi.org/10.1038/nri1810>
- Stuhr, N. L., & Curran, S. P. (2020). Bacterial diets differentially alter lifespan and healthspan trajectories in *C. elegans*. *Communications Biology*, 3(1), 653. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01379-1>
- Sulston, J., Dew, M., & Brenner, S. (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 163(2), 215–226. <https://doi.org/10.1002/cne.901630207>
- Tan, M. W., Mahajan-Miklos, S., & Ausubel, F. M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 715–720. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.715>
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*, 282(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>

- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1–2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5)
- Vega, N. M., Allison, K. R., Samuels, A. N., Klempner, M. S., & Collins, J. J. (2013). *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14420–14425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308085110>
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in Chemistry*, 7(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Weir, H. J., Yao, P., Huynh, F. K., Escoubas, C. C., Goncalves, R. L., Burkewitz, K., Laboy, R., Hirsche, M. D., & Mair, W. B. (2017). Dietary restriction and AMPK increase lifespan via mitochondrial network and peroxisome remodeling. *Cell Metabolism*, 26(6), 884–896.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.024>
- Wong, Y. C., El Ghany, M. A., Ghazzali, R. N. M., Yap, S. J., Hoh, C. C., Pain, A., & Nathan, S. (2018). Genetic determinants associated with *in vivo* survival of *Burkholderia cenocepacia* in the *Caenorhabditis elegans* model. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01118>
- Wu, Z., Isik, M., Moroz, N., Steinbaugh, M. J., Zhang, P., & Blackwell, T. K. (2019). Dietary restriction extends lifespan through metabolic regulation of innate immunity. *Cell Metabolism*, 29(5), 1192–1205.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.013>
- Yadav, M. K., Chae, S. W., Go, Y. Y., Im, G. J., & Song, J. J. (2017). In vitro multi-species biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during *in vivo* colonization of an otitis media rat model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(APR), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00125>
- Yin, J.-A., Liu, X.-J., Yuan, J., Jiang, J., & Cai, S.-Q. (2014). Longevity manipulations differentially affect serotonin/dopamine level and behavioral deterioration in aging *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 34(11), 3947–3958. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4013-13.2014>
- Zhang, R., & Hou, A. (2013). Host-microbe interactions in *Caenorhabditis elegans*. *ISRN Microbiology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/356451>
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Giordani, R. B., Conceição, J. M., Nicastro, G. G., Boechat, A. L., Baldini, R. L., Abraham, W.-R., & Termignoni, C. (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus inhibits bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, 15(7), 2008–2018. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12082>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Programa de Pós-Graduação em Biociências

Desenvolvimento de ensaios para avaliação de função efetora e neutralizante de anticorpos contra SARS-CoV-2 utilizando o pseudovírus SARS-CoV-2 (HIV-1/NG/NanoLuc)

Gabriel Tardin Mota Hilario

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior

Coorientador: Dra. Cristina B. Cazabuena Bonorino

Coorientador: Dr. Tiago Fazolo

Porto Alegre

junho 2021

Desenvolvimento de ensaios para avaliação de função efetora e neutralizante de anticorpos contra SARS-CoV-2 utilizando o pseudovírus SARS-CoV-2 (HIV-1/NG/NanoLuc)

Gabriel Tardin Mota Hilario

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior

Coorientador: Dra. Cristina B. Cazabuena Bonorino

Coorientador: Dr. Tiago Fazolo

Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1.	Pandemia	1
1.2.	Resposta imune ao SARS-CoV-2	3
1.3.	Os coronavírus e anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2.....	4
1.4.	Pseudovírus.....	8
2.	Objetivos.....	9
2.1.	Objetivo geral.....	9
2.2.	Objetivos específicos	9
3.	Metodologia.....	10
3.1.	Aspectos Éticos e população de estudo	10
3.2.	Enzimaimunoensaio – ELISA.....	10
3.3.	Expressão e purificação de proteínas recombinantes de SARS-CoV2. 11	
3.4.	Linhagem celular HEK293-ACE2.....	12
3.5.	Ensaio de bloqueio de ligação de proteínas recombinantes do SARS-CoV-2 com receptor ACE2 por plasma neutralizante.	12
3.6.	Produção de Vírus pseudotipado SARS-CoV-2 HIV-1/NG/NanoLuc 13	
3.7.	Ensaio de infectividade	14
3.8.	Análise microscópica	14
3.9.	Ensaio para avaliação de plasma neutralizante com pseudovírus 14	
3.10.	Ensaio de opsonização e fagocitose dependente de Ac com vírus inativado	15
3.11.	Ensaio de opsonização e fagocitose dependente de anticorpo com pseudovírus.....	15
3.12.	Ativação do complemento mediada por Ac	16
3.13.	Análise estatística e correlações.....	16
4.	Cronograma	17
5.	Orçamento.....	17

Resumo

O SARS-CoV-2 é o vírus respiratório causador de síndrome respiratória aguda grave. Em março de 2020 esse vírus já havia se espalhado pelo mundo e a doença causada por ele, a COVID-19 foi considerada pela Organização Mundial da Saúde como pandêmica. Com a continuidade da pandemia, e a ausência de tratamentos específicos, os anticorpos neutralizantes tornam-se uma importante alternativa para o combate desse vírus. A busca por conhecimento sobre a formação de anticorpos contra SARS-CoV-2, incluindo suas especificidades, tempo de formação e capacidade neutralizante tem sido intensa durante toda a pandemia. Testes rápidos para diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, a utilização de plasma convalescente, análise de resposta cruzada com SARS-CoV e outros coronavírus, definição de indivíduo protegido contra a reinfecção, e até mesmo imunoterapias com anticorpos monoclonais, dependem do conhecimento da resposta sorológica específica para o SARS-CoV-2. Assim, esse estudo tem como objetivo desenvolver e validar testes que irão compor um sistema estratégico articulado para avaliar a capacidade neutralizante e funcionalidade de anticorpos contra o SARS-CoV-2, assim investigar e caracterizar anticorpos neutralizantes das classes IgM e IgG contra o SARS-CoV-2 no plasma de indivíduos que tiveram COVID-19 e/ ou vacinados. Para alcançar esses objetivos será realizado a produção de proteína S recombinante, ensaio imunoenzimático (ELISA), produção de vírus pseudotipado e a construção uma de linhagem celular para expressar ACE2. A triagem dos plasmas será pelo método de ELISA, os ensaios de neutralização e opsonização serão realizados por citometria de fluxo, titulação de pseudovírus e microscopia de fluorescência. Esse projeto está inserido em um estudo maior o edital CAPES - Desenvolvimento de terapias de base imunológica para tratamento da COVID-19 (Fármacos e Imunologia), cujo um dos objetivos contempla este projeto. Em etapas futuras do projeto, a partir da identificação dos melhores plasmas, selecionados e avaliados quanto ao seu potencial neutralizante para o SARS-CoV-2 *in vitro*, serão

isolados clones de linfócitos B desses indivíduos para a produção de anticorpos com alta capacidade neutralizante.

Palavras-chaves: Anticorpos neutralizantes , pseudovírus, ensaio de neutralização, anticorpos contra SARS-CoV-2.

Abstract

SARS-CoV-2 is the respiratory virus that causes severe acute respiratory syndrome. In March 2020 this virus had already spread throughout the world and the disease caused by it, COVID-19 was considered by the World Health Organization as a pandemic. With the pandemic continuation, the absence of specific treatment, neutralizing antibodies become an important alternative for combating this virus. The search for knowledge about the antibody formation against SARS-CoV-2, including its specificities, formation time and neutralizing capacity, has been intense throughout the pandemic. Rapid tests for the SARS-CoV-2 infection diagnosis, the use of convalescent serum, investigation of SARS-CoV-2 cross-response with other coronaviruses, definition individual protected against reinfection, and even immunotherapies with monoclonal antibodies, depend on the knowledge about specific serological response against SARS-CoV-2. Thus, this study aims to investigate and characterize The humoral immune response with neutralizing antibodies and the establishment of an investigation technique for neutralizing IgM and IgG against SARS-CoV-2 in the serum of those who had COVID-19. This project is part of a larger study called CAPES - Development of immunological-based therapies for the treatment of COVID-19 (Drugs and Immunology), whose one of the objectives is contemplated in this project. In future stages of the project, based on the identification of the best sera, selected and chosen in terms of their SARS-CoV-2 neutralizing potential in vitro, the B lymphocyte of this sera will be cloned for the production of high neutralizing antibodies capacity.

Keywords: Neutralizing antibodies, pseudovirus, neutralization assay, antibodies against SARS-CoV-2.

1. Introdução

1.1. Pandemia

A humanidade já enfrentou quatro pandemias por vírus respiratório, sendo elas a gripe espanhola em 1918 causada pelo vírus H1N1, a gripe asiática em 1957 causada pelo vírus H2N2 a gripe de Hong Kong em 1968 causada pelo vírus H3N2 e a gripe pandêmica de 2009 causada pelo H1N1(1). Atualmente, estamos passando pela quinta pandemia por vírus respiratórios, causada pelo betacoronavírus SARS-CoV-2. Surtos de infecções virais relacionadas aos betacoronavírus estão cada vez mais recorrentes, três cepas estão relacionadas a surtos recentes e a síndrome respiratória grave, são elas a SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. O SARS-CoV identificado na China se espalhou para 32 países ou regiões diferentes entre novembro de 2002 e agosto de 2003, com taxa de letalidade de 11%(2). O MERS-CoV foi identificado na Arábia Saudita em 2012, com 2.494 casos e 858 mortes em 27 países diferentes (taxa de letalidade: 34,4%)(3). O SARS-CoV-2 foi identificado em Wuhan, na China, em dezembro de 2019, revelando-se o novo agente causador da doença respiratória aguda grave (DRAG), em março de 2020 o vírus já tinha afetado 275 469 pessoas no mundo e com 11420 mortes, em menos de três meses espalhou-se para 14 países, em março de 2020 foi declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como responsável pela pandemia COVID-19, que já dura mais de um ano (4),(5).

A terapia por plasma convalescente, que consiste na transferência de plasma com anticorpos neutralizantes produzidos por pacientes que já passaram pela infecção, foi muito utilizada no período mais crítico da pandemia. Entretanto, essa terapia apresentou resultados variados que dependiam do estágio da doença e títulos de anticorpos no plasma dos doadores. Métodos confiáveis para a titulação desses anticorpos, e principalmente avaliação da capacidade neutralizante, foram limitadores(6). Os anticorpos (Ac) mostraram-se a principal arma para combater a COVID-19, sendo utilizados para diagnóstico, investigados para imunoterapia ou

utilizados para analisar proteção por vacina. Um dos métodos utilizados para o diagnóstico é a procura por anticorpos IgG e IgM contra a proteína S do vírus, entretanto apenas detectar esses anticorpos não é suficiente para determinar a proteção. Medir a funcionalidade do Ac é o que mais se relaciona uma imunidade protetora, métodos eficazes de ensaios de neutralização se fazem necessários como uma estratégia de combate a pandemias virais. Estabelecer um método eficaz de medir capacidade de neutralização torna possível isolar e produzir esses anticorpos, viabilizando o desenvolvimento de imunoterapias contra o SARS-CoV-2 além de permitir melhor entendimento da resposta imunológica contra o vírus. Entretanto, para a avaliação da capacidade neutralizante de anticorpos anti-SARS-CoV-2 é necessário o cultivo do vírus selvagem em laboratório com nível de biossegurança 3 (NB-3), o qual é extremamente caro tanto para a sua construção quanto manutenção e experimentação, e necessita treinamento especializado. Existem poucos laboratórios NB-3 no mundo, menos ainda no Brasil e apenas um (01) em Porto Alegre. Uma alternativa a utilização de vírus selvagens são os pseudovírus, que não necessitam de NB-3, e, dependendo do modelo, produzem resultados muito confiáveis. Esse projeto contempla o desenvolvimento de métodos para identificação e caracterização de anticorpos neutralizantes para imunoterapia e análise de função efetora de anticorpos contra SARS-CoV-2 desenvolvidos por pacientes que foram vacinados, e/ou infectados pelo SARS-CoV-2 utilizando o modelo de pseudovírus (HIV-1/NG/NanoLuc) (figura 1). Esse trabalho está dentro de um projeto CAPES - Desenvolvimento de terapias de base imunológica para tratamento da COVID-19 (Fármacos e Imunologia) que propõem estabelecer a metodologia e a clonagem de anticorpos para combate a pandemia.

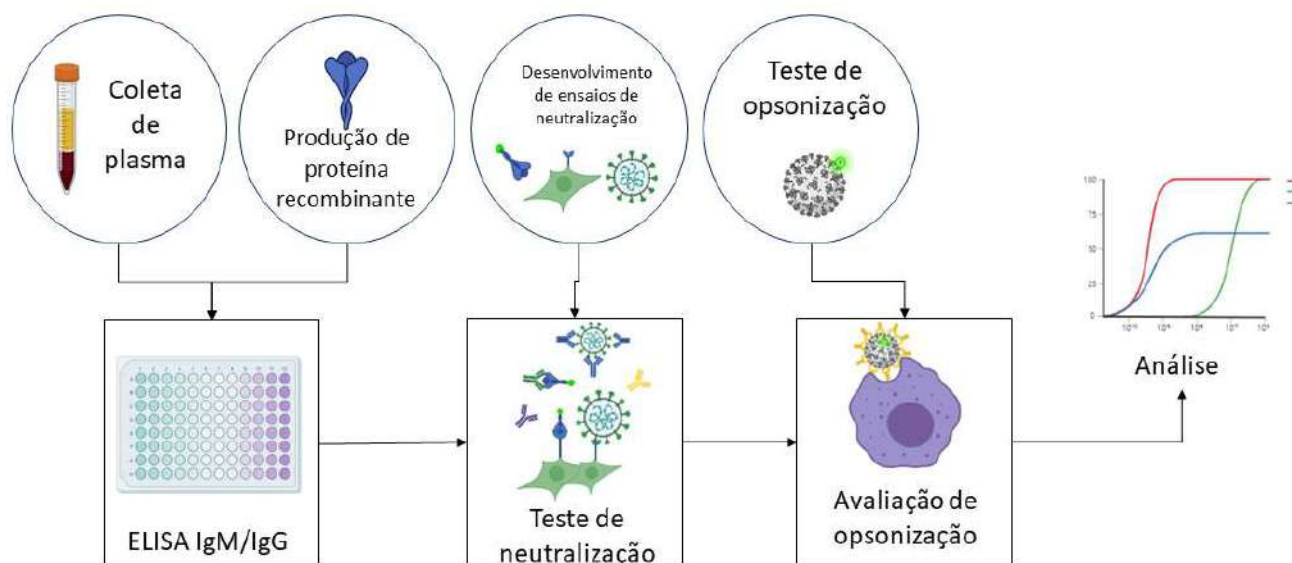


Figura 1: Ilustração das etapas propostas neste projeto. Será produzida a proteína S do SARS-CoV-2 de forma recombinante. A proteína será utilizada para a detecção e quantificação de anticorpos IgG anti-S no plasma de pacientes infectados ou vacinados. Plasmas com altos títulos de anticorpos contra proteína S serão testados quanto sua capacidade de neutralização utilizando um sistema de pseudovírus e internalização via ACE2, função efetora de opsonização por ensaio de fagocitose dependente de anticorpos analisado por microscopia e citometria de fluxo.

1.2. Resposta imune ao SARS-CoV-2

O perfil imune encontrado em pacientes infectados, principalmente aqueles que necessitam de internação em unidade de tratamento intensivo, é caracterizado como linfopenia e níveis plasmáticos aumentados de citocinas inflamatórias, o que indica que a patologia da doença não é apenas causada pela infecção, mas também pela resposta imunológica contra o patógeno(7). O início da resposta imunológica contra o SARS-CoV-2 é mediada pela resposta inata, composta por células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs), moléculas como interferon tipo I (IFN), quimiocinas e citocinas. A cascata de resposta tem início com o reconhecimento do RNA viral por receptores endossomos semelhantes a Toll (TLRs), neste caso por se tratar de um vírus de RNA os receptores são TLR3 e TLR 7. A proteína do gene I induzível por ácido retinóico citoplasmático (RIG-I) e proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5), que ativam a cascata de sinalização mediada por NFκ-β e IRF-3 induz a produção de IFN tipo I, que promove uma

série de ações antivirais(8). Estudos mostraram que diferente do que é esperado por uma infecção viral, no SARS-CoV-2 o sistema imune falha em produzir interferon tipo I e III, essenciais para resolução da doença, o que permite a replicação viral sustentada, para compensar essa falha acontece a superprodução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (9). Foi evidenciado que o SARS-CoV-2 possui sistema de evasão ao IFN, que aparece somente em uma resposta tardia na infecção, estudos revelaram que o vírus possui proteínas que atuam inibindo a produção de IFN tipo I, (10),(11). Associadamente foram encontrados auto-anticorpos contra IFN tipo I em pacientes graves, mas não foram encontrados em pacientes leves ou assintomáticos (12). Em pacientes infectados observa-se fagócitos mononucleares (MNP) hiperativados, que representam 80% do total de células no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF), sugerindo que a ativação desregulada de macrófagos, observada durante a infecção por coronavírus, participa da patogênese da doença induzida por coronavírus(13). Os marcadores da inflamação exacerbada foram identificados e são utilizados como prognóstico de piora e possível insuficiência respiratória, além de serem alvos de terapia, são eles a IL-6, IL-10, CXCL10 e IL-18 como marcador mais robusto relacionados com a sobrevivência e o TNF- α como segundo preditor de piora por estar relacionado a dano a órgãos(14),(15).

1.3. Os coronavírus e anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2

Os coronavírus (CoV) são vírus da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*) são vírus de RNA de fita simples de sentido positivo que se subdividem em quatro gêneros: alfa, beta, gama e delta. Eles podem causar resfriados comuns ou até mesmo doenças respiratórias e sistêmicas letais. Os vírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 estão todos dentro do gênero dos betacoronavírus. Suas proteínas são classificadas em estruturais [S (espícula), N (nucleocapsídeo), E (envelope) e M (membrana)] e proteínas acessórias, que estão relacionadas a montagem do vírion e com sua

habilidade de escapar do sistema imunológico, quando dentro do hospedeiro(16). A proteína M é responsável pela forma do vírion , é um dímero que mantém a curvatura da membrana e se liga ao nucleocapsídeo(17). A proteína E é uma proteína transmembrana, desempenha o papel de montagem e liberação do vírus, além de função de canal iônico(17). A proteína N é uma parte do nucleocapsídeo, sua função é o empacotamento do genoma viral(17). Os CoVs expressam uma glicoproteína de superfície, a glicoproteína Spike (S), que está relacionada com a entrada viral na célula(18). Existe uma homologia na proteína S nos diferentes CoVs que infectam diferentes hospedeiros, no caso de vírus do morcego, hospedeiro natural, existe uma homologia de 76% com a S do SARS-CoV-2 humano(19). Nos betacoronavírus a proteína S possui um domínio de ligação chamado RBD, o qual SARS-CoV-2 utiliza para interação com seu receptor na célula alvo, denominado enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), (20). A proteína S faz a fixação, fusão e transmissão viral (figura 2), ela é dividida em duas subpartes a S1, que liga no receptor da célula, essa subunidade ainda pode ser dividida nas partes N-terminal e porção RBD, região de encaixe com o receptor da célula, e a subparte S2, que é a responsável pela fusão(21). Estudos soroepidemiológicos sobre COVID-19 indicam que os pacientes infectados por esse vírus desenvolvem anticorpos principalmente contra as proteínas S e N, revelando um papel importante para o diagnóstico e alvo de terapias(22). Considerando esses mecanismos, os anticorpos neutralizantes anti-S são fundamentais para bloquear efetivamente etapas da fusão S: ACE2, o que é, inclusive, mais eficiente do que algumas drogas inibidoras de fusão.

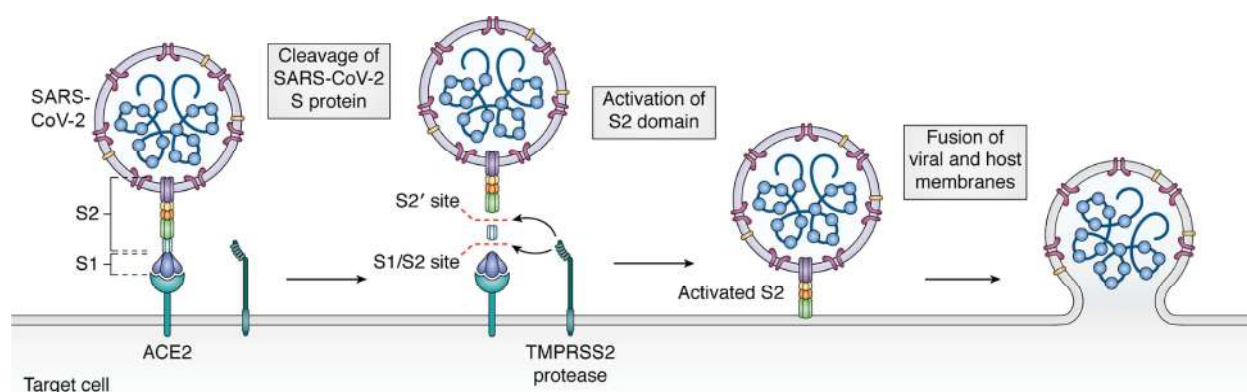


Figura 2 : Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 via proteína S. A proteína S do vírus se engaja no receptor humano ACE2 via RBD-S1, é clivada por protease em S1/S2 e S2, ativando S2 conduzindo a fusão do vírus com a célula (23).

A resposta humoral atua por anticorpos que se complexam com o vírus e o neutralizam, bloqueando sua entrada nas células, anticorpos neutralizantes são considerados o principal correlato de imunidade protetora e sucesso da vacina(24)(25). Entre as proteínas estruturais do SARS-CoV-2, a única capaz de induzir anticorpos neutralizantes eficientes identificada até agora foi a proteína S(26). Apesar dos casos reportados de reinfecção, os quais indicam que nem todo indivíduo desenvolve imunidade protetora, foi encontrado proteção contra reinfecção mediada por anticorpos anti-S, por pelo menos seis meses, indicando a possibilidade de imunidade protetora através de resposta humoral (27). Após entendimento do mecanismo de entrada do vírus iniciou-se a busca por terapias que pudessem bloquear a ligação RBD-ACE2, porta de entrada do SARS-CoV-2, a primeira hipótese foi a busca por anticorpos neutralizantes com o alvo a porção RBD, incluindo os cruzados com SARS-CoV-1, devido a semelhança entre os vírus e por utilizarem o mesmo mecanismo de entrada, entretanto não foram encontrados esses anticorpos cruzados com capacidade de neutralização(28). A busca por anticorpos neutralizantes mostrou que diferentes anticorpos tinham diferentes capacidades neutralizantes. Por ser tratar de um vírus de RNA, o qual é capaz de mutações muito rápidas, principalmente na porção RBD, isso leva ao escape total do vírus a anticorpos neutralizantes, assim, um único anticorpo monoclonal pode não ser uma opção para terapia. Além disso, utilizar um único anticorpo monoclonal como terapia poderia acabar por selecionar clones do vírus capazes de escapar da neutralização, selecionando variantes mais resistentes. Diante disso, observa-se que pode ser necessário não um anticorpo neutralizante para combater o vírus, mas um coquetel de anticorpos (29). No caso de SARS-CoV-2, esses anticorpos são detectados em aproximadamente 40% -70% dos indivíduos infectados, dependendo dos critérios e da coorte estudada. Pelo menos 30% dos pacientes não têm níveis detectáveis de anticorpos e menos de 15% atingem altos títulos de neutralização *in vitro* (30,31). Além da atividade neutralizante, os anticorpos

desenvolvem funções adicionais dependendo de seu isotipo tais como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP); e a citotoxicidade dependente do complemento (CDC), sendo todas funções dependentes da porção Fc de anticorpo(32).

As variantes do SARS-CoV-2 começaram a surgir e com elas novas ondas de infecção, principalmente por terem se tornado mais infectantes, como a variante B.1.351 da África ou a P.1 do Brasil. A maioria dessas variantes sofreram mutação na porção RBD da proteína S, o que sugere que anticorpos previamente gerados podem perder a capacidade de combater as novas variantes. Estudos mostraram uma queda no poder neutralizante dos anticorpos induzidos por algumas vacinas, mas ainda com ação de proteção (19). O mecanismo de escape do vírus a anticorpos podem ocorrer por meio de variações da sequência de aminoácidos ou mesmo de conformação estrutural do epítipo reconhecido pelo anticorpo, então encontrar um anticorpo neutralizante potente, capaz de neutralizar as diversas variantes, é uma busca por um anticorpo específico para uma região conservada entre as variantes e que tenha a capacidade de bloquear a entrada do vírus na célula(33). **Diante disso, é evidente que estudos que envolvam análise e otimização de anticorpos contra o SARS-CoV-2 são extremamente relevantes na situação atual. Neste projeto, serão desenvolvidas metodologias celulares e moleculares que investigam a resposta humoral e a capacidade neutralizante dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 e suas funções efetoras no plasma de indivíduos infectados pelo vírus e/ou vacinados. O modelo desenvolvido tem extrema importância para combater problemas de saúde pública decorrentes de infecções virais.**

1.4. Pseudovírus

Um pseudovírus é uma partícula viral recombinante com seu núcleo, estrutura e proteínas de envelope derivadas de diferentes vírus (34). Os pseudovírus são capazes de infectar células suscetíveis, mas eles realizam apenas um ciclo replicativo (35). Os pseudovírus são amplamente utilizados para estudos do tropismo celular, reconhecimento de receptores e inibição de vírus, bem como para o desenvolvimento e avaliação de anticorpos e vacinas (36,37). O ensaio de neutralização de anticorpos com pseudovírus tem sido amplamente utilizado, particularmente para as análises de alguns vírus virulentos, incluindo o SARS-CoV-2. Em comparação com os ensaios tradicionais, os ensaios utilizando pseudovírus demonstram uma boa correlação com o ensaio baseado em vírus selvagem, sendo caracterizados como os ensaios de alto rendimento com menor quantidades de amostras de soro (38)(39).

Atualmente, o pseudovírus SARS-CoV-2 contendo a proteína S é o sistema pseudoviral mais desenvolvido. Como vários estudos verificaram que o SARS-CoV-2 usa ACE2 como o receptor de superfície da célula hospedeira, ensaios de neutralização de anticorpos direcionam a proteína S com base em pseudovírus SARS-CoV-2 foram amplamente investigados (40–42). Um dos modelos mais eficientes de pseudovírus construído foi o produzido por Paul D. Bieniasz et al 2020 (43). Nesse modelo foi utilizada a estrutura de replicação do vírus HIV-1, expressa por meio de um plasmídeo pró-viral com defeito de replicação, e que não apresenta o gene Env funcional e associado a sequências que codificam a proteína luciferase NanoLuc no lugar do gene Nef (pHIV1NLΔEnv-NanoLuc). Nesta construção proviral a luciferase NanoLuc apresenta uma luminiscência cerca de 100 vezes mais brilhante que a luciferase do vaga-lume, facilitando a detecção de mesmo um pequeno número de células infectadas. O pseudovírus SARS-CoV-2 (HIV-1/NG/NanoLuc) é produzido pela transfecção com três plasmídeos, o pHIVNLGagPol, o pCCNanoLucGFP e o pCMV-SARS-CoV2 S. Esse último

apresenta uma deleção de 19 aa da extremidade carboxiterminal da proteína S, o que melhora o transporte para a membrana do envelope viral.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver sistemas para identificação e caracterização de anticorpos funcionais para uso em imunoterapia e triar na população local anticorpos contra o SARS-CoV-2 investigando potenciais anticorpos neutralizantes para futura clonagem e produção.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Produzir a proteína S recombinante do SARS-CoV-2.

2.2.2 Montar um ELISA indireto *in house* utilizando a proteína S recombinante do SARS-CoV-2 e titular de anticorpos IgG e IgM desse vírus no plasma dos pacientes infectados e/ou vacinados.

2.2.3 Montar a linhagem celular HEK293/hACE2

2.2.4 Desenvolver ensaio para avaliar capacidade neutralizante de anticorpos anti-S utilizando um modelo de pseudovírus

2.2.5 Avaliar capacidade de opsonização e função efetora de anticorpos anti-S em vírus inativado.

2.2.6 Produção de artigo científico.

3. Metodologia

3.1. Aspectos Éticos e população de estudo

Esse estudo faz parte do projeto Desenvolvimento de terapias de base imunológica para tratamento da COVID-19, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, sob o número 4.487.865.

Serão utilizados plasma de pacientes oriundos do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, selecionados por teste molecular e classificados por sintomas apresentados. Os pacientes vacinados serão selecionados como amostras de conveniência, classificados pelo tempo de vacinação, tipo de vacina (Coronovac, Astrazeneca ou Pfizer) e se teve ou não infecção prévia por SARS-CoV-2. Todos os pacientes preencherão uma ficha de dados demográficos e assinarão o termo de confidencialidade. O sangue desses pacientes será coletado em tubo de EDTA, centrifugados por 1600 rpms e o plasma coletado e armazenado em -80°C até ser analisado.

3.2. Enzimaimunoensaio – ELISA

Para análise da presença e título de anticorpos contra proteínas do SARS-CoV-2, será padronizado, no Laboratório de Imunovirologia da UFCSPA, a técnica de enzimaimunoensaio (ELISA) in-house. A técnica de ELISA será realizada conforme previamente publicada por Kramer (44). Placas de 96 poços serão sensibilizadas por 15h com 2µg/mL de proteína S por poço. Após esse tempo, será acrescentado 100µL por poço de solução de bloqueio por uma hora. Será realizada uma diluição seriada com as amostras dos pacientes, iniciando de 1:10 até 1:1000. A diluição das amostras será acrescentada as placas e incubadas por 2h à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas serão incubadas com anticorpo anti IgG/peroxidase humano. A revelação das placas será feita com 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e a reação parada com solução ácida. O ensaio será

validado quando a especificidade utilizando amostras negativas para SARS-CoV-2, a sensibilidade será avaliada a partir da diluição do plasma. A reprodutibilidade será avaliada pelo número de repetições.

3.3. Expressão e purificação de proteínas recombinantes de SARS-CoV2.

Para esse estudo será utilizado a proteína S recombinante do SARS-CoV-2, produzida com o plasmídeo pSARS-CoV2 S (gentilmente cedido por Krammer, Department of Microbiology Icahn School of Medicine at Mount Sinai, USA) que expressa a proteína S do SARS-CoV-2. O plasmídeo será amplificado em bactéria hospedeira *E. coli* DH5- α e purificados por sistema miniprep de purificação de DNA plasmídial. Após quantificação do plasmídeo, células COS-7 (ATCC CRL-1651 TM) cultivadas até confluência, serão transfectadas com o plasmídeo utilizando lipofectamineTM3000, os transformantes serão selecionados com o antibiótico kanamicina. O sobrenadante dos transformantes será separado e centrifugados a 4000RPM por 20 mim. Células -COS-7 transfectadas somente com o vetor serão utilizadas como controle. A proteína recombinante SARS-CoV-2 S apresenta resíduos de histidinas, o que permite a sua purificação por meio de cromatografia de afinidade colunas de Ni-NTA (Niquel-ácido nitrilotriacético). As proteínas serão concentradas em centricon e a qualidade da purificação será avaliada por SDS-PAGE e Western blotting utilizando anticorpos específicos contra S em parceria com o laboratório de imunoterapia da UFCSPA. A quantificação será realizada pelo método de Bradford.

3.4. Linhagem celular HEK293-ACE2.

Para os ensaios de neutralização será desenvolvida uma linha de célula que expressa em maiores quantidades a enzima ACE-2. As células HEK293T (ATCC CRL-3216™) serão transfectadas com o plasmídeo phACE2, utilizando lipofectamina. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células serão tratadas e selecionadas por resistência ao antibiótico G418. Células Hek 293 transfectadas sem o plasmídeo serão utilizadas como controle, as células selecionadas serão tripsinizadas e cultivadas em placa de 24 poços. A linhagem obtida será analisada, quanto a expressão de ACE2, por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (EVOS FLoid Imaging).

3.5. Ensaio de bloqueio de ligação de proteínas recombinantes do SARS-CoV-2 com receptor ACE2 por plasma neutralizante.

Para o ensaio de neutralização utilizando a proteína recombinante, a proteína S purificada e quantificada será conjugada com estreptavidina (HRP). A conjugação será realizada adicionando HRP ativado a proteína S na proporção de massa de 2: 1, seguido de incubação por 2 h no escuro a 25 ± 2 ° C com agitação constante. Nesse momento, será adicionado boro-hidreto de sódio à reação de conjugação, na concentração final de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$, seguido por mais 2 h de incubação no escuro a 25 ± 2 ° C com agitação constante. As proteínas conjugadas com HRP serão dialisadas em PBS e mantidas em 10 mg ml^{-1} BSA e preservadas em 0,01% de timerosal(45).

No dia anterior ao ensaio, serão semeadas 1×10^4 células HEK293-ACE2 por poço em uma placa de 96 poços com poli- L -lisina. No dia do ensaio o plasma dos pacientes selecionados pelo método de ELISA, serão inativados por banho-maria 56°C por 30 min. Posteriormente, para determinação dos títulos de bloqueio, o plasma será adicionado, em triplicata, na diluição inicial de 1:20, e pré-incubado com 3 ng de HRP-S por 1 h a 37 ° C, essa combinação soro/HRP-S será adicionada na cultura de HEK293-ACE2 e incubados por 1

hora. Os antígenos conjugados com HRP não ligados serão removidos por meio de cinco lavagens com solução salina tamponada com fosfato, Tween-20 a 0,05% (PBST). O sinal colorimétrico será desenvolvido na reação enzimática de HRP com um substrato cromogênico, 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Um volume igual de solução de parada TMB será adicionado para interromper a reação, a leitura das absorbâncias será realizada em espectrofotômetro(45).

3.6. Produção de Vírus pseudotipado SARS-CoV-2 HIV-1/NG/NanoLuc

O sistema para a produção do vírus pseudotipado SARS-CoV-2 (HIV-1/NG/NanoLuc) foi cedido pelo Dr. Paul D. Bieniasz (Rockefeller University, NY), e a produção será realizada conforme Schimdt F, 2020(46) . Células HEK293 serão cultivadas em meio DMEM e em garrafas de 75cm² até confluência de 70%. Essas células serão transfectadas com três plasmídeos simultaneamente (pCCNanoLuc2AEGFP + pHIV_{NL}Gag Pol + pSARS-CoV-2 Δ19) (Figura 3). A transfecção será realizada utilizando polyethylenimina (PEI). O controle será produzido pelo mesmo modelo de transfecção, com a omissão do plasmídeo que codifica a proteína S. Quarenta e oito horas após a transfecção o sobrenadante será isolado, clarificado por centrifugação a 300g por 5 minutos, filtrado em filtro de 0.22μm, alíquotado e congelado a -80°C.

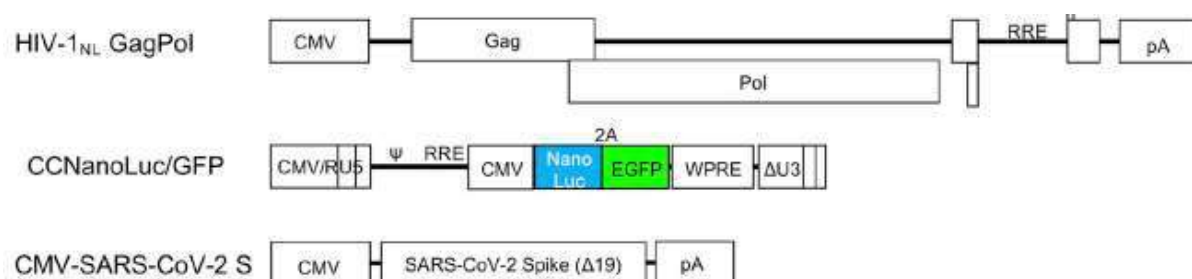


Figura 3: Construções gênicas utilizadas para produção do pseudovírus SARS- COV-2 HIV-1/NG/NanoLuc: Serão utilizados os plasmídeos pHIV-1_{NL}GagPol (gene repórter do HIV); pCCNanoLuc/GFP (gene reportar da luciferase e EGFP) e o pSARS-CoV-2 Δ19 (gene a proteína S do SARS-CoV-2). Fonte da figura Schimdt F, 2020(46).

3.7. Ensaio de infectividade

Para medir a infecciosidade dos pseudovírus SARS-CoV-2 HIV-1/NG/NanoLuc produzidos, os estoques virais serão diluídos em série e 100µl de cada diluição adicionada às células HEK293ACE2 cultivada em meio DMEM 10% SFB (104 células / poço em 100 µl). As células serão cultivadas por 48h e o sobrenadante recolhido e a eficiência de infecção analisada por citometria de fluxo em FACSCanto II e ensaio para medida da luciferase utilizando o equipamento Glomax.

3.8. Análise microscópica

Para avaliação da infecção de células in vitro com o pseudovírus SARS-CoV-2 HIV-1/NG/NanoLuc células HEK293 ACE2 (1×10^4 /poço) serão cultivadas em placas de 24 poços até 70% de confluência. As células serão infectadas com a melhor diluição de pseudovírus (determinada no experimento 3.7). A cultura será mantida por 48h, a infecção será avaliada por microscopia de fluorescência (detecção e EGFP) utilizando o microscópio EVOS FLoid Imaging.

3.9. Ensaio para avaliação de plasma neutralizante com pseudovírus

Para o ensaio de neutralização de pseudovírus, no dia anterior ao ensaio 1×10^4 células HEK293-ACE2 serão semeadas por poço, em placa de 96 poços tratadas com poli-L-lisina. No dia do ensaio o plasma dos pacientes selecionados pelo método de ELISA, serão inativados por banho-maria 56°C por 30 min, posteriormente para determinação dos títulos de bloqueio, o plasma será utilizado em uma diluição seriada tripla iniciando em 1:20 e pré-incubado com pseudovírus $\sim 2-4 \times 10^6$ RLU /mL 37°C por 1 h. Após a 1h de incubação pseudovírus-plasma será adicionado a placa com as células HEK293-ACE2 incubado a 37°C por 16h. Após o período de incubação as

células serão coletadas por tripsina, lavadas com PBS BSA 3% e analisadas por citometria de fluxo.

3.10. Ensaio de opsonização e fagocitose dependente de Ac com vírus inativado

O plasma dos pacientes será testado quanto a capacidade de opsonização do vírus, esse ensaio utilizara vírus inativado por UV cedido por Fernando Spilki, FEEVALE. O vírus inativado será conjugado com rodamina B pela técnica adaptada de Zhang S. et al. 2011(47). Para o processo de conjugação uma solução de tampão bicarbonato contendo 1 mg/mL de vírus e 1mg/mL de rodamina B será incubada por 1 hora ao abrigo da luz a 37°C, após o período de incubação, o excesso de corante, será removido por resgate do vírus inativado em coluna PD-10 (**Sephadex™ G-25M**), como controle negativo o sobrenadante de células passará pelo mesmo processo.

O plasma dos pacientes selecionados pelo método de ELISA, serão inativados por banho-maria 56°C por 30 min, posteriormente para determinação da capacidade de opsonização, o plasma será utilizado em uma diluição seriada tripla iniciando em 1:250 e pré-incubado com vírus inativado-rodamina a 37°C por 1 h. Após a 1h de incubação o vírus-plasma será adicionado a placa com as células THP1 (**ATCC® TIB-202™**) ou macrófagos RAW (**ATCC® TIB-71™**) e incubado a 37°C por 4 horas. Seguido, a incubação, essas células serão marcadas e analisadas por microscopia de fluorescência ou coletadas e analisadas por citometria de fluxo.

3.11. Ensaio de opsonização e fagocitose dependente de anticorpo com pseudovírus

Para testar a fagocitose dependente de anticorpo, células mononucleares do sangue periférico (PMBCs) de doadores saudáveis serão usados como fonte de células fagocíticas. Os PBMCs serão isolados e corados com Cell Trace

Violet. O plasma dos pacientes selecionados pelo método de ELISA, serão inativados por banho-maria 56°C por 30 min, posteriormente o plasma será utilizado em uma diluição seriada tripla iniciando em 1:250 e pré-incubado com pseudovírus $\sim 2-4 \times 10^6$ RLU /mL 37°C por 1 h.

Os PBMCs corados serão semeados em placa e 24 poços ($1,5 \times 10^5$ / poço) e adicionado a diluição seriada do pseudovírus-plasma. No dia seguinte, as células serão lavadas com tampão FACS (PBS, 1% SFB), marcadas com anti-CD14 mAb para a identificação de monócitos. As células serão analisadas por citometria de fluxo e a fagocitose determinada pela proporção de células CD14⁺ EGFP⁺.

3.12. Ativação do complemento mediada por Ac

Para análise de ativação do complemento, será realizado a opsonização do pseudovírus como descrito anteriormente (48,49). O pseudovírus opsonizado será preparado na presença de anticorpos anti-S do SARS-CoV-2 IgG e soro humano normal como fonte de complemento ou na presença de anti-S IgG sozinho. As amostras de controle serão preparadas apenas em meio. Para opsonização, 1 µg / ml de SARS-CoV-2 (HIV-1/NG/NanoLuc) será incubado com 50 µg / ml de IgG anti-S ou com anti-S IgG e soro humano normal em diluição seriada, por 1 h a 37 ° C. O controle negativo será realizado por EDTA (20 mM) usado para inibir a ativação do complemento. A ativação do sistema complemento será observada pelos níveis de iC3b detectados por ELISA.

3.13. Análise estatística e correlações

O plasma coletado dos diferentes grupos (Vacinados, infectados, infectados e vacinados) classificados por gravidade da doença e/ou tipo de vacina (Coronovac, Astrazeneca ou Pfizer) serão analisados pelos ensaios desenvolvidos no projeto e será investigado relação entre função efetora dos anticorpos no plasma e gravidade da doença/ tipo de vacina. A análise estatística será realizada utilizando os dados de títulos de IgG anti-S e o NT50

(quantidade plasma necessário para inibir 50% da infecção). Serão comparados grupos de infectados e vacinados. Será aplicado teste Shapiro-Wilk para determinar a normalidade dos dados, seguido de ANOVA e teste de correlação de Pearson.

4. Cronograma

Atividade	1º S	2º S	3º S	4º S	5º S	6º S	7º S	8º S
Aquisição de materiais/ montagem de protocolos	X	X	X	X				
Produção de proteínas recombinantes		X	X	X				
Enzimaimunoensaio			X	X	X			
Produção de pseudovírus				X	X			
Montar a linhagem celular HEK293/hACE2				X	X			
Testes de atividade neutralizante de anticorpos					X	X	X	
Teste de opsonização/fagocitose					X	X	X	
Redação de dissertação/artigo							X	X
Apresentação de dissertação								X

5. Orçamento

Material	Quantidade	Valor Unitário	Valor total
Alíquotas Bactéria DH5-α para transformação	02	R\$ 390,00	R\$ 780,00

Kit de purificação de plasmídeo miniprep	01	R\$ 1.790,00	R\$ 1.790,00
Meio LB para cultivo de bactérias	500g	R\$ 132,00	R\$ 132,00
Meio DMEM (pacote 10x1L)	2 pacotes	R\$ 389,00	R\$ 778,00
Soro Fetal Bovino	3 frascos	R\$ 950,00	R\$ 2.850,00
Garrafa de cultura 25 cm2 (pacote 10 unidades)	6 pacotes	R\$ 58,00	R\$ 348,00
Garrafa de cultura de 75cm2 (pacote com 5 unidades)	6 pacotes	R\$ 67,00	R\$ 402,00
Placa de 6 poços	40 unidades	R\$ 8.95	R\$ 358,00
Placa de 24 poços	40 unidades	R\$ 11,03	R\$ 441,20
Lipofectamina	1 tubo	R\$ 1.527,00	R\$ 1.527,00
Kit purificação de proteína Ni-NTA	1 kit	R\$ 2. 850,00	R\$ 2.850,00
Centricon	1 caixa	R\$ 980,00	R\$ 980,00
Placas de ELISA de 96 poços	120 unidades	R\$ 9,00	R\$ 1.080,00
Anti-IgG Humana conjugada a peroxidase	1 frasco	R\$ 750,00	R\$ 750.00

Anti-IgA humana conjugada a peroxidase	1 frasco	R\$ 810,00	R\$ 810,00
TMB (frasco 500 mL)	2 frascos	R\$ 510,00	R\$ 1.020,00
Corante Cristal Violeta	1 frasco	R\$ 58,00	R\$ 58.00
Ponteiras 200µL (pacote 1000 unidades)	10 pacotes	R\$ 12,00	R\$ 120.00
Ponteiras 1000µL (pacote com 1000 unidades)	10 pacotes	R\$ 16,00	R\$ 160,00
Tubos de polipropileno 15 mL	3 pacotes	R\$ 52,00	R\$ 156.00
Tubos polipropileno 50 mL	2 pacotes	R\$ 62,00	R\$ 124.00
Tubo de microcentrífuga (pacote 1000 unidades)	3 pacotes	R\$ 33,00	R\$ 99.00
Luvas de Látex	12 caixas	R\$ 35,00	R\$ 420.00
Alcool 70% (L)	22 L	R\$ 9.50	R\$ 209.00
Sais e tampões	-	R\$ 1.000,00	R\$ 1.000,00
Tubos de congelamento (criotubo) (pacote com 50 unidades)	2 pacotes	R\$ 60,00	R\$ 120,00

Plásticos gerais	-	R\$ 300,00	R\$ 300,00
Tubo para coleta de sangue 4ml - Roxo - K3EDTA	1 pacote (100 unidades)	R\$ 70,00	R\$ 70,00
Plasmídeo SARS-CoV2 S	1	R\$ 413,05	R\$ 413,05
TWEEN ® 20	1 frasco	R\$ 151,00	R\$ 151,00
3, 3',5 ,5'-Tetramethylbenzidine	1 frasco	R\$ 341,00	R\$ 341,00
Gentamicin solution	1 frasco	R\$ 359,00	R\$ 359,00
Poli-L-lisina	1 (5mg)	R\$ 291,00	R\$ 291,00
HRP Conjugation Kit - Lightning-Link®	1	R\$ 758,10	R\$ 758,10
Rhodamine 123	1	R\$ 934,00	R\$ 934,00
Total			R\$ 22.979,35

Referências bibliográficas.

1. Liu YC, Kuo RL, Shih SR. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. Biomed J [Internet]. 2020;43(4):328–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.007>
2. W.H. O. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) [Internet]. [cited 2021 Mar 11]. Available from: https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1
3. W.H. O. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [Internet]. 2019 Jan 30. [cited 2021 Mar 11]. Available from: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1
4. world health organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. [cited 2021 Mar 11]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, Khan M, Kerwan A, Al-Jabir A, et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) [Internet]. Vol. 76, International Journal of Surgery. 2020. p. 71–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743919120301977>

6. Carvalho T, Krammer F, Iwasaki A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021;(February). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33723416>
7. Ramanathan K, Antognini D, Combes A, Paden M, Zakhary B, Ogino M, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(January):497–506.
8. Quan C, Li C, Ma H, Li Y. Immunopathogenesis of Coronavirus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Potential Infection-. *Clin Microbiol Rev*. 2021;(October 2020):1–27.
9. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* [Internet]. 2020 May;181(5):1036–1045.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286742030489X>
10. Lei X, Dong X, Ma R, Wang W, Xiao X, Tian Z, et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2020;11(1):1–12.
11. Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JY-C, Wang H, et al. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Oct;33(1):108234. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720312237>
12. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* (80-). 2020;370(6515).
13. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(6):355–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
14. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* [Internet]. 2020;26(10):1636–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
15. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463–9.
16. Sariol A, Perlman S. Lessons for COVID-19 Immunity from Other Coronavirus Infections. *Immunity* [Internet]. 2020 Aug;53(2):248–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761320303125>
17. Reid K, de Waal M, de Waal MJ. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-

- CoV: a comparative overview. *Le Infez Med.* 2020;(2002):1–26.
18. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol.* 2016;176(1):100–106.
 19. Wilfredo F. Garcia-Beltran^{1, 2, 3}, Evan C. Lam^{1, 4}, Kerri St. Denis^{1, 4}, ADN, H. Z, Garcia⁴, Hauser⁴ BM, Feldman⁴ J, Pavlovic⁵ MN, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell* [Internet]. 2021;135907. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135907>
 20. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020;5(4):562–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
 21. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol.* 2020;41(6):545.
 22. Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, Ding Y, Ni W, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *medRxiv.* 2020;(March):1–7.
 23. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem.* 2020;295(37):12910–34.
 24. Amanna IJ, Messaoudi I, Slifka MK. Protective immunity following vaccination: How is it defined? *Hum Vaccin.* 2008;4(4):316–9.
 25. Zhao J, Yuan Q, Wang H et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa344. doi:10.1093/cid/ciaa344. *Clin Infect Dis.* 2020;(2020):1–22.
 26. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, et al. Contributions of the structural proteins of severe respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9804–9.
 27. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med.* 2021;384(6):533–40.
 28. Ju B, Zhang Q, Ge J, Wang R, Sun J, Ge X, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* [Internet]. 2020;584(7819):115–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2380-z>
 29. Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science* (80-). 2020;369(August):1014–8.

30. Wang X, Guo X, Xin Q, Pan Y, Hu Y, Li J, et al. Neutralizing antibody responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in coronavirus disease 2019 inpatients and convalescent patients. *Clin Infect Dis.* 2020;
31. Wang K, Long Q-X, Deng H-J, Hu J, Gao Q-Z, Zhang G-J, et al. Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection. *Clin Infect Dis.* 2020;
32. Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: Antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology.* 2018.
33. VanBlargan LA, Goo L, Pierson TC. Deconstructing the Antiviral Neutralizing-Antibody Response: Implications for Vaccine Development and Immunity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(4):989–1010.
34. Sanders DA. No false start for novel pseudotyped vectors. *Current Opinion in Biotechnology.* 2002.
35. Zhang L, Li Q, Liu Q, Huang W, Nie J, Wang Y. A bioluminescent imaging mouse model for Marburg virus based on a pseudovirus system. *Hum Vaccines Immunother.* 2017;
36. Li Q, Liu Q, Huang W, Li X, Wang Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Reviews in Medical Virology.* 2018.
37. Huang W, Wang Y. Application in the evaluation of fake virus technology in the prevention and control of new sudden viral infectious diseases. *Open Access Online-First Publ Res Pap COVID-19.* 2020;
38. King B, Daly J. Pseudotypes: Your flexible friends. In: *Future Microbiology.* 2014.
39. Bentley EM, Mather ST, Temperton NJ. The use of pseudotypes to study viruses, virus sero-epidemiology and vaccination. In: *Vaccine.* 2015.
40. Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, Hao H, Liu H, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):680–6.
41. Hu J, Gao Q, He C, Huang A, Tang N, Wang K. Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Genes Dis.* 2020;
42. Tseng SH, Lam B, Kung YJ, Lin J, Liu L, Tsai YC, et al. A novel pseudovirus-based mouse model of SARS-CoV-2 infection to test COVID-19 interventions. *J Biomed Sci.* 2021;
43. Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Hoffmann HH, Michailidis E, Lorenzi JCC, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J Exp Med.* 2020;

44. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, Chromikova V. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. 2020;2.
45. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Chen MIC, Tiu C, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2020;38(9):1073–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
46. Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Hoffmann HH, Michailidis E, Lorenzi JCC, et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *bioRxiv*. 2020;217(11).
47. Zhang S, Tan C, Ooi E. Visualizing dengue virus through Alexa Fluor labeling. *J Vis Exp*. 2011;(53):8–11.
48. Bajtay Z, Speth C, Erdei A, Dierich MP. Cutting Edge: Productive HIV-1 Infection of Dendritic Cells via Complement Receptor Type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol*. 2004;173(8):4775–8.
49. Bhattacharya P, Ellegård R, Khalid M, Svanberg C, Govender M, Keita Å V., et al. Complement opsonization of HIV affects primary infection of human colorectal mucosa and subsequent activation of T cells. *Elife*. 2020;9:1–29.

Análise de intervenções na dieta e suplementação com probiótico, em diferentes fases do desenvolvimento, através da avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos

RESUMO

Nas últimas décadas houve um aumento expressivo de estudos que demonstram o impacto nutricional sobre a saúde dos indivíduos. Contudo, ainda existem lacunas acerca dos mecanismos relacionados às alterações metabólicas da prole em decorrência do consumo alimentar inadequado das mães e de sua própria dieta ao longo da vida. Sabemos que o consumo hipercalórico prolongado ocasiona a secreção crônica de moléculas pró-inflamatórias que podem desencadear morte celular em diferentes tecidos, incluindo o sistema nervoso central. Por outro lado, a administração de dietas com redução de ingestão calórica, mostra-se eficiente na prevenção de diversas doenças neurológicas, promovendo a diminuição no estresse oxidativo e na neuroinflamação, resultando em neuroproteção. A utilização de probióticos como potencial alvo terapêutico para as doenças metabólicas também vem sendo estudada. A suplementação com probióticos apresenta ação na redução da produção de mediadores inflamatórios, atuando em vias de sinalização celular, sendo capazes de alterar o padrão de expressão de determinados genes. A hipótese central deste estudo é a restrição calórica e a suplementação com probióticos sendo capaz de proteger o aparecimento de alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas causadas pela alimentação rica em gordura ao longo da vida. Desta forma, nosso projeto tem como objetivo avaliar os efeitos de intervenções na dieta (restrição calórica, dieta hiperlipídica e suplementação com probióticos) por meio da análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos na vida adulta de camundongos machos. Para testar essa hipótese, este projeto propõe a utilização de camundongos machos (N=50) da linhagem C57BL/6J, mantidos no biotério da UFCSPA, que com 21 dias de idade serão divididos em 5 grupos (n=10/grupo): dieta controle (CONT, dieta padrão ofertada *ad libitum* com cerca de 3,2 Kcal/g), dieta controle + probiótico (PROB), dieta restritiva (RD, redução de 30% da dieta padrão), dieta hiperlipídica (HFD, dieta ofertada *ad libitum* com cerca de 5 Kcal/g) e dieta hiperlipídica + probiótico (HFD+PROB) com livre acesso à água. Iremos utilizar uma nova preparação candidata probiótica composta por *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 que contém contagens viáveis de $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, e será administrada 3 vezes na semana por gavagem. Aos 5 meses de idade serão analisados os comportamentos de tolerância ao atraso da recompensa e do tipo ansioso. Os registros serão analisados com auxílio do software ANY-Maze. No material biológico coletado será determinado os níveis das citocinas inflamatórias no soro, permeabilidade da barreira hematoencefálica, o estado de ativação microglial e astrocitária, expressão gênica de marcadores inflamatórios e neuroplasticidade no hipocampo e córtex cerebral. Os dados analisados serão expressos por média $\pm$ erro padrão, e analisados quanto à normalidade. Os dados paramétricos serão analisados por ANOVA de um ou duas vias (de acordo com o objetivo) seguida de Post-Hoc e, os não-paramétricos serão analisados por Kruskal-Wallis. O nível de significância aceito será de $p < 0,05$.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica, restrição calórica, probióticos, neuroinflamação.

DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

Responsável: Profa Dra Márcia Giovenardi, Professora Associada 4 da UFCSPA, Orientadora nos PPGs Biociências e Ciências da Saúde, Bolsista Produtividade - PQ2

Colaboradores:

- Profa Dra Amanda de Souza da Motta, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, orientadora no PPG Microbiologia Agrícola e do Ambiente da UFRGS.
- Profa Dra Renata Padilha Guedes. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, PPG Ciências da Saúde, PPG Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFSCPA.
- Dra Patricia Molz. Bolsista de Pós-Doutorado do PPG Biociências.
- MS Natália Perin Schmidt, nutricionista e doutoranda no PPG Biociências.

CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

Estudos experimentais e clínicos têm destacado a importância da nutrição materna durante as fases iniciais do desenvolvimento do feto e do neonato [1]. Estudos epidemiológicos têm demonstrado evidências entre a dieta da gestante e as condições de vitalidade do recém-nascido, as alterações do ambiente intrauterino, os padrões de crescimento com desfechos metabólicos na vida adulta [2]. Na gestação, sabe-se que o ganho de peso insuficiente da mãe está relacionado a um maior risco de retardo de crescimento embrionário e mortalidade perinatal. Já, o ganho de peso excessivo pode estar associado a diabetes gestacional, dificuldades no parto e riscos para o feto [3]. Essas mudanças induzidas por fatores externos e que são mantidas durante a vida, leva a alterações permanentes no fenótipo e ocorre por processos epigenéticos [4].

A alimentação hipercalórica durante a gestação e lactação pode predispor o feto ao desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas, fato que pode ser parcialmente explicado pela hipótese da programação fetal, a qual define que um processo adaptativo a um ambiente adverso intrauterino resulta na redefinição dos processos de desenvolvimento, garantindo a sobrevivência fetal [5]. Tal adaptação provoca alterações morfológicas, fisiológicas, metabólicas e epigenéticas, levando o desenvolvimento de diversas doenças na vida adulta [6]. Ademais, o consumo de uma dieta hipercalórica ao longo da vida e por período prolongado, também resulta no aparecimento de doenças metabólicas crônicas, doenças inflamatórias crônicas, neurodegeneração, entre outros [7].

A restrição calórica tem sido amplamente estudada para avaliar-se a longevidade e tem sido demonstrado que esta, quando moderada, pode retardar o aparecimento de doenças crônicas, como arteriosclerose e diabetes, bem como reduzir a incidência de doenças relacionadas a idade avançada [8;9;10]. Dietas de restrição tem demonstrado ser protetiva, fornecendo ativação de vias anti-inflamatórias e antioxidantes [11]. Apesar dos resultados serem favoráveis, ainda não estão completamente elucidados os mecanismos de ação por meio dos quais a restrição calórica exerce seus efeitos [12;13;14;15].

A dieta de restrição calórica pode ser realizada por meio do controle de alimento fornecido ou pela alteração dos componentes presentes na dieta a fim de reduzir as calorias [16]. A redução na ingestão de calorias provoca respostas protetoras das células em quase todos os tecidos e órgãos, incluindo o SNC. A administração de dietas de restrição, com redução de 20 a 40% da ingestão de calorias, mostrou-se eficiente na prevenção de diversas doenças neurológicas. Esta neuroproteção prolonga a saúde e a vida, prevenindo distúrbios relacionados à idade em seres humanos [17]. A restrição calórica também fornece proteção contra diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vasculares cerebrais,

declínio imunológico, malignidade, hepatotoxicidade, fibrose hepática, inflamação e danos ao DNA [18].

Ademais, a restrição calórica mostrou reduzir a expressão de vários genes ligados à inflamação [19], além de promover a melhora da plasticidade hipocampal, associada ao comprometimento cognitivo acompanhado de obesidade e diabetes [20]. A restrição calórica crônica provoca efeitos metabólicos benéficos na ocorrência espontânea de tumores em ratos, e ao mesmo tempo, restaura a fertilidade nestes animais. Também protege de outras doenças relacionadas à idade, como a insuficiência renal crônica. Foram identificados vários mecanismos que demonstraram como a restrição calórica desempenha estes papéis, como a atenuação do dano oxidativo, a diminuição dos níveis de insulina e glicose, e a ativação da família de sirtuínas [21]. Com esta intervenção, as células do SNC detectam a menor disponibilidade de nutrientes e traduzem essas informações em respostas adaptativas protetoras, havendo uma conexão entre o metabolismo celular e a remodelação da cromatina, afetando a expressão gênica neuronal [17].

Outro aspecto a ser destacado é a utilização de probióticos como potencial alvo terapêutico para as doenças metabólicas. A suplementação com probióticos vem sendo amplamente investigada com potencial ação na redução da produção de mediadores inflamatórios, atuando em vias de sinalização celular sendo capazes de alterar o padrão de expressão de determinados genes [22]. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos ao organismo tais como: redução do peso, melhora nos níveis de glicose, triglicerídeos, insulina e aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias [23;24].

Indivíduos obesos, apresentam alterações metabólicas e modificações na microbiota intestinal, e a utilização de probióticos surge como estratégia coadjuvante no manejo e tratamento dessa condição clínica [25].

Animais com obesidade induzida por dieta high fat e, posteriormente, tratado com probióticos *L. curvatus* HY7601 e *L. plantarum* KY1032 apresentaram redução no ganho de peso corporal e na expressão de genes relacionados à inflamação tanto no fígado quanto no tecido adiposo [26]. Estudo prévio de STENMAN e colaboradores [27], demonstrou que a suplementação de *Bifidobacterium lactis* 420 109 UFC por 6 semanas reduz a glicemia plasmática de animais obesos. Assim como, em modelo de síndrome metabólica induzida por dieta *high fat* foi constatado a melhora da sensibilidade à insulina no grupo suplementado com 5×10^8 UFC de *Bifidobacterium adolescentis* por 12 semanas [28].

Embora nosso estudo se trate de um projeto de pesquisa de caráter básico, a elucidação das questões aqui apresentadas poderá ser de grande relevância para a busca de novos tratamentos e estratégias para o tratamento do sobre peso e/ou obesidade e suas consequências.

OBJETIVOS

Objetivo geral

A hipótese central deste estudo é a restrição calórica e a suplementação com probióticos sendo capaz de proteger o aparecimento de alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas causadas pela alimentação rica em gordura ao longo da vida. Desta forma, nosso projeto tem como objetivo avaliar os efeitos de intervenções na dieta (restrição calórica, dieta hiperlídica e suplementação com probióticos) por meio da análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos na vida adulta de camundongos machos.

Objetivos específicos

- Mensurar o perfil bioquímico no soro;
- Determinar os níveis das citocinas inflamatórias no soro;
- Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica;
- Avaliar o estado de ativação microglial e astrocitária no córtex cerebral e hipocampo;
- Analisar a expressão de marcadores inflamatórios no hipocampo e no córtex cerebral;
- Avaliar a neuroplasticidade no hipocampo e córtex cerebral;
- Analisar os comportamentos no teste de tolerância ao atraso da recompensa e teste da transição claro-escuro.

METODOLOGIA PROPOSTA

Animais

Serão utilizados camundongos machos (N=50) da linhagem C57BL/6J (detalhamento de peso e idade abaixo), mantidos em caixas de acrílico no biotério da UFCSPA. A sala onde os animais permanecerão possui controle de temperatura ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (as luzes permanecerão acesas das 7h às 19h).

Todos os procedimentos realizados neste projeto obedecerão às normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS; GOLDIM & RAYMUNDO, 1997), Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health e a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008). Este projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais com parecer número 722/21 de 13 de janeiro de 2021.

Delineamento experimental

Para testar nossa hipótese, camundongos machos (N=50) da linhagem C57BL/6J, mantidos no biotério da UFCSPA, que com 21 dias de idade serão divididos em 5 grupos (n=10/grupo): dieta controle (CONT, dieta padrão ofertada ad libitum com cerca de 3,2 Kcal/g), dieta controle + probiótico (PROB), dieta restritiva (RD, redução de 30% da dieta padrão), dieta hiperlipídica (HFD, dieta ofertada ad libitum com cerca de 5 Kcal/g) e dieta hiperlipídica + probiótico (HFD+PROB) com livre acesso à água.

Iremos utilizar uma nova preparação candidata probiótica composta por *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 que contém contagens viáveis de $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, e será administrada 3 vezes na semana por gavagem. A dieta hiperlipídica utilizada será adquirida na empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências©. O controle do consumo da ração de cada animal será feito pela pesagem diária da ração que se encontra na grade da caixa moradia do grupo CONT.

Avaliação da prole na vida adulta

Os animais dos 5 grupos experimentais (n=10/grupo) serão pesados aos 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 71 e 78 dias de idade. Aos 5 meses de idade os animais passarão pelo teste de tolerância ao atraso da recompensa e cerca de 10 dias depois passarão pelo teste de transição ao claro-escuro. No dia seguinte do segundo ocorrerá a eutanásia e a coleta do material biológico (item coleta material biológico) para posteriores análises.

Coleta de material biológico

Os animais serão eutanasiadas com sobredose (3x a dose normal) de cetamina (90 mg/kg, DOPALEN, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, ANASEDAN, Ceva, São Paulo, Brasil) via intraperitoneal. Para coleta das estruturas de interesse do SNC (córtex cerebral e hipocampo) os animais serão decapitados em sala silenciosa, no ciclo claro e o sangue troncular será coletado em tubo. Após, o sangue será centrifugado a 12.100 G, a 4 °C, por 10 min, e o soro armazenado em microtubos e mantido a –80 °C para posterior análise. Simultaneamente, o encéfalo e do tecido adiposo serão retirados e, imediatamente o material será processado de acordo com cada técnica a ser utilizada (nitrogênio líquido, RNA later, meio de crioproteção, entre outros) para posterior armazenamento.

Análises por ELISA

Com a utilização de kits comerciais ELISA serão determinados os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 no soro, respeitando as recomendações do fabricante.

Western-Blot

Pretende-se utilizar Western-Blot para avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica por meio da expressão das proteínas zonula ocludens-1 e claudina, presentes nas junções oclusivas dos capilares encefálicos no hipocampo e córtex cerebral.

Após quantificação de proteínas, as amostras serão separadas por SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas serão incubadas com leite em pó 8% em tampão tris salino contendo 0,1% de tween 20 (TTBS) por 90 min. As membranas serão incubadas overnight com os anticorpos primários. Em seguida, as membranas serão incubadas com anticorpos secundários por 2 horas em temperatura ambiente. Para revelação, será realizada reação de quimiluminescência, com exposição das membranas ao filme radiográfico. Os resultados de cada membrana serão relativizados aos valores encontrados com a incubação das mesmas com anti- β -actina.

Imuno-histoquímica

Por meio de imuno-histoquímica, será avaliado o estado de ativação microglial e astrocitária no hipocampo e córtex cerebral. Para isso, os tecidos serão fixados em tampão de zinco por 48 horas. Após, serão incluídos em parafina e cortados a 5 μ m de espessura. Para o procedimento, inicialmente será realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena e de sítios inespecíficos de ligação. Em sequência, os cortes serão lavados em PBS-T (tampão fosfato salino com 0,02% de triton x-100), sendo, logo após, incubados com os anticorpos primários e secundários. O complexo de reação será revelado por meio de solução de 3-3'diaminobenzidina 0,06% em PBS e solução de H₂O₂ 10%. Os cortes permanecerão neste meio até o aparecimento do precipitado marrom. Depois da revelação, os cortes serão contra-corados com hematoxilina-eosina e posteriormente cobertos com Entellan (Merck) e lamínulas.

Extração de RNA total e DNA genômico

O RNA total e o DNA genômico das amostras serão extraídos simultaneamente das áreas previamente isoladas (de ambos os hemisférios cerebrais) através do método do

TRIzol®, de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, as amostras serão incubadas com clorofórmio à temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas. Após a centrifugação, a mistura será separada em três fases: uma fase contendo o clorofórmio e fenol, uma interfase, e uma fase aquosa. Essa última é removida para o isolamento do RNA. A quantificação será feita por espectrometria a 260nm e 280nm.

RT-PCR

Imediatamente após a extração do RNA total, será feita a síntese de cDNA (DNA complementar) através de reações de transcrição reversa. O RNA será incubado com oligo(dT), dNTPs e água DEPC (pirocarbonato de dietila) por 5 minutos a 65°C, seguido de 1 minuto em gelo. Em seguida, serão adicionados o tampão, DTT (ditiotretol) e RNaseOUT, por 2 minutos a 37°C. Por fim, a enzima M-MLV-RT será adicionada para síntese do cDNA, por 1 hora a 50°C. A reação de síntese será inativada por incubação a 70°C por 15 min.

Análise da expressão gênica por qPCR

Analisar por qPCR, no hipocampo e córtex cerebral, a expressão gênica da sirtuina-1, do *toll-like receptor-4*, do complexo inflamassoma, do BDNF. A análise será realizada em nível transcricional, ou seja, será avaliado o conteúdo de mRNA (RNA mensageiro), empregando primers específicos para a amplificação dos cDNAs dos genes que serão estudados. Como controle interno da expressão gênica, será analisada a expressão dos genes da β -actina e da ciclofilina-A (genes de referência selecionados por experimentos anteriores). Os produtos de amplificação serão analisados com o método SYBR™ Green, por PCR em tempo real (StepOnePlus Real-Time PCR System, Life Technologies), e a análise de quantificação relativa será realizada conforme os resultados dos testes de eficiência de amplificação dos genes, através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Teste Comportamentais

Teste de tolerância ao atraso da recompensa

O comportamento impulsivo dos machos será avaliado através do teste de tolerância ao atraso da recompensa, em um protocolo adaptado de Bizot e colaboradores [29]. O protocolo é dividido em quatro diferentes fases: habituação, pré-treinamento, treinamento e testes.

Nestes protocolo, a incapacidade de esperar pela grande recompensa será considerada uma medida de comportamentos associados à escolha impulsiva.

Teste da Transição Claro-Escuro

O aparato é constituído de uma caixa feita de acrílico, dimensões de 205 x 275 x 455 mm, dividida em dois compartimentos, um de cor branca (200 x 265 x 260 mm) e outro de cor preta (200 x 265 x 175 mm), estando a parte branca iluminada com 400 lux. O animal será colocado no compartimento claro, com a cabeça voltada para a entrada 17 que dá acesso ao compartimento escuro. Os registros serão efetuados durante 5 min após a primeira entrada no lado escuro da caixa. Os parâmetros que serão analisados são: latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa, tempo total de permanência em cada um dos compartimentos (claro e escuro), número total de transições entre os dois compartimentos [30]. O paradigma claro-escuro é baseado em uma situação de conflito, sem que haja a presença de um estímulo punitivo. O conflito se dá entre a tendência natural dos animais a explorar e a tendência inicial de se esquivar do que não é familiar (neofobia). O comportamento aversivo dos animais é produzido neste modelo pelos estímulos estressores moderados “ambiente novo” e “iluminação”.

Todos os comportamentos serão analisados pelo software ANY-Maze (versão 4.3, Stoelting Co., Wood Dale, IL).

Análise estatística

Os dados analisados serão expressos por média $\pm$ erro padrão, e analisados quanto à normalidade. Os dados paramétricos serão analisados por ANOVA de um ou duas vias (de acordo com o objetivo) seguida de Post-Hoc e, os não-paramétricos serão analisados por Kruskal-Wallis. O nível de significância aceito será de $p < 0,05$.

ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PROJETO

Etapas de execução	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	4º trimestre
Atividade 1 – Realização dos comportamentos Meta: determinar o desempenho comportamental	X			
Atividade 2 – Coleta e processamento do material biológico Meta: coletar estruturas de interesse do SNC e o sangue troncular	X			
Atividade 3 – Dosagem bioquímica e hormonal Meta: determinar os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, glicose e insulina	X			
Atividade 4 – Dosagem de citocinas Meta: determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10		X		
Atividade 5 – Avaliação da ativação glial Meta: avaliar o estado de ativação microglial e astrocitária nas regiões do SNC que serão estudadas por meio de imuno-histoquímica para Iba-1 e GFAP, respectivamente		X		
Atividade 6 – Análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica Meta: avaliar a expressão das proteínas <i>zonula occludens-1</i> e <i>claudina</i> presentes nas junções oclusivas dos capilares encefálicos		X		
Atividade 7 – Análise da expressão gênica Meta: avaliar a expressão gênica da <i>sirtuina-1</i> , <i>tol-like receptor-4</i> e <i>NLRP3</i> nas regiões do SNC que serão estudadas			X	
Atividade 8 – Análise de dados Meta: analisar e discutir os resultados obtidos	X	X	X	X
Atividade 9 – Redação de artigos científicos Meta: participação de discussões e elaboração de artigos para publicação em periódicos científicos		X	X	X

PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DA EXECUÇÃO DO PROJETO

Este estudo contribuirá para o avanço do conhecimento nesta área, na formação de recursos humanos, na consolidação do grupo de pesquisa e na obtenção e divulgação de resultados em eventos científicos e publicações.

Além disso, faremos um vídeo para ser divulgado nas mídias sociais transcrevendo os principais resultados encontrados na pesquisa, com linguagem que permita o entendimento pelo público não especializado.

Quanto aos indicadores, este projeto irá envolver:

- formação de alunos de iniciação científica, mestrado e/ou doutorado;
- participação em 1 evento científico internacional e 1 nacional;
- publicação de 2 artigos científicos em revistas com Qualis igual ou superior a B1.

POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO E/OU DIFUSÃO

Nas últimas décadas houve um aumento expressivo no número de estudos que demonstram o impacto nutricional na saúde dos indivíduos, focando nas alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas causadas pelo sobrepeso e/ou obesidade. Contudo, ainda são escassos tratamentos ou intervenções que protegem ou retardem essas alterações.

Nosso projeto é inovador pois testa *in vivo* um novo candidato a probiótico, oriundo de leite de búfala, o qual já foi validado *in vitro* [31]. O leite de búfala é um produto extremamente nutritivo que contém níveis mais elevados de gordura, proteínas, minerais e sólidos totais quando comparado ao leite de vaca.

Acreditamos na potencialidade dos resultados deste projeto, uma vez que esse probiótico poderá ser utilizado como potencial alvo terapêutico para as doenças que se manifestam neste cenário descrito anteriormente. Além disso, continuamos estudando os efeitos da restrição calórica neste cenário.

Ademais, o assunto do nosso estudo está alinhado com a Agenda 2030 da ONU, a qual visa estimular ações em áreas cruciais que impactam o desenvolvimento da humanidade e do planeta. Esta agenda possui 17 objetivos centrais, onde o terceiro objetivo visa assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar físico e mental para todas e todos, em todas as idades, reduzindo em um terço a mortalidade prematura por doenças não transmissíveis.

REFERÊNCIAS

1. Hytten FE, Leitch I. The physiology of human pregnancy. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1971.
2. Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/satiety. *Ann Nutr Metab.* 2014;64 Suppl 1:36-44.
3. Picciano MF. Embarazo y lactancia. In: Ziegler, E.E.; Filer, J.L. Conocimientos actuales sobre nutrición. 7a ed. 1997. Washington: ILSI/OPAS/OMS; p. 410-22.
4. Lillycrop KA. Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease. *Proc Nutr Soc.* 2011;70(1):64-72.
5. Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition.* 1997;13:807-13.
6. Tamashiro KL, Moram TH. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav.* 2010;100(5):560-6.

7. Van Den Berg SM, et al. Diet-induced Obesity in Mice Diminishes Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in the Bone Marrow. *Faseb J.* 20016;30(5):1779-88.
8. Patel NV, et al. Caloric restriction attenuates Ab-deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiol Aging.* 2005;26(7):995-1000.
9. Wang Z, Masternak MM, Al-Regaiey KA, Bartke A. Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology.* 2007;148(6):2845-53.
10. Genaro PS, Sarkis KS, Martini LA. O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arq. bras. endocrinol. metab.* 2009;53(5): 667-672.
11. López-Lluch G, Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J. physiol.* 2016;594(8): 2043-2060.
12. Fontana L. The scientific basis of caloric restriction leading to longer life. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25(2):144-50
13. Longo VD, Finch CE. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science.* 2003;299:1342–1346.
14. Roth LW, Polotsky AJ. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. *Maturitas.* 2012;71(4):315-319.
15. Pallavi R, Giorgio M, Pelicci PG. Insights into the beneficial effect of caloric/ dietary restriction for a healthy and prolonged life. *Front Physiol.* 2012;3:318.
16. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* 2011;32(3):159-221.
17. Pani G. Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015;40:106-14.
18. Spindler SR. Caloric restriction: From soup to nuts. *Ageing Res. Rev.* 2010;9:324-53.
19. Fernandes G. Progress in nutritional immunology. *Immunol Res.* 2008;40:244-61.
20. Stranahan AM, Mattson MP. Bidirectional metabolic regulation of neurocognitive function. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;96(4):507-16.
21. Nogueiras R, et al. Sirtuin 1 And Sirtuin 3: Physiological Modulators Of Metabolism. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1479-514.
22. Latvala S, Miettinen M, Kekkonen RA, Korpela R, Julkunen I. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression. directly and indirectly via interleukin-10 in human primary macrophages. *Clin exp immunol.* 2011;165: 94–103.
23. Oliveira JMS, Santos GM, Saldanha NMVP, Sousa PVL, Carvalho ACS. Efeitos de probióticos no tratamento da obesidade. *C&D.* 2017;10(2):154-165.

24. Cotillard A, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013;500.
25. Petschow B, et al. Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 2013;1306:1-17.
26. Park DY, et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *Plos One*. 2013;8:3.
27. Stenman LK, et al. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Benef. Microbes*. 2014;5(4):437-445.
28. Chen J, Wang R, Li XF, Wang RL. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 2012;107:1429–1434.
29. Bizot JC, et al. Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacology*. 2007;193(2):215–23.
30. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Be.* 1989;32(3):777- 785.
31. Breyer, G.M., Arechavaleta, N.N., Siqueira, F.M. et al. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2021;13:468–483.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

PROJETO DE PESQUISA

**Análise da expressão da enzima CD73 e marcadores de EMT em
agregados celulares tumorais tridimensionais**

Coordenação: Profa. Dra. Marcia R. Wink

Abril de 2020

Identificação da proposta

Título: Análise da expressão da enzima CD73 e marcadores de EMT em agregados celulares tumorais tridimensionais.

Pesquisadores e Instituições participantes

Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Coordenação: Prof. Dra. Márcia Rosângela Wink

Profa. Dra. Marilda da Cruz Fernandes

Dra. Isabele C. Iser Marson – Laboratório de Biologia Celular

Dr. Andrew Oliveira Silva

Giselle de Souza Moraes (aluna de Doutorado)

Co-partícipe:

Professor Guido Lenz – Laboratório de Sinalização Celular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Resumo

Dentre os mecanismos estudados nas últimas décadas, a sinalização purinérgica, tanto na fisiologia normal como em alterações patológicas, tem sido amplamente analisada, através de múltiplos estudos *in vitro* e *in vivo*. No âmbito das enzimas degradadoras dos nucleotídeos, foi constatada a relação ecto-5'-nucleotidase (CD73) no crescimento e progressão tumoral. Alta expressão dessa enzima, que hidrolisa o AMP, resulta no aumento das concentrações de adenosina no microambiente tumoral, o que rende as células malignas mais resistência aos mecanismos de defesa do sistema imune, podendo potencialmente aumentar o crescimento do tumoral. Isso se deve em grande parte devido ao papel imunossupressor da CD73, a qual participa do mecanismo de escape do tumor à resposta imune. Desta forma esse projeto se propõe a investigar o papel da enzima CD73 em mecanismos importantes na tumorigênese, como a transição epitélio-mesenquimal (EMT), utilizando-se como modelo, células de câncer cervical crescidas na forma de agregados celulares tumorais tridimensionais (esferoides).

Introdução

Câncer cervical

O câncer cervical é o quarto câncer mais prevalente em mulheres no mundo todo, representando mais de 300.000 mortes ao ano. As alterações celulares que podem desencadear o câncer são descobertas facilmente no exame preventivo do colo do útero (exame de Papanicolaou), por esta razão, a realização desse exame, bem como os programas de vacinação contra o HPV são as principais estratégias de prevenção da doença. As primeiras vacinas para o HPV tornaram-se disponíveis em 2006 e têm demonstrado mais de 90% de eficácia na prevenção dos HPVs tipo 16 e 18 em indivíduos jovens. Entretanto, apesar desses avanços, em países menos desenvolvidos, onde a conscientização e o acesso da população à vacina é mais limitado, o câncer cervical continua sendo o segundo tipo mais comum de câncer (Cohen e cols., 2019).

Já está bem estabelecido na literatura, que o câncer cervical está diretamente relacionado com a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), transmitido sexualmente, mas outros fatores de risco também contribuem para o desenvolvimento desta neoplasia, tais como, fatores genéticos, uso de pílula anticoncepcional de forma prolongada, cigarro, agentes infecciosos, processos inflamatórios, grande número de parceiros sexuais, dentre outros (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2020). Os HPVs são classificados como de baixo ou alto risco oncogênico. Os tipos de HPV com alto risco oncogênico e particularmente associados ao desenvolvimento do câncer cervical incluem: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39 (Sanjosé e cols., 2017), sendo o HPV 16 e o HPV 18 os tipos mais frequentes (World Health Organization, WHO, 2020).

A evolução do câncer cervical é lenta, podendo ocorrer a partir lesões pré-cancerosas intra-epiteliais de diferentes graus, que podem, em um período médio de 15 a 20 anos, evoluir para o câncer cervical invasivo (Cohen e cols., 2019). As alterações nas células do colo do útero estão relacionadas com proteínas oncogênicas do HPV, que se ligam as proteínas do ciclo celular, manipulando o controle do ciclo celular do hospedeiro para promover a sua

persistência e replicação. As principais proteínas são a E6 e a E7. No processo de replicação do genoma viral, essas oncoproteínas podem induzir todos os “hallmarks” do câncer, como proliferação celular descontrolada, angiogênese, invasão e metástase (Pal, 2020).

5’nucleotidase/CD73

O Sistema Purinérgico tem sido amplamente estudado nas últimas décadas, por ser um sistema de sinalização celular envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, como o câncer, por exemplo. Esse sistema envolve nucleotídeos e nucleosídeos, como a adenosina e o ATP, por exemplo, que são liberados no espaço extracelular, podendo ativar diversos receptores purinérgicos ou serem degradados por ecto-enzimas presentes na superfície das células, conhecidas como ectonucleotidases (Zimmermann e cols., 2012).

Entre as ectonucleotidases que compõem o sistema purinérgico, a CD73 tem atraído muito a atenção dos pesquisadores, por ser uma enzima expressa em várias doenças malignas, como leucemias e vários tipos de câncer de origem epitelial (Yang e cols., 2018). Essa enzima pode ser encontrada na maioria dos tecidos humanos (Colgan e cols., 2006) e catalisa a conversão de AMP em adenosina, participando, portanto, de uma cascata enzimática que leva à completa hidrólise do ATP extracelular, gerando inosina (Zimmermann, 2001). Sua expressão e atividade em células tumorais resulta no aumento das concentrações de adenosina no microambiente tumoral e está associada a um mau prognóstico e à formação de metástases. Estudos demonstram que seu papel durante o desenvolvimento do câncer, pode ser exercido de várias formas e indicam que sua ação pode promover imunossupressão e angiogênese através da geração de adenosina extracelular (Di Virgilio, 2017).

Além de sua importante função como enzima, a CD73 é descrita por interagir com moléculas da matriz extracelular, regulando o processo de adesão célula-a-célula e por isso, estando relacionada com invasividade tumoral (Sadej, 2012).

Recentemente, diversos estudos têm demonstrado a importância da enzima CD73 em câncer cervical, ressaltando a importância de se compreender de que forma a CD73 pode ser modulada a fim de prevenir ou bloquear a progressão do carcinoma cervical.

Recentemente, um estudo mostrou a importância da enzima CD73 em câncer cervical. Os autores mostraram que a super-expressão da enzima, promoveu a proliferação e migração de Hela e SiHa, células de linhagem de câncer cervical (Gao e cols., 2017). Outro estudo mostrou que linhagens celulares de câncer cervical HPV+ expressam altos níveis de CD73 quando comparadas com linhagens HPV-, produzindo, assim, grandes quantidades de adenosina na presença de AMP (de Lourdes Mora-García e cols., 2016). Por outro lado, alguns autores tem mostrado que a adenosina pode inibir a migração, invasão e indução de apoptose em células HeLa e SiHa (Gao e cols., 2007)), bem como que o tratamento das células com análogo de adenosina aumenta a necrose em células HeLa e a presença de corpos apoptóticos em células SiHa, além de reduzir a viabilidade das duas linhagens (Sinha e cols., 2007).

Transição epitélio-mesenquimal (EMT)

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um programa celular que inibe o fenótipo epitelial e induz um fenótipo mesenquimal em diferentes tipos celulares, incluindo células tumorais. Esse processo é caracterizado pela perda das características epiteliais das células (como junções intercelulares e polaridade apico-basal) e aquisição de um perfil mesenquimal, marcado pelo aumento da motilidade e invasividade celular, alterações na morfologia das células, reorganização do citoesqueleto e resistência a anoikis (Lamouille e cols., 2014).

CD73 e EMT

A aquisição de um fenótipo invasivo, marcado pela perda das junções celulares e aumento da capacidade migratória das células tumorais, é um pré-requisito para a progressão tumoral e parece estar relacionado com a expressão da enzima CD73 em alguns tipos tumorais.

Já tem sido demonstrado que a enzima CD73 também promove seus efeitos pró-tumorais por regular o processo de EMT em diversos tipos de câncer (Martínez-Ramírez e cols., 2017; Lupia e cols., 2018; Yu e cols., 2017; Ren e cols., 2016). A sinalização celular promovida pela atividade enzimática da CD73 e consequente produção de adenosina pode estimular a liberação de TGF β , o principal indutor de EMT, bem como a expressão de diversos genes associados ao fenótipo mesenquimal (Martínez-Ramírez e cols., 2017).

Diante disso, nos parece promissora a ideia de compreender quais moléculas e fatores estão relacionados com indução de EMT em câncer cervical, para que desta forma, se possam aplicar ferramentas terapêuticas capazes de bloquear esse processo e frear a invasão difusa do tumor através do tecido adjacente, que é a principal causa de recidivas e mortes em pacientes com esse tipo de tumor.

Agregados celulares tridimensionais como modelo de cultura de células tumorais *in vitro*

Os modelos de cultivo celular em monocamada (2D) *in vitro* não são um sistema ideal para explicar mecanismos celulares e tumorais que controlam a EMT, metástase e quimiorresistência. Esses modelos não permitem que as células reproduzam as mesmas características que possuíam *in vivo*, uma vez que se aderem a superfície em que estão inseridas, fazendo com que o desenvolvimento seja bastante diverso do ambiente *in vivo* (Lee e cols., 2008).

Com os limitantes acima citados da cultura em monocamada, a possibilidade da realização de uma cultura celular tridimensional possibilita maiores chances de elucidação das dinâmicas celulares em ambiente *in vitro* de forma mais próxima ao que ocorre *in vivo*.

O modelo de crescimento na forma de agregados tridimensionais (3D), também chamados de esferoides, representa de forma muito fidedigna a heterogeneidade fenotípica tumoral, apresentando células proliferativas, quiescentes e degenerativas, principalmente, devido a diferenças no crescimento, acesso a nutrientes e oxigênio, mimetizando muito bem o crescimento tumoral *in vivo* (Acker e cols., 1984). Além disso, os modelos esferoides em 3D também recriam bem as interações célula-matriz extracelular, através da formação de um complexo agregado celular que não poderia ser alcançado utilizando os modelos 2D de cultivo celular (Ameri, 2019).

Diante disso, há um grande interesse no desenvolvimento de culturas de células que reproduzam de forma mais fiel possível as características encontradas *in vivo*, como ferramentas úteis para o estudo do comportamento de células tumorais (Prestwich, 2008), a fim de elucidar os mecanismos envolvidos no processo de progressão tumoral.

Justificativa

Tendo em vista o impacto do câncer no Sistema único de Saúde (SUS), é necessário que se invista no desenvolvimento de ferramentas que possam elucidar processos de agressividade e evolução tumoral. Neste projeto iremos utilizar um modelo inovador de cultivo celular tridimensional, que melhor mimetiza o microambiente tumoral em comparação com as culturas em monocamada (2D).

Utilizaremos linhagens de câncer cervical, que atualmente permanece como um dos mais prevalentes tipos tumorais existentes. Ainda não são bem compreendidos os mecanismos e vias de sinalização que envolvem as fases de progressão desse tipo tumoral. Acreditamos que ao entendermos as relações entre a EMT com a sinalização purinérgica, controlada principalmente pela enzima CD73, possamos no futuro identificar pacientes com possíveis melhores ou piores prognósticos e modular a intervenção terapêutica.

Assim, tornando as investidas farmacológicas mais precisas e direcionadas ao perfil de cada paciente. Acreditamos também que a medida

que esses mecanismos forem melhor explorados e compreendidos pelos pesquisadores, poderemos ter maiores possibilidades de desenvolvermos novos fármacos e terapias direcionadas a fim de bloquear o processo de EMT e a expressão da enzima CD73.

Objetivos

Objetivo Geral

Considerando que há poucos estudos na literatura, relacionando o papel da enzima CD73 e EMT em câncer cervical, este projeto tem como **objetivo geral**, avaliar o papel da enzima CD73 e da EMT em agregados celulares tridimensionais de câncer cervical humano. Espera-se desta forma contribuir com a compreensão dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento tumoral em carcinoma cervical. Além disso, a expectativa é que este estudo possa trazer novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para pacientes com esta patologia.

Objetivos específicos

- Padronizar o cultivo de células tumorais em agregados tridimensionais;
- Avaliação do potencial de formação e crescimento do agregado tridimensional após o tratamento com adenosina, TGF-beta e com o inibidor da enzima CD73 (APCP);
- Silenciar a CD73 nas células tumorais, através da técnica de Crispr e avaliar as características de crescimento das células em monocamada e no agregado;
- Análise histológica dos agregados originados pelo modelo tridimensional *in vitro* em comparação com as culturas em monocamada, antes e após os tratamentos acima citados;
- Análise por imuno-histoquímica e citometria de fluxo da expressão de marcadores de EMT e CD73, nas diferentes condições de cultivo e tratamentos.

Metodologia

Confecção dos agregados tridimensionais: serão gerados através da técnica “hanging drop” (Kelm e cols., 2003 e Foty, 2011), contendo um número pré-estabelecido de células em cada gota, e mantidos em incubadora pelo tempo adequado, a 37°C e com 5% de CO₂. Concomitante com o cultivo dos agregados celulares, culturas de células em monocamada das linhagens tumorais SiHa e HeLa serão mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂.

Todas as análises serão realizadas nos 5 grupos experimentais (descritos abaixo), tanto nas células em monocamada, quanto nos agregados tridimensionais:

Grupo 1: células cultivadas em meio de cultivo padrão.

Grupo 2: células tratadas por 4 dias com 10ng/mL de TGF-beta.

Grupo 3: células tratadas por 48h com 100uM de adenosina.

Grupo 4: células tratadas por 48h com 100uM de adenosina + 1uM de APCP.

Grupo 5: células silenciadas para a enzima CD73

Citometria de fluxo: serão avaliados por citometria de fluxo os marcadores de EMT : N-caderina, E-caderina, Fibronectina, Vimentina, Snail, Slug, Twist, Zeb1 e Zeb2. Além disso, a expressão da proteína CD73 e do marcador de proliferação celular Ki67 serão avaliados pela mesma técnica.

Análise histológica: o material será fixado em paraformaldeído 4%, processado em aparelho histo-técnico, emblocado em parafina e seccionado no micrótomo, em 4µm. Essas secções serão depositadas em lâminas com carga positiva e, de acordo com o protocolo, realizada a coloração com hematoxilina eosina (HE).

Imuno-histoquímica: Para os experimentos de imuno-histoquímica, as amostras serão fixadas em paraformaldeído 4%, bloqueadas com 1% de solução de albumina e incubadas overnight com os seguintes anticorpos:

CD73, Vimentina, snail1/2, Twist1/2, Zeb1/2, N-caderina, E-caderina, MMP2 e MMP9, CD31 e Ki67. Para a quantificação das marcações, imagens digitalizadas do tumor de cada paciente será obtida usando uma câmera conectada a um microscópio (Olympus BX 50). A intensidade da imuno-reação será medida usando o método semi-quantitativo de análise densitométrica através do software Image Pro Plus (Image Pro-plus 6.1).

Silenciamento por CRISPR: essa etapa do trabalho será realizada em colaboração com o Laboratório do Prof. Dr. Guido Lenz do Centro de Biotecnologia da UFRGS. O plasmídio utilizado para o silenciamento foi doado pelo colaborador canadense, Dr. John Stagg.

RT-qPCR: A mudança no fenótipo epitelial para mesenquimal, bem como a expressão da enzima CD73 serão avaliados por RT-qPCR. O RNA total das células e esferas será extraído com o reagente Trizol e após a síntese de cDNA, a análise da expressão gênica será realizada pela técnica de RT-qPCR, utilizando o reagente SYBRGreen como agente fluorescente. A expressão dos genes de interesse será normalizada pelo gene TBP.

Análise estatística: As médias e os desvios padrões para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados serão calculadas. Comparações de parâmetros entre diferentes grupos experimentais serão realizadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de testes *post-hoc* adequados quando a ANOVA revelar diferenças significativas entre grupos, consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Descarte dos Resíduos

Os resíduos celulares resultantes da cultura celular serão tratados com hipoclorito 1% e depois autoclavados.

Cronograma de Atividades

1º ano (2020)	- Cultivo e padronização dos agregados tridimensionais com células de câncer cervical cervical
2º ano (2021)	- Análise histológica e por IHC dos agregados tridimensionais tratados com adenosina, APCP, TGF-beta e silenciados por crispr;
3º ano (2022)	- Análise por citometria de fluxo e RT-qPCR dos agregados tridimensionais tratados com adenosina, APCP e TGF-beta;
4º ano (2023)	Redação dos artigos científicos

Orçamento

Meio de cultura	R\$ 2.000,00
Fatores para meio de cultura	R\$ 4.000,00
Tripsina	R\$ 500,00
Adenosina, TGF-beta e APCP	R\$ 2000,00
Material para biologia molecular	R\$ 3.000,00
Placas de cultura de células	R\$ 500,00
TOTAL	R\$ 12.000,00

Obs. Vários dos materiais listados já se encontram disponíveis no Laboratório de Biologia Celular e Patologia da UFCSPA, os demais serão adquiridos com verba do CNPq e FAPERGS já aprovados pela Orientadora, Márcia R Wink.

Referências

RAVI, Maddaly et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 230, n. 1, p.16-26, 29 set. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24683>.

LEE, Jungwoo; CUDDIHY, Meghan J.; KOTOV, Nicholas A.. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.61-86, mar. 2008. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/teb.2007.0150>.

2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ar7000827>.

LIN, Ruei-zhen; CHANG, Hwan-you. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 3, n. 9-10, p.1172-1184, out. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.200700228>.

ACKER, Helmut et al. (Ed.). **Spheroids in cancer research: methods and perspectives**. Springer Science & Business Media, 2012.

Gao, Z. W., Wang, H. P., Lin, F., Wang, X., Long, M., Zhang, H. Z., & Dong, K. (2017). CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. **BMC cancer**, **17(1)**, 135. doi:10.1186/s12885-017-3128-5

PRESTWICH, Glenn D.. Evaluating Drug Efficacy and Toxicology in Three Dimensions: Using Synthetic Extracellular Matrices in Drug Discovery. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.139-148, jan.

ZHANG, Bin. CD73 promotes tumor growth and metastasis. **Oncoimmunology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.67-70, jan. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/onci.1.1.18068>.

VIRGILIO, Francesco di et al. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.15-31, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.

MARCHI, Elena de et al. The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. **Oncogene**, [s.l.], 17 jan. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-0684-y>

KELM, Jens M. et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.173-180, 21 maio 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.10655>.

FOTY, Ramsey. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], n. 51, p.1-4, 6 maio 2011. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/2720>.

REN, Zhen-hu et al. CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 38, p.1-4, 20 ago. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.11435>.

REEB, Ashley N; ZIEGLER, Andrea; LIN, Reigh-yi. Characterization of human follicular thyroid cancer cell lines in preclinical mouse models. **Endocrine Connections**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.47-54, mar. 2016. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/ec-15-0114>.

ZIMMERMANN H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal.** 2012;8(3):437–502. doi:10.1007/s11302-012-9309-4

LUPIA, Michela et al. CD73 regulates stemness and epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer-initiating cells. **Stem cell reports**, v. 10, n. 4, p. 1412-1425, 2018.

YU, Jiangang et al. A preliminary study of the role of extracellular-5'-nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, n. 2, p. 132-140, 2017.

REN, Zhen-Hu et al. CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 61690, 2016.

AL AMERI, Wafa et al. Cell Type-Specific TGF- β Mediated EMT in 3D and 2D Models and Its Reversal by TGF- β Receptor Kinase Inhibitor in Ovarian Cancer Cell Lines. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, p. 3568, 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS.

PROJETO DE PESQUISA

**Estudo do Efeito da Melatonina na Doença Hepática causada por Exposição
à Frutose e ao Etanol em Peixe-zebra.**

Aluna: Daniela Capelli Diglio

Orientador: Prof.Dra Marilene Porawski

Colaboradora: Dra Themis Reverbel da Silveira

Porto Alegre

2019

1. Qualificação do problema a ser abordado

A doença hepática gordurosa não alcoólica, relacionada ao aumento do consumo de frutose industrializada (Jegatheesan *et al.*, 2018; Jensen *et al.*, 2018) e a esteatose hepática, relacionada ao abuso do álcool, são causas frequentes de doença hepática crônica (Singal *et al.*, 2018). A doença hepática gordurosa, ou esteatose hepática, caracteriza-se pelo acúmulo de gordura acima de 5% dos hepatócitos (EASL, EASD e EASO, 2015). A esteatose hepática pode evoluir para esteatohepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, com uma prevalência crescente no mundo. A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e doença hepática alcoólica (DHA) estão associadas ao aumento da morbimortalidade, à redução da qualidade de vida e custos econômicos elevados para o sistema de saúde (Yonossi *et al.*, 2018).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal e tem sido identificada na maioria dos organismos vivos, variando de organismos unicelulares eucariontes para invertebrados e espécies de vertebrados (Srinivasan *et al.*, 2013). Está envolvida na regulação de várias funções importantes, como o ritmo circadiano, o metabolismo energético e a homeostase do sistema reprodutivo, cardiovascular e neuropsiquiátrico (Sun *et al.*, 2015). Seu potencial no tratamento da síndrome metabólica tem sido promissor devido ao seu efeito antioxidante e anti-inflamatório (Srinivasan *et al.*, 2013, Akbari *et al.*, 2018). O seu papel na doença hepática causada por frutose e etanol ainda não está bem estabelecido, portanto é relevante o estudo do possível efeito da melatonina no tratamento dessas doenças.

1.1 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica – DHGNA

A doença hepática gordurosa não alcoólica tem sido a causa mais comum de doença hepática crônica no mundo (Masarone *et al.*, 2014), atingindo cerca de 30% da população adulta e 10% da população infantil (Birkenfeld *et al.*, 2014). A sua prevalência vem aumentando na população em geral e está associada principalmente à obesidade, resistência insulínica, síndrome metabólica e diabetes. Estas alterações metabólicas estão relacionadas com mudanças nos hábitos alimentares e com estilo de vida sedentário (Fazel *et al.*, 2016). Outros motivos de DHGNA incluem fatores nutricionais, entre eles o aumento

do consumo de frutose industrializada e dietas hipercalóricas (Ter Horst & Selie, 2017), pré-disposição genética (Sokooian & Pirola, 2017), interações e efeitos secundários de medicamentos (Utzeri *et al.*, 2017), exposição à drogas hepatotóxicas e poluentes ambientais (Klaunig *et al.*, 2018; Arciello *et al.*, 2013; Hammes *et al.*, 2011).

Os mecanismos envolvidos na progressão da DHGNA ainda não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que a patogênese é multifatorial, explicada em parte pela teoria dos “múltiplos estímulos”, que inclui a resistência à insulina, fatores inflamatórios secretados pelo tecido adiposo, ativação de genes relacionados com o aumento de deposição de gordura hepática e distúrbios da microbiota intestinal comensal (Chalasani *et al.*, 2018; Buzzeti *et al.*, 2016).

O consumo excessivo de frutose tem efeitos no metabolismo lipídico e é uma causa importante do desenvolvimento de DHGNA (Ter Horst & Selie, 2017; Softic *et al.*, 2016). Em uma dieta equilibrada, o consumo da frutose, contida naturalmente nos alimentos, não causa efeitos nocivos. Pelo fato da frutose ter um considerável poder adoçante, as indústrias alimentícias a tem utilizado para aumentar a palatabilidade dos alimentos. Dessa forma, a frutose vem sendo adicionada em doces, bebidas e frutas industrializadas (Bray, 2008). Estudos mostraram que o consumo excessivo de alimentos industrializados ricos em frutose ou adoçantes a base de frutose podem causar danos ao fígado, dislipidemia, diminuição da sensibilidade insulínica e demência (Stanhope, 2016; Lakhan & Kirchgessner, 2013). A frutose é metabolizada principalmente no fígado. O aumento da lipogênese é observado imediatamente após uma única carga de frutose e contribui para o aumento da secreção de triglicerídeos VLDL (Hannou *et al.*, 2018). O acúmulo de lipídios nos hepatócitos resulta de uma combinação de uma série de eventos: aumento da lipogênese hepática de novo e esterificação de ácidos graxos pré-formados derivados da dieta ou do tecido adiposo, diminuição da secreção de VLDL e oxidação e ácidos graxos hepáticos, desencadeando a DHGNA. Este processo de síntese produz energia para o corpo, mas também aumento do estresse oxidativo, lipogênese e desencadeamento de processos inflamatórios em células hepáticas, mecanismos estes precursores da DHGNA.

1.2 Doença Hepática Alcoólica – DHA

O consumo excessivo de álcool/etanol é problema mundial de saúde com consequências sociais, econômicas e clínicas (Osna *et al.*, 2017). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o uso do álcool causa aproximadamente 3,3 milhões de mortes todos os anos (EASL, 2018). Entre as causas da morbimortalidade do consumo excessivo de álcool, a doença hepática alcoólica (DHA) apresenta uma grande relevância, no entanto o seu principal tratamento ainda é a abstinência, uma vez que terapias que evitem a progressão da doença hepática alcoólica ainda são incipientes (Heilig *et al.*, 2011). A detecção precoce da doença hepática alcoólica é importante para estimular a abstinência alcoólica, evitando a progressão da doença e suas complicações (Dugum *et al.*, 2015), no entanto, nem todos os pacientes aderem à abstinência.

O primeiro processo de lesão a ser considerado na DHA é a esteatose, caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos, principalmente triglicerídeos. O consumo crônico e abusivo de álcool reduz a relação redox de NAD^+/NADH o que acarreta, entre outros distúrbios, a inibição hepática da oxidação dos ácidos graxos, resultando na esteatose (Cederbaum, 2012). A lesão hepática que se desenvolve induzida pelo etanol é mediada por uma resposta inflamatória que envolve o sistema imunológico inato. Exposição ao etanol, tanto em seres humanos e modelos animais, está associada com um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Nath *et al.*, 2012).

O etanol causa um efeito prejudicial não apenas no fígado, mas também provoca alterações na parede do intestino e na microbiota intestinal. O consumo crônico de bebidas alcoólicas pode aumentar a permeabilidade da membrana intestinal, levando ao aumento de endotoxinas no sangue e no fígado. No tecido hepático, essas toxinas ativam células de Kupffer, macrófagos residentes, levando à produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas ao oxigênio, iniciando, assim, a cascata inflamatória (Kawaratani *et al.*, 2013).

Assim o aumento da inflamação e o acúmulo de lipídios são as principais características da DHA (Louvet *et al.*, 2015). A esteatose desenvolve-se em 90-95% dos homens que consomem doses de etanol superiores a 40 g/dia e mulheres que ingerem 20 g/dia ou mais, contudo pode ocorrer em indivíduos com um consumo menor (O'Shea *et al.*, 2010). O diagnóstico é realizado pela presença de sintomas clínicos e/ ou exames laboratoriais que caracterizem uma função hepática anormal. Além disso, uma biópsia

hepática pode ser usada para avaliar o estágio e auxiliar no prognóstico da doença (EASL, 2018; Singal *et al.*, 2018).

1.3 Similaridades da esteatose hepática na DHGNA e na DHA

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a doença hepática alcoólica (DHA) têm espectros patológicos semelhantes. Ambas podem progredir da esteatose hepática simples à esteato-hepatite, fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Toshikuni *et al.*, 2014). Embora a maioria dos indivíduos com consumo excessivo de álcool ou alimentos ricos em frutose apresente esteatose hepática simples, uma pequena porcentagem de indivíduos desenvolverá doença hepática progressiva. Notavelmente, tanto a DHGNA e DHA são frequentemente acompanhadas por complicações extra-hepáticas, incluindo doença cardiovascular e malignidade (Toshikuni *et al.*, 2014).

O início do processo da lesão hepática, tanto na DHGNA como da DHA, se dá pela presença de esteatose, que é caracterizada por acúmulo de gordura nos hepatócitos, principalmente triglicerídeos, e causada pela inibição hepática da oxidação dos ácidos graxos, está associada ainda com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Jegatheesan & Bandt, 2017; Nath *et al.*, 2011) e aumento do estresse oxidativo (Li *et al.*, 2015). Alguns genes envolvidos nos processos iniciais da esteatose já foram reconhecidos, porém as vias de ativação destes genes não estão todas estabelecidas. Sabe-se que a síntese de ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolídeos no fígado é aumentada tanto durante o consumo de etanol (Donohue, 2007) como de frutose (Jegatheesan & Bandt, 2017). Ambos elementos causam a ativação da SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1), que induz genes envolvidos na lipogênese (Jegatheesan & Bandt, 2017; Donohue, 2007) e alteram as rotas metabólicas dos lipídeos através da inibição de reguladores de transcrição cruciais como a adiponectina e seu receptor hepático (Adipor-2), SIRT-1 (sirtuina), PPAR- α (peroxime proliferator-activated receptor-alpha), PPAR- γ (peroxime proliferator-activated receptor-gamma), AMPK (AMP-activated kinase), o que leva à lipogênese hepática (Jegatheesan & Bandt, 2017; You e Rogers, 2009). O efeito protetor da adiponectina em relação à esteatose hepática ocorre principalmente através da interação com seu receptor, o ADIPOR-2 (receptor 2 de adiponectina), presente no fígado (You e Rogers, 2009).

O etanol e a frutose podem ser responsáveis pela ativação da cascata inflamatória, através da indução de toll-like receptors (TLRs) no fígado. Os TLRs são ativados pelo acúmulo de gordura hepática, que aumenta a vulnerabilidade dos hepatócitos ao estresse celular e possivelmente por LPS (lipopolissacarídeo) oriundos do intestino, contribuindo para o processo inflamatório. A ativação da via TLR4 / óxido nítrico sintase induzível (iNOS) / NFκB induz o estresse oxidativo nos hepatócitos por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), α interleucina 1 b (IL-1b), e outros, que desencadeiam o início de vários mecanismos envolvendo mediadores imunológicos que contribuem para a lesão no fígado (Schneider *et al.*, 2017; Jegatheesan & Bandt, 2017). O consumo abusivo de álcool e a ingestão crônica de frutose também estão associados aos prejuízos na função de barreira no epitélio intestinal, promovendo ruptura das Tight Junctions (TJ), aumento na translocação de endotoxinas e a inflamação.

1.4 Papel do aumento da permeabilidade intestinal na doença hepática

A integridade do epitélio intestinal permite a absorção adequada de nutrientes da dieta, constitui barreira física e funcional das bactérias comensais residentes no intestino, previne a passagem de patógenos e toxinas para a circulação sistêmica (Wahlström, 2019). A integridade do epitélio intestinal é determinada principalmente pelas Tight Junctions (TJ), um complexo de proteínas altamente dinâmico, seletivamente permeável, que se forma dentro de domínios lipídicos da membrana plasmática (Odenwald & Turner, 2013). As TJ são divididas em dois grupos principais: proteínas de único domínio transmembrana, como as JAM (junctional adhesion molecule) e proteínas de quatro domínios transmembranas como as claudinas. Estas últimas constituem a maior parte da complexa arquitetura das Tight Junctions e exercem papel determinante na permeabilidade das células endoteliais e epiteliais (Gunzel & Yu, 2013). As proteínas da zona de oclusão (ZO-1, ZO-2 e ZO-3) também são importantes proteínas TJ intracelulares, e atuam como um componente de ancoragem, ligando as células do citoesqueleto às proteínas TJ transmembrana. Enquanto as ocludinas e as JAM têm um papel regulatório, as claudinas são as principais proteínas responsáveis pela função de barreira intestinal, exercendo papel determinante na permeabilidade das células endoteliais e epiteliais (Gunzel & Yu, 2013).

Tanto o consumo excessivo de álcool quanto o de frutose industrializada podem promover modificações no epitélio intestinal, alterando a sua função de barreira e

provocando aumento da permeabilidade (Elamin *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2004; Volynets *et al.*, 2017). O aumento da permeabilidade intestinal pode levar à translocação bacteriana e ao aumento do vazamento de metabólitos bacterianos (LPS) para o fígado através do sistema êntero-hepático (Wahlström, 2019). As doenças hepáticas têm sido associadas ao comprometimento da integridade da barreira intestinal, no entanto, não está claro se o aumento da permeabilidade intestinal é causa ou consequência da doença hepática, e neste último caso, em que estágio da doença ela ocorre. Uma estratégia para tratar a doença hepática pode visar a restauração da função de barreira intestinal, a fim de evitar a translocação bacteriana para o fígado, diminuindo a inflamação hepática.

1.5 Melatonina

Sintetizada naturalmente na glândula pineal, a melatonina é o principal hormônio regulador do ciclo circadiano nos mamíferos e também no zebrafish (Lima-cabello *et al.*, 2014). O papel da melatonina em distúrbios do ritmo circadiano e do sono está bem estabelecido (Riemann *et al.*, 2017). A melatonina permite a regulação da homeostase energética através do estabelecimento de um equilíbrio adequado entre consumo de energia e gasto energético. Além destas funções, a melatonina é considerada um modulador imunológico com atividade anti-inflamatória. Os mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios são múltiplos, incluindo ação antioxidante, prevenção da ativação do inflamassoma, inibição do NF- κ B, da IL-1 β e outras proteínas pró-inflamatórias (Hardeland *et al.*, 2018).

Dois estudos experimentais com ratos que avaliaram o efeito da melatonina na cirrose mostraram melhora na fibrose, nos parâmetros de estresse oxidativo e na inflamação (Bona *et al.*, 2018; Colares *et al.*, 2016). O estudo de Zhang *et al.* (2017) que avaliou o efeito da melatonina nas lesões hepáticas induzidas pelo álcool, mostrou uma melhora no dano hepático e na inflamação, ou seja, a melatonina exerceu um efeito protetor no fígado diminuindo as citocinas inflamatórias, o estresse oxidativo e regredindo a esteatose (Zhang *et al.*, 2017).

O aumento da permeabilidade do epitélio intestinal está associado à inflamação e ao desequilíbrio da microbiota intestinal. O estudo de Sommansson *et al.* (2014) avaliou o efeito da melatonina em ratos submetidos ao álcool e verificou-se uma diminuição da permeabilidade intestinal. Outro estudo experimental em ratos, com um modelo de colite

induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS) verificou que os animais que receberam melatonina melhoraram a capacidade antioxidante e houve uma proteção da microbiota intestinal (Zhu *et al.*, 2018). Devido a melatonina possuir propriedades terapêuticas torna-se importante avaliar aspectos de sua possível atividade terapêutica na DHGNA desencadeada pela frutose e na DHA.

1.6 Zebrafish

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido popularmente como zebrafish, peixe zebra ou como paulistinha, pertence à família *Cyprinidae* e é um pequeno peixe teleósteo (3 - 4 cm) de água-doce, originário da Índia. O seu manejo, reprodução e métodos laboratoriais de criação foram estabelecidos por Westerfield (2007). Seu ciclo de vida é de cerca de três anos, a maturação sexual ocorre entre três e seis meses de vida e o seu genoma foi totalmente mapeado, apresentando boa homologia genética com os seres humanos (Chen e Ekker, 2004). Por estas características tornou-se um animal de interesse para o estudo de doenças humanas, nos quais os mecanismos genéticos e biológicos possam ser investigados.

Há mais semelhanças do que diferenças entre peixes e mamíferos, em termos de macro e micro-anatomia, fisiologia, características bioquímicas e patológicas e em relação a respostas às substâncias hepatotóxicas. O fígado do peixe é responsável pelas mesmas funções metabólicas do fígado dos mamíferos, incluindo o processamento e armazenamento de nutrientes, síntese de enzimas e cofatores, excreção de metabólitos e de compostos xenobióticos (Wolf e Wolfe, 2005).

Nos primeiros dias de vida, o zebrafish é transparente, o que proporciona a visualização dos processos de embriogênese dos sistemas digestório e hepatobiliar (Bryson-Richardson *et al.*, 2007). O fígado está totalmente formado e funcionando 72 horas após a fertilização (Passeri *et al.*, 2009). Do ponto de vista anatômico o fígado do zebrafish adulto possui 2 lobos posicionados no eixo dorso-ventral, levemente lateral ao intestino e a outros órgãos do sistema gastrointestinal (Sadler *et al.*, 2007). O lobo dorsal é cerca de 25% maior do que o lobo ventral, e os 2 lobos são contíguos, não havendo um pedículo entre eles. A formação anatômica do fígado do zebrafish não permite a remoção completa de um dos lobos, como é possível em roedores, porém Sadler e seu grupo demonstraram que uma hepatectomia parcial (20-40% da massa hepática do lobo ventral), permitiu

observar que o fígado do peixe regenera-se de uma maneira similar aos mamíferos e que este modelo é útil para identificar genes necessários para a regeneração (Sadler *et al.*, 2007). Os hepatócitos estão arrançados como túbulos que apresentam um padrão de organização mais ou menos cilíndrico onde se encontram pequenos ductos biliares. Estes ductos intra-hepáticos são derivados de canalículos biliares e formam uma rede de canais onde a bile é coletada e transportada para a vesícula biliar e intestinos através de ductos maiores e do sistema biliar extra-hepático. Este sistema de coleta e transporte da bile se dá de maneira semelhante em mamíferos (Tao e Peng, 2009).

A unidade funcional do fígado dos mamíferos é comumente referida com o lóbulo hepático, cuja organização é bem estabelecida dentro do trato portal. Talvez a diferença mais significativa entre o fígado dos mamíferos e dos peixes teleósteos seja a inexistência do clássico lóbulo hepático, com os respectivos espaços-porta. O peixe possui veia porta, artérias hepáticas e ductos biliares que, no entanto, estão distribuídos aleatoriamente no parênquima hepático (Tao e Peng, 2009). Apesar destas singularidades, o zebrafish tem se mostrado um modelo viável para estudos hepáticos.

Em relação à pesquisa das doenças humanas causadas pelo consumo aumentado da frutose e do etanol, estudos desenvolvidos no peixe-zebra têm ajudado a desvendar alterações de vias metabólicas e mecanismos biomoleculares, danos celulares, entre outros (Sapp *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2017). Sapp e colaboradores (2014) realizaram um estudo experimental onde alevinos de peixes-zebra foram expostos à 4% de frutose e apresentaram acúmulo hepático de lipídeos, inflamação, aumento de estresse oxidativo, esteatohepatite e anormalidades do retículo endoplasmático, em comparação às larvas tratadas com glicose. No biotério desta universidade foi desenvolvido o modelo de DHGNA causada por exposição do peixe-zebra jovem (3 meses) à frutose (2%) por 10 minutos diariamente (Schneider *et al.* – dados ainda não publicados). A DHA será reproduzida a partir do modelo desenvolvido por Schneider e colaboradores (Schneider *et al.*, 2017), onde foi observada a presença de esteatose hepática em peixes-zebra adultos após a exposição contínua ao etanol (0,5%) por 1 mês.

2. JUSTIFICATIVA

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a doença hepática alcoólica (DHA) estão entre as principais causas de morte no mundo. Para o tratamento da DHGNA é preconizada a modificação no estilo de vida, com dieta e exercícios, visando a

redução de peso, o que já promoveria a atenuação da esteatose hepática. Já na DHA, a abstinência ao álcool é que proporcionaria melhora dos sintomas clínicos e a regressão parcial dos estágios avançados da doença. No entanto, ambas as estratégias nem sempre são bem sucedidas, principalmente por causa da dificuldade de adesão dos pacientes. Por isso, considera-se que não existe ainda um tratamento eficaz para estas doenças. Ambas, em estágios avançados, acarretam o empobrecimento da qualidade de vida do paciente, geram elevados custos ao sistema de saúde e podem levar à morte. Logo são necessárias pesquisas para descobrir terapias eficazes para tratamento da DHGNA e da DHA.

A melatonina é um hormônio que tem recebido atenção para o tratamento de distúrbios do sono, porém foram observadas uma série de outras importantes aplicações, como adjuvante no tratamento de cancer (Li *et al.*,2017), melhora na defesa imunológica (Hardeland *et al.*,2019), regulação da glicose (Lo *et al.*,2017). A melatonina possui ainda uma potente atuação na diminuição do estresse oxidativo. Assim, a avaliação dos mecanismos da melatonina como substância antioxidante e anti-inflamatória, pode contribuir para o tratamento da doença hepática gordurosa alcoólica e não-alcoólica.

Recentemente foi introduzido no biotério da UFCSPA o peixe-zebra como modelo animal. A primeira linha de pesquisa na Instituição com este modelo, intitulada "Efeito da frutose na expressão de genes da modulação do apetite e ação da melatonina na obesidade em zebrafish" (CEUA 537/17) revelou que a melatonina diminuiu a esteatose hepática causada pela frutose. Para responder as questões levantadas por este achado, este projeto se propõe a verificar as possíveis causas da proteção exercida pela melatonina na doença hepática causada pela frutose (DHGNA) e verificar também se na DHA permanece este efeito protetor. Portanto, este estudo busca auxiliar na elucidação dos mecanismos que envolvem a ação da frutose e do etanol na esteatose hepática e fornecer evidência científica sobre a ação da melatonina na presença de DHGNA e DHA.

3. QUESTÕES DE PESQUISA

A melatonina pode atenuar ou evitar a DHGNA e a DHA causada por exposição à frutose e ao etanol no peixe-zebra?

A melatonina pode evitar o aumento da permeabilidade intestinal em peixes-zebra expostos à frutose e ao etanol?

4. HIPÓTESE

A melatonina pode diminuir o acúmulo de gordura no fígado através da inibição das vias de lipogênese hepática e reduzir liberação dos sinalizadores inflamatórios.

A melatonina pode diminuir a ativação do NFkB e das vias envolvidas no estresse oxidativo e na inflamação.

A melatonina pode aumentar a expressão das proteínas envolvidas na manutenção da barreira intestinal.

5. OBJETIVOS

5.1 - Geral

Verificar a ação da melatonina na Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Doença Hepática Alcoólica por exposição à frutose e ao etanol.

5.2 – Específicos

- 1) Determinar a presença de esteatose hepática por avaliação histológica e pela quantificação de gordura hepática pela técnica de Nile red.
- 2) Avaliar a permeabilidade intestinal pela expressão das Claudinas (cldn-15a, cldn-15b, cldn-c), pela técnica de qRT-PCR.
- 3) Avaliar a expressão dos genes relacionados à lipogênese hepática e à inflamação: acetil-COA carboxilase (ACC1), ácido graxo sintase (FASn), receptor de adiponectina 2 (Adipor-2), sirtuína-1 (sirt-1) e fator nuclear kappa B (NF-kB).
- 4) Quantificar a expressão proteica da acetil-COA carboxilase (ACC1), ácido graxo sintase (FASn), receptor de adiponectina 2 (Adipor-2), sirtuína-1 (sirt-1) e NF-kB pela técnica de western-blot.

6 – MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 - Delineamento do estudo

Estudo experimental, prospectivo, cujo fator em estudo é a melatonina e o desfecho será a prevenção ou atenuação da lesão hepática gordurosa.

6.2 - Amostra estudada

A amostra estudada constará de 600 peixes (*Danio rerio*), *wild-type*, adultos (acima de 3 meses), divididos em 6 grupos de 100 animais: 1) Controle (C) 2); Melatonina (M); 3) Frutose (F) ; 4) Etanol (E); 5) Frutose + Melatonina (F+M) 6) Etanol + Melatonina (E+M). Na tabela a seguir estão descritas as técnicas que serão utilizadas e o respectivo número de animais necessários. O número amostral foi baseado nos artigos indicados na tabela para os respectivos desfechos: Alteração morfológica do fígado (Schneider.,*et al*,2017 Hammes.,*et al*,2011; Qiao.,*et al*,2019), quantificação da gordura hepática (Oka.,*et al*,2010;Ferrari.,*et al*,2018), expressão dos genes associados à inflamação intestinal (Schneider.,*et al*,2017;Chen.,*et al*,2018) e expressão proteica (Mania.,*et al*,2017)

Tabela - Técnicas, o número de animais necessários e referencial teórico:

Técnica	Objetivo	Tecido	Numero de amostras	Nº de animais	Artigo referência
Coloração hematoxilina-eosina (H&E)	Avaliar alterações hepáticas	Fígado	10 amostras por grupo (3 lâminas de cada fígado)	60 animais	SCHNEIDER et al., 2017 HAMMES et al.,2011 QIAO et al.,2019
Nile red	Quantificar gordura hepática	Fígado	10 amostras por grupo (pool de três animais)	180	OKA et al., 2010 FERRARI et al.,2018
qRT-PCR	Avaliar expressão de genes associados à inflamação intestinal	Fígado e intestino	10 amostras por grupo (pool de três animais)	180	SCHNEIDER et al., 2017 CHEN et al., 2019
Western blot	Deteção e quantificação das proteínas do estudo	Fígado e intestino	10 por grupo (pool de três animais)	180	MANIA et al., 2017

6.3 – Desenho experimental

Após o período de aclimação (2 semanas), os grupos experimentais serão alocados em aquários com a proporção de 2 peixes para cada litro de água, sob aeração constante, com um ciclo de luminosidade de 12h de luz e 12h de escuro e temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais serão alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixes (Alcon). O tempo do experimento será de seis semanas.

A seguir uma breve exposição do protocolo diário:

1 - Grupo C (100 animais – 10 para hematoxilina + 30 western blot + 30 Nile red + 30 qRT-PCR) - grupo sem adição de etanol, melatonina ou frutose. A água do aquário será trocada diariamente.

2- Grupo M (100 animais - 10 para hematoxilina + 30 western blot + 30 Nile red + 30 qRT-PCR) - os animais receberão melatonina (100 nM) 1 x dia, diretamente na água do aquário. A água do aquário será trocada diariamente.

3 - Grupo F (100 animais- 10 para hematoxilina + 30 western blot + 30 Nile red + 30 qRT-PCR) - os animais serão colocados em uma solução de frutose (2%) 1x ao dia por 10 minutos no aquário teste, logo após serão colocados em aquário com água limpa durante 5 minutos (aquário de lavagem) e depois recolocados no aquário domicílio. A água do aquário domicílio será trocada diariamente.

4 - Grupo E (100 animais -10 para hematoxilina + 30 western blot + 30 Nile red + 30 qRT-PCR) - O etanol (0,5% v.v) será colocado diretamente na água do aquário diariamente. A água do aquário será trocada diariamente.

5 - Grupo F + M (100 animais -10 para hematoxilina + 30 western blot + 30 Nile red + 30 qRT-PCR) - os animais serão expostos à frutose (2%) diariamente por 10 minutos. Após a exposição à frutose, os animais serão recolocados no aquário domicílio e a melatonina será colocada diretamente na água 1 x dia. A água do aquário será trocada diariamente.

6 - Grupo E + M (100 animais - 10 para hematoxilina + 30 western blot + 30 Nile red + 30 qRT-PCR) - O etanol (0,5% v.v) e a melatonina serão colocados na água 1 x dia. A água do aquário será trocada diariamente.

Em todos os grupos haverá troca diária da água dos aquários a fim de evitar acúmulo das substâncias utilizadas no estudo. A água do aquário do grupo controle também trocada a fim de uniformizar o protocolo.

Para a administração da frutose, os peixes serão transferidos do aquário domicílio para um aquário contendo 2% de frutose na água, por 10 minutos (dados do grupo, ainda não publicados). Após a exposição à frutose, os animais passaram por um aquário com água limpa para retirar os resíduos de frutose e então serão recolocados no aquário domicílio.

O etanol será adicionado diariamente diretamente na água do aquário na proporção de 0,5% (Schneider *et al.*, 2017).

A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) será dissolvida em água destilada numa concentração de 10 μ M (solução estoque) e administrada diretamente na água dos aquários por 6 semanas, a concentração final de melatonina no aquário será 100 nM, segundo protocolos descritos por Zhdanova e colaboradores (2008) e Piccinetti e colaboradores (2013).

Após o período de tratamento, os animais serão eutanasiados com eugenol (óleo de cravo) adquirido comercialmente (CONCEA, 2013). Como o óleo de cravo é insolúvel em água, será preparada uma solução estoque com álcool etílico. Esta solução consistirá de 10ml de óleo de cravo diluídos em 90 ml de álcool etílico PA, correspondendo a uma concentração de 100mg/ml (De Lucena *et al.*, 2013). Para eutanásia, serão colocados 3ml dessa solução estoque em 997ml de água. Cada animal será imerso nessa solução estoque por 600 segundos (De Lucena *et al.*, 2013).

Após a eutanásia, os animais serão posicionados sob lupa para a retirada do fígado e intestino. Os tecidos serão imediatamente congelados ou imersos em solução fixadora para posteriores análises histológicas, bioquímicas e moleculares.

6.3.1 Descrição das técnicas que serão utilizadas nos estudo:

a) Avaliação histológica:

A coloração com Hematoxilina-eosina, utilizada para avaliação de alterações no tecido hepático. Após o período de fixação em paraformaldeído a 10%, os fígados dos

animais, em sua totalidade, serão desidratados, emblocados em parafina e cortados em micrótomo (5 µm). De cada fígado serão montadas três lâminas coradas com hematoxilina-eosina (Schneider *et al.*, 2017).

b) Quantificação de gordura hepática:

A coloração com Nile red para detecção e medição fluorométrica quantitativa de gotículas lipídicas intracelulares usando espectrometria utilizando espectrofotometro marca spectramax M2. O tecido hepático será coletado e armazenado a -80°C, homogeneizado com PPS (20mg/mL) e incubados com solução de Nile red (solução estoque 100ng/mL a 37°C. Após incubação, a fluorescência do sobrenadante será medida em leitora de placa em excitação de 488nm e emissão de 550nm (Gómez – Lechón *et al.*, 2007).

c) Western blot:

O Método utilizado para detecção de proteínas específicas. Envolve a separação de proteínas por eletroforese em gel, ou transferência para a membrana e imunodetecção seletiva do antígeno mobilizado (Hnasko *et al.*, 2015). Serão utilizados os fígados e os intestinos dos animais para a extração das proteínas que serão analisadas neste estudo. A técnica será realizada segundo o descrito por Mania e colaboradores (Mania *et al.*, 2017).

d) Polimerase de reação em cadeia (qRT-PCR):

Para análise da expressão de m-RNA dos genes escolhidos será utilizado o método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). A avaliação da expressão gênica será realizada nos genes relacionados à inflamação (NFkB), lipogênese (sirt-1 e adipor-2) e permeabilidade intestinal (cldn-c, cldn-15a, cldn-15b). As amostras de fígado e intestino serão imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. A quantificação do produto da PCR em cada ciclo se dará pela detecção de fluorescência existente em cada amostra do produto (Livak *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2017).

6.4. Locais do estudo

Biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

- 4º andar prédio 3 - Sala do Zebrafish

Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica da UFCSPA - 5º andar prédio 3 - Sala 502

Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA - 3º andar, prédio 3 – Sala 304

Laboratório de Patologia da UFCSPA - 5º andar prédio 3 - Sala 514

6.5 Análise Estatística

Os dados serão descritos como média e desvio padrão nas variáveis quantitativas. A avaliação das diferenças entre variáveis quantitativas será realizada através da análise de variância ANOVA seguido do teste de Student-Newman -kels ou pelo teste de Kruskal - Wallis, em caso de assimetria. O nível de significância adotado será de $\alpha = 0,05$. Os dados serão processados e analisados com o auxílio dos programas Excel e SPSS/25.

6.6 Considerações Éticas

Todos os procedimentos serão realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e segue regulamentos da utilização humanitária dos animais das resoluções normativas nº12 (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA) e nº13 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O projeto será encaminhado para o Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

7. CRONOGRAMA

Atividades/ Período	2019 2º Sem	2020 1º Sem	2020 2º Sem	2021 1º Sem	2021 2º Sem	2022 1º Sem	2022 2º Sem	2023 1º Sem
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Redação do projeto e encaminhamento ao CEUA	X							
Aquisição dos animais e materiais	X	X	X		X			
Desenvolvimento do modelo experimento e coleta das amostras	X	X	X		X	X		
Análises das amostras biológicas e dos dados obtidos		X	X	X	X	X	X	
Redação do artigo científico			X	X		X	X	
Publicação				X	X	X	X	X

8. ORÇAMENTO

Item	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Peixes	600	0,90	540,00
Frutose			Já adquirido
Melatonina Sigma	250 mg	358,00	358,00
Ração	4	34,00	136,00
Nile red	1 x 100 mg	679,00	679,00
Acetona	1 litro	24,00	24,00
PBS	1 litro	213,00	213,00
Trizol	1 X100 mL	724,00	724,00
Agua DEPC	100 ml	148,00	148,00
Adipor-2 dr0342657	1 unidade (250 reações)	1.210,50	1.210,50
Sirt- 1 ENSDART00000101209	1 unidade (250 reações)	1.210,50	1.210,50
NFK-b ENSDART00000098209	1 unidade (250 reações)	1.385,00	1.385,00
Cldn c dr03138426	1 unidade (250 reações)	1.385,00	1.385,00
Cldn 15a dr03145240	1 unidade (250 reações)	1.385,00	1.385,00
Cldn15b dr03072501	1 unidade (250 reações)	1.385,00	1.385,00
Beta-actina Dr03119691 m1	1 unidade (250 reações)	1.385,00	1.385,00
Beta -actin antibody	100µL		1.500,00
Sirt-1 antibody	100µL		1.500,00
Adipor2 antibody	100µL		1.500,00
Nfk-b antibody	100µL		1.500,00
Cld 15-a antibody	100µL		1.500,00
Cld 15-b antibody	100µL		1.500,00
Cld c antibody	100µL		1.500,00

RNeasy mini kit (Qiagen) 12183025	2 unidades (250 amostras)	4.050,00	8.100,00
High Capacity cDNA reverse transcription (Applied n° cat. 4368814)	2 unidades	1.325,25	2.625,50
Taqman Gene Expression Master Mix (4369514)	1 unidade (2x5ml)	3.851,10	3.851,10
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	1 unidade (10 placas)	210,35	210,35
Filme: MicroAmp™ Optical Adhesive Film	1 unidade (25 filmes)	382,00	382,00
Parafina	1 kg	23,00	23,00
Xileno Neon	5 litros	24,00	120,00
Etanol absoluto (10 p/ histologia e 4 para experimento)	14 litros	16,00	224,00
Acetona	1 litro	25,00	25,00
Cassete histológico	1 pacote (500 unid.)	91,00	91,00
Lamínula 22x22	Pacote c/ 100	2,60	2,60
Lamínula 24x24	Pacote c/ 100	3,00	3,00
Lamínula 24x32	Pacote c/ 100	4,00	4,00
Lamina 26x76	2 Pacotes c/ 50	5,00	10,00
Navalhas	1 pact c/ 50	620,00	620,00
TOTAL			37.574,55

Obs: Alguns reagentes já estão disponíveis no laboratório, os demais serão adquiridos com verbas de projetos já em andamento e o atual projeto será enviado às agências de fomento em busca de financiamento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbari M, Ostadmohammadi V, Tabrizi R *et al.* The effects of melatonin supplementation on inflammatory markers among patients with metabolic syndrome or related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflammopharmacology*. 2018 Aug;26(4):899-907.

Arciello M, Gori M, Maggio R, Barbaro B *et al.* Environmental pollution: a tangible risk for NAFLD pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 7;14(11):22052-66.

Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology*. 2014 Feb;59(2):713-23.

Bona S, Rodrigues G, Moreira AJ *et al.* Antifibrogenic effect of melatonin in rats with experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *JGH Open*. 2018 May 24;2(4):117-123.

Bray GA. Fructose: should we worry? *Int J Obes (Lond)*. 2008;32 Suppl 7:S127-31.

Bryson-Richardson, R. J. *et al.* FishNet: an online database of zebrafish anatomy. *BMC Biol* [S.l.], v. 5, p. 34, 2007.

Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.

Cederbaum, A. I. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*, v. 16, n. 4, p. 667-85, Nov 2012.

Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. *World J Gastroenterol*. 2016 Oct 28;22(40):8918-8928.

Concea (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) - Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA; 2013 pag. 36.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.

Chen E, Ekker SC. Zebrafish as a genomics research model. *Curr Pharm Biotechnol*. 2004; 5(5):409-13.

Chen L, Guo Y, Hu C *et al.* Dysbiosis of gut microbiota by chronic coexposure to titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A: Implications for host health in zebrafish. *Environ Pollut.* 2018 Mar;234:307-317.

De Lucena CAS, Calegari BB, Pereira EHL, Dallegrave Eliane. *O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes.* Available from: https://www.researchgate.net/publication/267026511_O_uso_de_oleo_de_cravo_na_eutanasia_de_peixes [accessed Mai 15, 2019].

Donohue, T. M., JR. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol* [S.l.], v. 13, n. 37, p. 4974-8, Oct 7 2007

Dugum M, McCullough A. Diagnosis and Management of Alcoholic Liver Disease. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(2):109–116.

Elamin E, Masclee A, Troost F, *et al.* Ethanol impairs intestinal barrier function in humans through mitogen activated protein kinase signaling: a combined in vivo and in vitro approach. *PLoS One.* 2014;9(9):e107421

European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016 Jun;64(6):1388-402

European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol.* 2018 Jul;69(1):154-181

Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M *et al.* Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2016 Aug;65(8):1017-25

Ferrari JT, Ayres R, Hammes To *et al.* Experimental model of hepatic steatosis by fructose in adult zebrafish: A pilot study. *Clin Biomed Res.* 2018;38(2)

Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, *et al.* A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007; 165(2): 106-116

Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013;93(2):525-569.

Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest.* 2018 Feb 1;128(2):545-555.

Hammes TO, Pedroso GL, Hartmann CR *et al.* The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). *Dig Dis Sci.* 2012 Mar;57(3):675-82

Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res.* 2018 Nov;65(4):e12525

Heilig M, Goldman D, Berrettini W, O'Brien CP. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Oct 20;12(11):670-84

Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96.

Jegatheesan P, De Bandt JP. Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients.* 2017; 9(3):230.

Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, *et al.* Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018;68(5):1063-107

Kawaratani, H. *et al.* The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 495156, 2013.

Klaunig JE, Li X, Wang Z. Role of xenobiotics in the induction and progression of fatty liver disease. *Toxicol Res (Camb).* 2018 May 18;7(4):664-680.

Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. *Nutr J.* 2013; 12: 114.

Li, S., Tan, H. Y., Wang, N. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences*, 2015; 16(11), 26087–26124.

Lima-Cabello E, Díaz-Casado ME, Guerrero JA *et al.* A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J Pineal Res.* 2014; 57(1):1-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

Louvet, A.; Mathurin, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 12, n. 4, p. 231-42, Apr 2015.

Mania M, Maruccio L, Russo F *et al.* Expression and distribution of leptin and its receptors in the digestive tract of DIO(diet-induced obese) zebrafish. *Ann Anat.* 2017 Jul;212:37-47.

Masarone M, Federico A, Abenavoli L *et al.* Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials*.2014;9(3):126-33.

Nath, B. *et al.* Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice. *Hepatology*, v. 53, n. 5,p. 1526-37, May 2011.

Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1075-1083.

Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, *et al.* Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol*. 2010; 10:21.

Okazaki F, Zang L, Nakayama H, *et al.* Microbiome Alteration in Type 2 Diabetes Mellitus Model of Zebrafish. *Sci Rep*. 2019;9(1):867.

O'Shea, RS. *et al.* Alcoholic liver disease. *Hepatology*, v. 51, n. 1, p. 307-28, Jan 2010.

Osna NA, Donohue TM Jr, Kharbanda KK *et al.* Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res*. 2017;38(2):147-161.

Passeri, M. J. *et al.* Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* [S.I.], v. 49, n. 2, p. 443-52, Feb 2009.

Piccinetti CC, Migliarini B, Olivotto I *et al.* Melatonin and peripheral circuitries: insights on appetite and metabolism in *Danio rerio*. *Zebrafish*. 2010; 10(3):275-82

Qiao R, Sheng C, Lu Y *et al.* Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Sci Total Environ*. 2019 Apr 20;662:246-253

Rao RK, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(6):G881-884.

Riemann D, Baglioni C, Bassetti C, *et al.* European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia. *J Sleep Res*. 2017

Sadler, K. C. *et al.* Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrf1. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 104, n. 5, p. 1570-5, Jan 30 2007

Sapp V, Gaffney L, EauClaire SF, Matthews RP. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology*. 2014; 60(5):1581-92.

Schneider AC, Gregório C, Uribe-Cruz C, *et al.* Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver. *World J Hepatol*. 2017, 18; 9(8):418-426.

Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline:Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018 Feb;113(2):175-194.

Softic S, Cohen DE, Kahn CR *et al* Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016 May;61(5):1282-93.

Sommansson A, Saudi WS, Nylander O, Sjöblom M. Melatonin inhibits alcohol-induced increases in duodenal mucosal permeability in rats in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Jul 1;305(1):G95-G105.

Sookoian S, Pirola CJ. Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2017 Mar;23(1):1-12.

Srinivasan V, Ohta Y, Espino J,*et al.* Metabolic syndrome, its pathophysiology and the role of melatonin. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2013 Jan;7(1):11-25

Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016; 53(1): 52–67.

Sun H, Huang FF, Qu S. Melatonin: a potential intervention for hepatic steatosis. *Lipids Health Dis*. 2015, 22:14:75.

Tao, T.; Peng, J. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Genet Genomics* [S.I.], v. 36, n. 6, p. 325-34, Jun 2009.

Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2017 Sep 6;9(9).

Toshikuni N, Tsutsumi M, Arisawa T. Clinical differences between alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 14;20(26):8393-406..

Utzeri E, Usai P. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017 Jun 14;23(22):3954-3963.

Venkataramanujam Srinivasan, Yoshiji Ohta, Javier Espino, Jose A. Pariente *et al*, "Metabolic Syndrome, its Pathophysiology and the Role of Melatonin", *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery (Under Re-organization)* (2013) 7: 11.

Volynets V, Louis S, Pretz D, *et al*. Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr*. 2017;147(5):770-780

Wahlström A. Outside the liver box: The gut microbiota as pivotal modulator of liver diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 May 1;1865(5):912-919.

Westerfield M. *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of the zebrafish (Danio rerio)*. 5th.ed. Oregon: University of Oregon Press, 2007.

Wolf, J. C.; Wolfe, M. J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol* [S.I.], v. 33, n. 1, p. 75-85, 2005.

You M, Rogers CQ. Adiponectin: a key adipokine in alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med* (Maywood). 2009 Aug;234(8):850-9

Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *J Hepatol*. 2019 Mar;70(3):531-544.

Yu Y, Cai J, She Z, Li H. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Adv Sci (Weinh)*. 2018 Dec 12;6(4):1801585.

Zhang JJ, Meng X, Li Y, *et al*. Effects of Melatonin on Liver Injuries and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 23;18(4). pii: E673.

Zhdanova IV, Yu L, Lopez-Patino M, Shang E, Kishi S, Guelin E. Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. *Brain Res Bull*. 2008; 75(2-4):433-41.

Zhou Y, Rubinstein M, Low MJ, Kreek MJ. Hypothalamic-specific proopiomelanocortin-deficiency reduces alcohol drinking in male and female mice *Genes Brain Behav*.; 16(4): 449–461.

Zhu D, Ma Y, Ding S, Jiang H, Fang J. Effects of Melatonin on Intestinal Microbiota and Oxidative Stress in Colitis Mice. *Biomed Res Int*. 2018 Feb6;2018:2607679

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Projeto de doutorado:

Efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide sobre prejuízos
comportamentais e neuroinflamatórios da prole de ratas obesas

Aluna: Fernanda da Silva Rodrigues

Orientadora: Renata Padilha Guedes

Co-orientadora: Márcia Giovenardi

PORTO ALEGRE, 2020

RESUMO

Nas últimas décadas, o número de indivíduos obesos tem crescido de forma exponencial, fazendo com que a obesidade já seja considerada uma pandemia mundial e um sério problema de saúde pública. A obesidade ocasiona diversas alterações metabólicas, causando secreção crônica de moléculas pró-inflamatórias que podem desencadear morte celular em diferentes tecidos, incluindo o sistema nervoso central. Durante a gestação, essas citocinas pró-inflamatórias são capazes de ultrapassar a barreira placentária, podendo atingir os tecidos fetais e causar desde problemas no desenvolvimento intrauterino até desordens neurológicas que se manifestam após o nascimento, como autismo, depressão e esquizofrenia. Entretanto, ainda existem lacunas acerca dos mecanismos relacionados às alterações metabólicas e neurológicas da prole em decorrência do consumo alimentar inadequado das mães e possíveis intervenções que amenizem esses efeitos. Desta forma, o presente projeto propõe avaliar os efeitos da obesidade materna induzida por uma dieta de cafeteria sobre parâmetros metabólicos, neuroinflamatórios e comportamentais da prole, além de aferir a capacidade do canabidiol (CBD) de atenuar essas consequências. A hipótese central deste estudo é que o estado pró-inflamatório crônico desencadeado pela obesidade seja um fator de ativação imune materna (AIM), podendo favorecer o desenvolvimento de desordens neurológicas na prole. Ainda, a suplementação da prole com CBD seria capaz de atenuar esses prejuízos devido a sua capacidade de modular o sistema endocanabinóide, serotoninérgico e dopaminérgico, entre outros. Para testar essa hipótese, este projeto propõe a indução de obesidade em ratas *Wistar* a partir da terceira semana de vida, utilizando uma dieta de cafeteria. A dieta será administrada por 16 semanas, sendo que entre a 9ª e a 10ª semana acontecerá o cruzamento, portanto a obesidade será mantida durante toda a gestação. A prole será dividida em machos e fêmeas que passarão a receber a suplementação de CBD por gavagem a partir da 3ª ou 8ª semanas de vida, e serão submetidos aos testes comportamentais após 2 semanas de suplementação. Após os testes, será realizada a eutanásia e coleta do material biológico para determinação do perfil metabólico, da microbiota intestinal, ácidos graxos de cadeia curta, níveis de neurotransmissores nos tecidos cerebrais, expressão dos receptores canabinóides nos tecidos cerebrais e metabólicos e ativação microglial e astrocitária. Além disso, serão realizados ensaios *in vitro* com culturas de astrócitos e microglia para avaliação dos efeitos do canabidiol sobre mecanismos neuroinflamatórios. Apesar deste estudo se tratar de um projeto de caráter básico de pesquisa, a elucidação das questões aqui apresentadas poderá ser de grande relevância para a busca de novas abordagens para doenças de caráter neuroinflamatório derivadas da obesidade materna.

ABSTRACT

In the last decades, the number of obese individuals has grown exponentially, making obesity a global pandemic and a serious public health problem. Obesity leads to several metabolic changes, causing chronic secretion of pro-inflammatory molecules that can trigger cell death in different tissues, including the central nervous system. During pregnancy, these pro-inflammatory cytokines are able to cross the placental barrier, reaching fetal tissues and causing problems from impaired intrauterine development to neurological disorders that manifest after birth, such as autism, depression and schizophrenia. However, there are still gaps about the mechanisms related to the metabolic and neurological changes of the offspring due to the mothers' inadequate food consumption and possible interventions that mitigate these effects. Thus, this project aims to assess the effects of maternal obesity induced by a cafeteria diet on metabolic, neuroinflammatory and behavioral parameters of the offspring, in addition to assessing the ability of cannabidiol (CBD) to mitigate these consequences. The central hypothesis of this study is that the chronic pro-inflammatory state triggered by obesity is a maternal immune activation factor (MIA), which may favor the development of neurological disorders in the offspring. Furthermore, supplementation with CBD in the offspring would be able to mitigate these losses due to its ability to modulate the endocannabinoid, serotonergic and dopaminergic system, among others. To test this hypothesis, this project proposes the induction of obesity in *Wistar* female rats from the third week of life, using a cafeteria diet. The diet will be administered for 12 weeks and the mating will take place during the 9th week, so obesity will be maintained throughout pregnancy. The offspring will be divided into males and females who will begin to receive CBD supplementation by gavage from the 3rd or 8th week of life, and will be subjected to behavioral tasks after 2 weeks of supplementation. After the tests, euthanasia and collection of biological material will be performed to determine the metabolic profile, intestinal microbiota, short-chain fatty acids, levels of neurotransmitters in brain tissues, expression of cannabinoid receptors in brain and metabolic tissues and microglial and astrocytic activation. In addition, *in vitro* experiments will be carried out with cultures of astrocytes and microglia to assess the effects of cannabidiol on neuroinflammatory mechanisms. Although this study is a basic research project, the elucidation of the questions presented here may be of great relevance for the search for new approaches to neuroinflammatory disorders caused by maternal obesity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo que apresenta um papel etiológico nas principais causas de morte por fatores não-comunicáveis (CENSIN et al., 2019), uma vez que está fortemente associada a diversas comorbidades, como o diabetes mellitus tipo II (BROWN et al., 2017; TOPLAK et al., 2019), doenças cardiovasculares (FUSTER et al., 2016) e vários tipos de câncer (ENGIN, 2017; OTTAIANO et al., 2018). Ainda, recentemente, a obesidade se estabeleceu como um importante fator de risco para a infecção por SARS-Cov-2, uma vez que estudos demonstram que alto índice de massa corporal (IMC) são de 4 a 5 vezes maiores entre os casos fatais da doença em relação aos não-fatais, além da alta prevalência de indivíduos acima do peso dentre os pacientes nas unidades de tratamento intensivo e crítico (PETRAKIS et al., 2020; REZENDE et al., 2020; WATANABE et al., 2020).

A epidemiologia da obesidade tem sofrido uma grande influência da transição nutricional oriunda das alterações no padrão dietético da população, fazendo com que o número de indivíduos obesos cresça de forma pandêmica (ABARCA-GÃ et al., 2017; BLÜHER, 2019). Além de diversos fatores relacionados aos níveis crescentes de urbanização, mudanças de renda e aumento da demanda de atividades das mulheres (REARDON et al., 2019), o consumo alimentar é muito afetado pela disponibilidade física dos alimentos, os preços destes e sua aceitabilidade social e cultural, influenciando diretamente no estado nutricional do indivíduo (HLPE, 2017). Ainda, devido aos avanços tecnológicos e à liberalização do mercado, produtos alimentícios processados, densos em energia e reduzidos em vitaminas e minerais estão mais prontamente disponíveis e geralmente são mais baratos do que alimentos mais nutritivos (MONTEIRO et al., 2013).

A etiologia da obesidade não é de fácil identificação, uma vez que a mesma é caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, é resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos (HRUBY; HU, 2015). Mundialmente, cerca de 2 bilhões de pessoas estão acima do peso, sendo 672 milhões obesas (ABARCA-GÓMEZ et al., 2017). No Brasil, os dados mais recentes apontam que, em 2018, mais da metade da população (56%) apresentava sobrepeso, dentre os quais 20% dos indivíduos eram

obesos (VIGITEL, 2018). Além dos danos inerentes à condição em si, as comorbidades associadas à obesidade acabam sendo muito onerosas para o sistema de saúde, devido aos altos custos de tratamento e redução da produtividade no trabalho e, conseqüentemente, perda do potencial econômico do indivíduo (SWINBURN et al., 2019).

1.2. Efeitos da obesidade no sistema nervoso central

Estudos recentes vêm demonstrando uma forte correlação entre obesidade e resistência insulínica com a ocorrência de disfunção neuronal e/ou demência (BRUCE-KELLER; KELLER; MORRISON, 2009; WILLIAMSON; MCNEILLY; SUTHERLAND, 2012). Indivíduos obesos podem apresentar prejuízos nos processos de atenção e memória, o que também pode contribuir para o comprometimento na regulação do controle da ingestão alimentar (MARTIN; DAVIDSON, 2014; PRICKETT; BRENNAN; STOLWYK, 2015). As dietas hipercalóricas também aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, como depressão e transtorno de ansiedade (ARCEGO et al., 2018; DUTHEIL et al., 2016). Ainda, é bem estabelecido que uma elevada relação cintura/quadril está associada ao declínio cognitivo, especialmente em idades avançadas, acarretando alterações comportamentais e bioquímicas que indicam risco aumentado sobretudo à doença de Alzheimer (BARANOWSKI; BOTT; MACPHERSON, 2018; MA et al., 2020).

Os mecanismos envolvidos ainda são indeterminados, porém um número crescente de evidências indica que o elo entre obesidade e disfunção neurológica pode ser o estado inflamatório persistente resultado da liberação crônica de moléculas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo (LASSELIN; ALVAREZ-SALAS; GRIGOLEIT, 2016). No geral, toda a composição celular do tecido adiposo é modificada, ocorrendo recrutamento massivo de macrófagos, de linfócitos Th1, células CD8+ e B, gerando um ambiente pró-inflamatório que promove retroalimentação positiva sobre a manutenção da obesidade (MCLAUGHLIN et al., 2017). A ativação exacerbada desse sistema é capaz de afetar diversas regiões do sistema nervoso central, como hipotálamo (WILLIAMS, 2012), córtex cerebral (RULLMANN et al., 2019) e hipocampo (GRILLO et al., 2019), estabelecendo a neuroinflamação. Esta, por sua vez, é caracterizada pela ativação de células gliais como a microglia (macrófagos residentes do SNC) e os astrócitos, ambos

contribuindo com o aumento da produção de mediadores inflamatórios no sistema nervoso (BONDY, 2020).

Esses processos neuroinflamatórios são característicos de diversas doenças neurológicas e psiquiátricas como depressão (MOAZZAMI et al., 2019), ansiedade (NORONHA et al., 2019), epilepsia (RANA; MUSTO, 2018), autismo (EISSA et al., 2020) e esquizofrenia (BUCKLEY, 2019) e culminam para o surgimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (VOET et al., 2019). Sendo assim, a obesidade pode ser um importante fator predisponente à disfunção neurológica.

1.3. Dieta de cafeteria

A compreensão da etiologia da obesidade se estabeleceu majoritariamente pela pesquisa com modelos de roedores, onde os efeitos comportamentais, metabólicos e moleculares podem ser estudados ao longo do tempo sob condições controladas e com fatores ambientais facilmente manipuláveis. Assim, buscando uma maior verossimilhança com o perfil nutricional atual e visando mimetizar seus efeitos, estudos em modelos animais têm sido realizados utilizando as chamadas dietas de cafeteria, que consistem, em sua maioria, em uma alimentação rica em carboidratos simples e gorduras (LEIGH; KENDIG; MORRIS, 2019).

A dieta da cafeteria envolve uma dieta altamente palatável que utiliza alimentos humanos como biscoitos, embutidos e refrigerantes. Esses alimentos têm alto teor de açúcar, sal e especiarias, o que aumenta consideravelmente sua palatabilidade e, conseqüentemente, determina a preferência alimentar (DE MACEDO; DE FREITAS; DA SILVA TORRES, 2016). Além disso, do ponto de vista evolutivo, esses alimentos com alto teor de gordura e açúcar são mais atraentes pois podem ser rapidamente convertidos em energia (NESSE; BERRIDGE, 1997). Esse modelo dietético é utilizado há mais de 40 anos, quando foi relatado que ratos expostos a uma variedade de "alimentos de supermercado" (marshmallows, chocolate, manteiga de amendoim, biscoitos, salame, queijo, entre outros) exibiram ganho de peso acelerado em relação aos controles, sendo a dieta de cafeteria mais eficaz do que as dietas purificadas com alto teor de gordura ou carboidrato (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Ademais, estimulado pela variedade de alimentos ofertados, esse tipo de alimentação está relacionado à indução de hiperfagia persistente por meio da estimulação da alimentação hedônica (alimentação por prazer), seguida do aumento

da ingestão de energia que, além do acelerado ganho de peso corporal, leva a alterações metabólicas e fisiológicas predisponentes à resistência insulínica (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertrigliceridemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS), todas consideradas importantes comorbidades observadas durante a obesidade (BROWN et al., 2017; CASTRO et al., 2015; LEIGH; KENDIG; MORRIS, 2019).

Ainda, além dos desequilíbrios entre a distribuição dos macronutrientes e do valor energético a eles atribuído, o tipo de carboidrato consumido também possui forte influência no desenvolvimento dos distúrbios metabólicos induzidos por dieta de cafeteria. Assim, muito além do conhecimento comum que relaciona exclusivamente o alto teor de lipídeos e a densidade calórica às comorbidades associadas à obesidade, o índice glicêmico (IG) também parece exercer uma influência significativa sobre o surgimento de doenças metabólicas, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (SANTOS, 2016). Por outro lado, uma consequência do aumento da variedade de alimentos é que a ingestão de macronutrientes e micronutrientes não é controlada, um ponto que alguns pesquisadores consideram um viés experimental (MOORE, 1987). Entretanto, embora a dieta de cafeteria não ofereça o mesmo grau de controle sobre a composição de nutrientes das dietas purificadas, ela aproxima o modelo experimental da palatabilidade e da variedade que caracterizam as opções alimentares nas sociedades mais modernas e, consequentemente, mimetizam de forma mais eficaz os efeitos da alimentação no organismo (LEIGH; KENDIG; MORRIS, 2019). Além disso, a dieta da cafeteria parece atuar de forma mais proeminente em diversos sistemas de neurotransmissores, simulando melhor as alterações no sistema de recompensa do que dietas purificadas (ROBERTSON; RASMUSSEN, 2017).

1.4. A obesidade como um fator de ativação imune materna

O estado do ambiente intrauterino durante o desenvolvimento fetal exerce efeitos significativos sobre a saúde pós-natal da prole até a idade adulta, com isso, exposições ambientais, incluindo infecções, deficiências nutricionais, exposições tóxicas e outros estressores são particularmente críticos durante a gestação (CONWAY; BROWN, 2019). Tratando-se do desenvolvimento do sistema nervoso central, estudos epidemiológicos revelam fortes conexões entre uma elevada ativação imune materna (AIM), resultante de infecção e estresse, e transtornos

psiquiátricos como a esquizofrenia (CANETTA et al., 2014; DE CARVALHO LIMA et al., 2020), transtornos do espectro autista (BROWN et al., 2014; LOMBARDO et al., 2018) e transtorno bipolar (LEE et al., 2020) na prole. Apesar de as citocinas desempenharem papéis críticos no desenvolvimento normal do feto, incluindo proliferação de neurônios e sinaptogênese (BURNS et al., 1993), níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias maternas alteram o curso normal desses processos e são associados a um neurodesenvolvimento anormal (O'LOUGHLIN et al., 2017). Por exemplo, altas concentrações de interleucina-6 materna já foram associadas a mudanças maturacionais da substância branca frontolímbica da prole nos primeiros 12 meses pós-parto (RASMUSSEN et al., 2019) e ao desenvolvimento anormal de regiões encefálicas associadas ao processamento sensorial e controle de impulso aos 2 anos de idade (GRAHAM et al., 2018).

Supõe-se que um “desafio” imunológico pré-natal atue como um *"primer"* que, quando combinado com outros fatores ambientais, genéticos e epigenéticos, altera a trajetória do neurodesenvolvimento fetal e pode resultar no surgimento de uma série de distúrbios do SNC (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019). Os modelos consolidados de AIM em animais envolvem a ativação do sistema imunológico materno durante o desenvolvimento fetal usando uma variedade de imunógenos, como lipopolissacarídeo (LPS) e ácido polinossínico:policitidílico (poli I:C) (KENTNER et al., 2019; KOWASH et al., 2019; SIMÕES et al., 2018), entretanto, outros fatores são passíveis de promover alterações no desenvolvimento da prole como, por exemplo, estresse, trauma e a microbiota materna (WANG et al., 2019).

Estudos experimentais e clínicos têm destacado a importância da nutrição materna durante as fases iniciais do desenvolvimento do feto e do neonato (DURNIN, 1998; LOWENSOHN; STADLER; NAZE, 2016). Estudos epidemiológicos têm demonstrado evidências entre a dieta da gestante e as condições de vitalidade do recém-nascido, as alterações do ambiente intrauterino e os padrões de crescimento com desfechos metabólicos na vida adulta (GLASTRAS et al., 2018). Na gestação, sabe-se que o ganho de peso excessivo pode estar associado a diabetes gestacional, dificuldades no parto e riscos para o feto (KONG et al., 2020; MACHADO; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2019). Essas mudanças induzidas por fatores externos, que podem ser mantidas durante a toda a vida, acabam levando a alterações permanentes no fenótipo através de processos epigenéticos (LEE, 2015).

O aumento da ingesta energética durante a gestação e lactação pode predispor o feto ao desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas, fato que pode ser parcialmente explicado pela hipótese da programação fetal, caracterizada por um processo adaptativo a um ambiente intrauterino adverso que resulta na redefinição dos processos de desenvolvimento, a fim de garantir a sobrevivência fetal (MARCINIAK et al., 2017). Tal adaptação provoca alterações morfológicas, fisiológicas, metabólicas e epigenéticas, que propiciam o desenvolvimento de diversas doenças na vida adulta da prole (KWON; KIM, 2017).

Ainda, estudos clínicos demonstram a obesidade pré-gestacional e diabetes materna associadas a risco aumentado para transtornos do espectro autista (LI et al., 2016), deficiências cognitivas, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, ansiedade, depressão, transtornos alimentares e esquizofrenia (EDLOW, 2017).

1.5. Epigenética

Epigenética é ciência que estuda as alterações na expressão de genes específicos que independem de mudanças na sequência primária do DNA e que são decorrentes de estímulos e/ou exposição ambientais (BIRD, 2007). As modificações epigenéticas alteram o estado dinâmico da cromatina, a qual é formada pela dupla hélice de DNA no entorno de quatro pares de proteínas, nomeadas de histonas: H2A, H2B, H3 e H4. As histonas podem sofrer pelo menos oito tipos diferentes de modificações pós-traducionais: acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e ADP-poli-ribosilação (KOUZARIDES, 2007; STRAHL; ALLIS, 2000). Por outro lado, a molécula de DNA é susceptível a uma única alteração epigenética, a metilação (MOORE; LE; FAN, 2013). Entre os fatores ambientais que podem induzir modificações epigenéticas, os mais citados incluem a alimentação, infecções, radiação e a prática de exercício físico (FISCHER, 2020; GRECO et al., 2019; STONE, 2016; WIDMANN; NIESS; MUNZ, 2019).

Os desequilíbrios de marcadores epigenéticos podem ter relevância clínica, desempenhando um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças, tais como: distúrbios neurofisiológicos, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, câncer, bem como doenças mentais graves de longa evolução (MIRANDA FURTADO, 2019). Entretanto, estudos que tenham investigado a relação entre obesidade e marcadores epigenéticos ainda são recentes (RAMOS-LOPEZ et al., 2018; SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019). Ainda, estudos que investiguem a

relação de marcadores epigenéticos relacionados à obesidade materna sobre parâmetros metabólicos e neuroinflamatórios na prole são escassos, o que torna premente esta busca.

1.6. Sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinoide consiste nos receptores canabinóides 1 (CB1R) e 2 (CB2R), os ligantes endógenos destes receptores (anandamida (AEA) e 2-aracidonoglicerol (2-AG)) e enzimas envolvidas em sua síntese e degradação (hidrolase amida de ácido graxo (HAAG) e monoacilglicerol lípase (MAGL)) (SHENGLONG ZOU; UJENDRA KUMAR, 2018).

Os CB1R são um dos receptores acoplados à proteína G mais comuns no sistema nervoso central, majoritariamente encontrados em neurônios pré-sinápticos de diversas regiões, como neocórtex, estriado e hipocampo (BUSQUETS GARCIA et al., 2016). Sua ampla distribuição permite que eles coordenem uma série de funções, variando de cognição, memória, humor e respostas sensoriais até a regulação do apetite (KIRKHAM, 2005; KRUK-SLOMKA et al., 2017). Os canabinóides endógenos, por sua vez, são liberados por neurônios pós-sinápticos e funcionam como moduladores, ligando-se aos CB1R pré-sinápticos para modular a liberação de neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato e dopamina (DA) (COVEY et al., 2017; GARCÍA et al., 2016; KÖFALVI et al., 2020).

Das funções exercidas pelo sistema endocanabinóide, destaca-se sua influência no circuito de recompensa do cérebro, particularmente em resposta a substâncias de abuso, mas também em resposta a certos grupos alimentares, em especial aqueles ricos em gorduras e açúcar, chamados “altamente palatáveis” (CUNHA et al., 2020). Estes alimentos estão associados a um estado de conforto e recompensa devido à ativação do sistema dopaminérgico, em especial o eixo Amígdala – Tegmento Ventral (VTA) – Núcleo Acúmbens (NAc), modulando o controle hedônico do comportamento alimentar (KOEKKOEK; MUL; LA FLEUR, 2017). O circuito dopaminérgico, por tanto, está intrinsecamente ligado à atividade canabinóide uma vez que os CB1R estão densamente localizados nas regiões estriadas que medeiam a função de recompensa (NAc e VTA) (WENZEL; CHEER, 2018).

Outras correlações entre o sistema endocanabinóide e o comportamento alimentar e metabolismo energético podem ser citadas, como, por exemplo, o polimorfismo HAAG rs324420, que reduz a atividade da hidrolase amida de ácido graxo (HAAG), levando a níveis exacerbados de AEA e consequente ativação excessiva dos receptores CB1, induzindo adipogênese e alto risco de obesidade (DE LUIS et al., 2013; DORIS et al., 2019). Enquanto nos receptores CB2, a estimulação leva a um efeito protetor importante em adipócitos de indivíduos obesos: o aumento dos níveis de proteína desacopladora 1 (UCP1) e, consequentemente, da geração de calor e gasto de energia (ROSSI et al., 2016).

Além disso, o sistema endocanabinóide desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do sistema imunológico, bem como na modulação de processos inflamatórios. Embora os mecanismos biológicos subjacentes ainda não sejam bem esclarecidos, essas funções parecem estar associadas à capacidade do sistema de endocanabinóide de inibir a proliferação de células imunes e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico, etc.) (DONVITO et al., 2018). Por exemplo, a anandamida (AEA) atenua a inflamação ao reduzir a produção de IL-6 (CHANG; LEE; LIN, 2001), enquanto o THC inibe a produção de IL-12 e interferon gama (IFN- γ) por células T helper do tipo 1 (Th1) (KLEIN; CABRAL, 2006).

A participação dos CB1R se dá principalmente no sistema nervoso, onde atuam como mediadores anti-inflamatórios, restaurando, por exemplo, os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β) e ciclooxigenase-2 (COX2) após estímulos inflamatórios (ZHANG et al., 2016). Enquanto sua estimulação com agonistas seletivos inibe a liberação de mediadores pró-inflamatórios (CRUNFLI et al., 2019; ZOU et al., 2016), sua inativação aumenta a atividade da microglia, elevando consequentemente a expressão de IL-6 no hipocampo (ATIVIE et al., 2018). Durante os processos inflamatórios, as células da microglia superexpressam o receptor CB1 e liberam uma grande quantidade de citocinas e mediadores que danificam as células. Com isso, estudos recentes sobre o papel da HAAG destacam que seu *knockdown* nas células microgliais BV2 e o consequente aumento dos níveis de AEA levam a uma superexpressão de marcadores M2, revelando um importante efeito anti-inflamatório (TANAKA et al., 2019). Por isso, há um interesse crescente em direcionar o sistema endocanabinóide para o tratamento de diferentes doenças neurológicas.

Os CB2R, por sua vez, exercem essa função majoritariamente nas regiões periféricas, influenciando principalmente a resposta imune. Por exemplo, sabe-se que uma variante do gene que codifica os CB2R (rs35761398) leva à produção de uma variante menos funcional desses receptores, CB2 Q63R, tornando os indivíduos mais propensos a desenvolverem doenças autoimunes (ARGENZIANO et al., 2019; SIPE, 2005). Ainda, o metabolismo do ligante 2-AG leva à produção de ácido araquidônico, que é um precursor de efetores pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (CHOUINARD et al., 2011). Com isso, observou-se que a inibição da monoacilglicerol lipase (MAGL) acarreta na redução na produção de prostaglandinas e leucotrienos, com consequente efeito anti-inflamatório. Além disso, quando ambas as enzimas MAGL e HAAG são inibidas, observa-se uma redução no número de leucócitos aderentes, apoiando assim o papel anti-inflamatório da ativação dos CB2R (ARGENZIANO et al., 2019; SARDINHA et al., 2014).

Por fim, mesmo que esteja menos presente nos compartimentos neuronais, o CB2R também parece exercer um papel importante na neuroinflamação. Recentemente, Siniscalco e colaboradores realizaram um estudo com 22 crianças autistas, no qual foi observada uma regulação positiva de CB2R em células mononucleares do sangue periférico. Essa observação gerou a hipótese de um possível envolvimento do sistema endocanabinóide na patogênese dos transtornos do espectro autista e levanta a possibilidade de se utilizar o receptor CB2 como alvo terapêutico (SINISCALCO et al., 2014), evitando assim os efeitos psicotrópicos que muitas vezes derivam da estimulação CB1.

Ao considerar todas essas evidências, é possível sugerir o sistema endocanabinóide como um importante marcador e alvo farmacológico para o manejo não só da inflamação associada à obesidade, mas também de suas complicações secundárias.

1.7. Canabidiol (CBD)

O canabidiol (CBD) é um fitocanabinóide não alucinógeno encontrado nas diversas subespécies e variedades de *Cannabis sativa*, capaz de atuar em vários sistemas, incluindo o opióide (KATHMANN et al., 2006), serotoninérgico (LINGE et al., 2016; SALES et al., 2018) e endocanabinóide (CHYE et al., 2019). Dentro do sistema canabinoide, o CBD atua como antagonista não competitivo dos CB1R com baixa afinidade para o sítio primário de ligação do receptor, atuando mais

efetivamente através de modulação alostérica negativa (LAPRAIRIE et al., 2015; THAM et al., 2019; THOMAS et al., 2007).

Sabe-se que o CBD é capaz de inibir a sinalização endocanabinoide de forma dose-dependente, provavelmente ligando-se ao sítio alostérico dos CB1R e alterando a potência de outros ligantes primários como, por exemplo, os endocanabinóides ou o tetrahydrocannabinol (THC) (STRAIKER et al., 2018; THAM et al., 2019). Sua capacidade de modular o sistema endocanabinoide, apesar de não apresentar efeitos intrínsecos (LAPRAIRIE et al., 2015), sugere que é capaz de diminuir a atividade dos CB1R sem os efeitos colaterais relacionados ao agonista inverso dos CB1R, como o rimonabant (ROHLEDER et al., 2016).

O CBD também tem demonstrado ter propriedades neuroprotetoras tanto em culturas celulares quanto em modelos animais de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (CAMPOS et al., 2016; SCHRÖDER et al., 2017), hipóxia-isquêmica (MOHAMMED et al., 2017), excitotoxicidade por glutamato (RODRÍGUEZ-MUÑOZ et al., 2016), esclerose múltipla (PRYCE et al., 2015) e Parkinson (CRIVELARO DO NASCIMENTO et al., 2020).

Ainda, o CBD mostrou eficácia terapêutica em uma variedade de modelos animais de ansiedade e estresse, reduzindo tanto medidas comportamentais quanto fisiológicas (SHANNON, 2019; SKELLEY et al., 2020). Verificou-se que o CBD atua como um antagonista do GPR55, um receptor acoplado à proteína G e expresso nos núcleos caudado e putâmen (STOTT et al., 2019). Também foi demonstrado que atua como um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, corroborando seus efeitos antidepressivos e ansiolíticos (LINGE et al., 2016; SKELLEY et al., 2020). Por fim, é também um modulador alostérico dos receptores opioides mu e delta (KATHMANN et al., 2006).

Com isso, o CBD apresenta um bom perfil de segurança, com efeitos colaterais geralmente leves em estudos pré-clínicos em animais ou estudos em humanos, incluindo regimes de dose aguda e crônica, usando vários modos de administração (CHYE et al., 2019; IFFLAND; GROTENHERMEN, 2017; TAYLOR et al., 2018). Isso, juntamente com a baixa capacidade de induzir o abuso (HANEY et al., 2016), torna um bom candidato terapêutico.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade constitui um problema de saúde pública que atinge milhões de pessoas no Brasil e no mundo. Além dos prejuízos causados ao próprio indivíduo obeso, estudos experimentais e clínicos têm destacado a importância do estado nutricional materno sobre o desenvolvimento do feto e do neonato, evidenciando a relação entre a dieta da gestante e os desfechos metabólicos durante o crescimento e na vida adulta, devido aos processos epigenéticos que acarretam alterações permanentes no fenótipo. Dentre essas alterações, pode-se destacar a resposta imune exacerbada no sistema nervoso central, que predispõe ao desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas na prole de mães obesas. Com base na relação entre obesidade materna, neuroinflamação e disfunção neurológica na prole, a busca por estratégias anti-inflamatórias que tenham capacidade de atenuar ou reverter os danos causados pela nutrição materna é de grande relevância. O sistema endocanabinóide demonstra uma importante função tanto sobre a regulação metabólica quanto neurológica, com isso, caracteriza um potencial alvo para o estudo e intervenção dos mecanismos transgeracionais da obesidade. Assim, o presente projeto propõe avaliar se a suplementação com óleo de canabidiol pode modificar a resposta neuroinflamatória da prole e, conseqüentemente, alterar os padrões comportamentais causados pela obesidade materna. Embora este estudo se trate de um projeto de pesquisa de caráter básico, a elucidação das questões aqui apresentadas poderá ser de grande relevância para a busca de novos tratamentos e estratégias para a obesidade e suas conseqüências. Além disso, este projeto está alinhado com a Agenda 2030 da ONU, que tem como meta o estímulo de ações em áreas de importância crucial para a humanidade e para o planeta. O terceiro objetivo, dentre os 17 totais, foca em assegurar uma vida saudável e a promoção do bem-estar para todas e todos, em todas as idades, reduzindo em um terço a mortalidade prematura por doenças não transmissíveis via prevenção e tratamento, além de promover saúde mental e bem-estar.

PERGUNTA DA PESQUISA: A suplementação de canabidiol na prole é capaz de reverter déficits neurológicos associados à obesidade materna?

HIPÓTESE: A obesidade materna predispõe a prole ao desenvolvimento de déficits cognitivos como aqueles presentes no autismo e na esquizofrenia. O canabidiol exerce efeitos neuroprotetores que podem atenuar tais disfunções. Assim, o uso de canabidiol na prole de mães obesas é capaz de reverter comportamentos do tipo autista e esquizofrênico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com canabidiol sobre aspectos metabólicos, comportamentais e neuroinflamatórios da prole gerados pela obesidade materna.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar comportamentos do tipo autista na prole juvenil e do tipo esquizofrênico na prole adulta de mães obesas.
- Determinar uma dose ideal de suplementação de canabidiol para os objetivos propostos.
- Avaliar o efeito da suplementação de canabidiol sobre parâmetros comportamentais da prole.
- Determinar o perfil metabólico e inflamatório das mães obesas por meio de dosagens plasmáticas de insulina, leptina, glicemia, triglicerídeos, HDL-colesterol, LDL-colesterol e citocinas inflamatórias.
- Caracterizar microbiota intestinal das mães e da prole.
- Determinar os níveis plasmáticos de ácidos graxos de cadeia curta das mães e os níveis plasmáticos e cerebrais na prole.
- Avaliar a ativação microglial e astrocitária na prole das mães obesas.
- Investigar o efeito da dieta e do tratamento com canabidiol sobre níveis de neurotransmissores (ocitocina, serotonina, dopamina e GABA) e de BDNF no córtex cerebral e hipocampo da prole.
- Avaliar a expressão dos receptores CB1R e CB2R no córtex cerebral, hipocampo, intestino e fígado.
- Realizar ensaios in vitro com culturas de astrócitos e microglia para avaliação dos efeitos do canabidiol sobre mecanismos neuroinflamatórios.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais, descarte de resíduos e considerações éticas

Serão utilizados ratos *Wistar* machos (N=219) e fêmeas (N=150), mantidos em caixas de acrílico no biotério da UFCSPA. A sala onde os animais permanecerão possui controle de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (as luzes permanecerão acesas das 7h às 19h).

Após a eutanásia, as carcaças dos animais serão acondicionadas em sacos brancos para descarte de resíduos biológicos e entregues ao Biotério para procedimento de eliminação por empresa especializada. Serão tomados todos os cuidados para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento. Todos os procedimentos experimentais propostos estão de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 08.10.2008) segundo as orientações do CEUA da UFCSPA. Este trabalho será submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais e somente será iniciado após sua aprovação.

4.2. Suplementação com óleo de canabidiol (CBD)

A suplementação de canabidiol será feita com o óleo RSHO™ Blue Label, lote 1737-01, 1700 mg/mL, fornecido pela Central Analítica da UFCSPA. O experimento será iniciado com um piloto utilizando as seguintes concentrações: 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg e 50 mg/kg, a fim de determinar a dose ideal para as análises propostas. Será administrado um volume de 1mL/kg. Será utilizada como referência a resposta de melhora nos comportamentos prejudicados apresentados pelos animais não tratados. Com isso, os comportamentos descritos serão mensurados e analisados em uma regressão não-linear, a fim de estabelecer uma relação dose-resposta entre a intervenção (CBD) e a melhora no padrão comportamental (MOTULSKY & CHISTOPOULOS, 2010; COUSSENS et al, 2018). A dose que apresentar uma melhor relação de melhora nos déficits comportamentais será utilizada no experimento principal.

A suplementação será realizada por gavagem diariamente por um período de duas semanas a partir do 21º (experimento I) ou 56º (experimento II) dias de vida da prole.

As doses de CBD do estudo piloto e a duração do tratamento foram baseadas em estudos anteriores que relatam efeitos positivos do CBD na cognição em modelos de roedores baseados em inflamação (BARICHELO et al., 2012; CASSOL-JR et al., 2010; FAGHERAZZI et al., 2012; OSBORNE et al., 2017; SCHIAVON et al., 2014). Devido à grande variabilidade de doses e duração da suplementação, optamos por fazer um estudo piloto a fim de determinar a dose ideal de acordo com o modelo e objetivos propostos.

4.3. Delineamento do estudo

4.3.1 Experimentos in vivo

Inicialmente, será realizado um estudo piloto a fim de padronizar a dose ideal de canabidiol a ser administrada. Serão utilizadas 3 mães obesas e 3 mães controle e será padronizando-se 4 filhotes machos e 4 fêmeas por cada mãe. Os filhotes serão divididos por sexo e subdivididos nos seguintes grupos: controle (CT); CBD 2,5 mg/kg; CBD 5 mg/kg; CBD 10 mg/kg; CBD 20 mg/kg; CBD 50 mg/kg (n= 4/grupo). Após a escolha da dose adequada, será realizado o estudo principal.

As fêmeas serão mantidas em caixas de acrílico e receberão as dietas controle (CT, dieta padrão, Nuvital – Nuvilab®, 3.4 Kcal/g - 63% carboidratos, 26% proteínas, 11% lipídios) ou de cafeteria (CAF, mortadela (Perdigão®), wafer de morango (Isabela®), Tortinhas de chocolate (Isabela®), Hot Cracker sabor pizza (Parati®), chocolate branco (Harald®), salsicha (Alibem®) e refrigerante de laranja (Sukita®), 4.4 Kcal/g - 48% carboidratos, 10% proteínas, 44% lipídios) (n= 10/grupo) e livre acesso à água por 16 semanas (contando com o período de gestação) a partir da 3ª semana de vida. O controle do consumo alimentar de cada animal será feito pela pesagem periódica das sobras que se encontram na grade da caixa moradia desses. Os animais serão pesados semanalmente, e o peso dos animais do grupo controle será comparado ao grupo dieta de cafeteria. O diagnóstico de obesidade será realizado quando houver diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

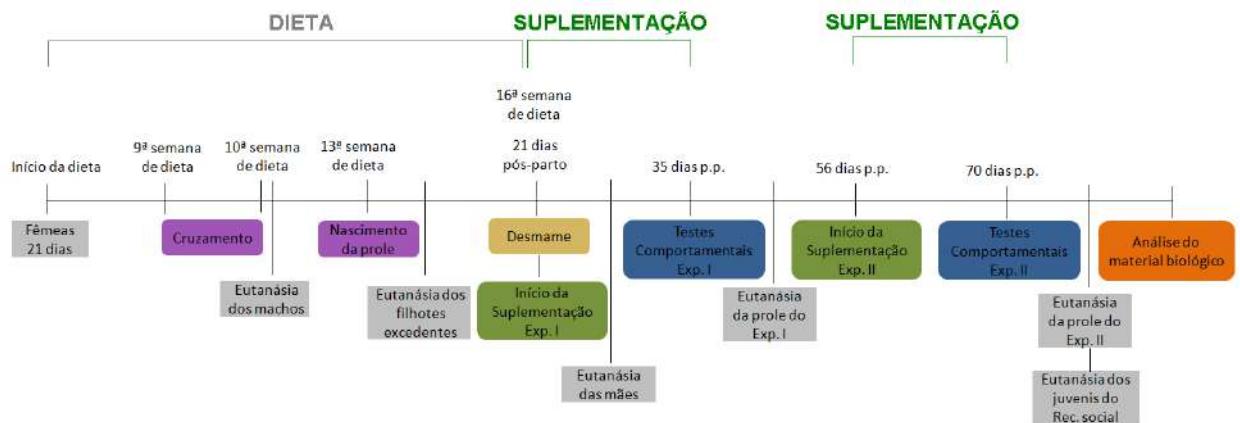
A dieta de cafeteria será administrada por 16 semanas a partir da 3ª semana de vida das fêmeas. Elas continuarão em dieta até as 12 semanas de vida, quando será feito o acasalamento. A dieta continuará a ser administrada durante a gestação e lactação, o que totaliza 16 semanas aproximadamente

As fêmeas adultas serão agrupadas com machos adultos (proporção de 2:1) apenas durante o período noturno (por cerca de 12 horas, durante 5 dias) para o acasalamento na 12ª semana de vida. Após, será verificada a presença do plug vaginal e, se presente, será tomado como indicativo de prenhes e considerado o primeiro dia de gestação. Para realização do acasalamento, serão utilizados machos (n=12) que não participarão dos experimentos e retornarão ao biotério caso seja possível, caso contrário, serão eutanasiados. Durante a prenhes e a lactação, as fêmeas continuarão a receber suas dietas específicas predeterminadas por randomização.

Após o parto, os filhotes serão padronizados em 4 fêmeas e 4 machos por mãe, preferencialmente nesta proporção. A eutanásia dos filhotes excedentes ocorrerá por decapitação conforme recomendação do CONCEA, e o descarte ocorrerá conforme descrito no item 4.1 “Animais, descarte de resíduos e considerações éticas”. Aos 20 dias de idade, após o desmame, as proles serão alojadas em caixas de acrílico com 2 animais por caixa e serão divididos pelo sexo e nos seguintes grupos: mãe controle (CT); mãe controle + óleo de CBD (CT + CBD); mãe obesa (OB); mãe obesa + óleo de CBD (OB + CBD), fornecidos ração e água *ad libitum* (n= 48/grupo).

Para o Experimento I, a fim de avaliar os efeitos da suplementação no período da infância sobre comportamentos do tipo autista, metade dos animais da prole receberá suas respectivas suplementações a partir do 21º dia (3 semanas) de idade e passarão pelos testes comportamentais por volta do 35º dia (5 semanas) de idade. No dia seguinte ao último teste comportamental, ocorrerá a eutanásia e coleta do material biológico (n= 24/grupo).

Para o Experimento II, a fim de avaliar os efeitos da suplementação na fase adulta sobre comportamentos do tipo esquizofrênico, a outra metade dos animais da prole receberá suas respectivas suplementações a partir do 56º dia (8 semanas) de idade e passarão pelos testes comportamentais por volta do 70º dia (10 semanas) de idade. No dia seguinte ao último teste comportamental, ocorrerá a eutanásia e coleta do material biológico (n= 24/grupo).



4.3.2 Experimentos *in vitro*

Para obtenção das culturas primárias, ratos Wistar neonatos obtidos do biotério da UFCSPA, de ambos os sexos, de 1 a 3 dias de vida, serão decapitados utilizando uma tesoura cirúrgica. Considerando que para cada cultivo são necessários 5 animais, este número deve ser multiplicado por 3 para que cada experimento seja feito em triplicata, resultando em 15 animais por experimento. Estão previstos 6 experimentos, o que resulta em 90 animais. As células obtidas a partir dessas culturas serão divididas em 4 grupos que serão descritos abaixo. Os animais terão o encéfalo dissecado para o isolamento das células gliais (astrócitos e microglia) a partir do córtex cerebral.

Para a aquisição da cultura primária de astrócitos, as amostras de córtex cerebral serão mecanicamente dissociadas, de forma asséptica, por 15 minutos utilizando uma pipeta Pasteur, após, as amostras serão centrifugadas. O tecido será então ressuspenso e transferido para um meio contendo 40U de papaína/ml, 0,02% cisteína e 0,003% DNase e novamente mecanicamente dissociado por 15 minutos e centrifugado. Então, as células serão ressuspensas em HBSS contendo apenas DNase (0,003%) e deixadas para decantação por 30-40 minutos. O sobrenadante será coletado e centrifugado por 7 minutos. As células do sobrenadante serão ressuspensas em DMEM/F12 (10% FBS, 15mM HEPES, 14.3mM NaHCO₃, 1% fungizona e 0,004% gentamicina). Após, a solução será dividida em placas de cultura com lâminas de vidro para aderir por 24h em uma estufa a 37°C e 5% CO₂. Após, as amostras serão lavadas para retirar qualquer célula não aderida ou resíduos restantes e o novo meio de cultura será aplicado (SOUZA et al., 2013).

Para a aquisição da cultura primária de microglia, as amostras de córtex cerebral serão cortadas em um diâmetro de 200uM, após, passarão por um processo de digestão enzimática com o uso de 12mg de papaína. As amostras serão trituradas e centrifugadas, o sobrenadante será retirado e filtrado. Após a solução será dividida em placas de cultura com lâminas de vidro para aderir por 24h em uma estufa a 37°C e 5% CO₂. Após, as amostras serão lavadas para retirar qualquer célula não aderida ou resíduos restantes e o novo meio de cultura será aplicado (YIP et al., 2009).

O meio de cultura será coletado para posterior análise por meio das técnicas de Western blot e ELISA. Após a fixação, serão utilizadas as técnicas de imunocitoquímica e análise da morfologia celular através do software Image J. Todos os experimentos serão realizados em triplicatas. Após a obtenção das culturas celulares, astrócitos e microglia serão divididos em 4 grupos:

- 1) grupo controle (CT), que receberá soro das proles de mães controles;
- 2) grupo controle + CBD (CT+CBD), que receberá soro das proles de mães controles e que receberam suplementação de óleo de CBD;
- 3) grupo obesidade (OB), que receberá soro das proles de mães obesas;
- 4) grupo obesidade + CBD (OB+CBD), que receberá soro das proles de mães obesas e que receberam suplementação de óleo de CBD.

Após as culturas, serão analisadas as citocinas IL1- β , IL-6, IL-10 e TNF- α , a expressão proteica e o estado de ativação microglial e astrocitária.

4.4. Estimativa do n amostral

O presente projeto propõe o uso de diferentes metodologias. As técnicas propostas podem apresentar diferentes graus de variabilidade amostral. O número amostral dos experimentos *in vivo* foi escolhido com base em artigos científicos que utilizam modelos experimentais semelhantes e em experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (AMODEO et al., 2012; BOYKO et al., 2013; CHANG; COLE; COSTA, 2017; OLIVEIRA et al., 2021; PELLOW et al., 1985; ZOU et al., 2015). Assim, para a realização do estudo principal serão necessárias 12 fêmeas por grupo para acasalamento (1 grupo dieta controle, 1 grupo dieta de cafeteria, totalizando 24 fêmeas). Para o acasalamento será necessário 1 rato macho para cada 2 fêmeas, o que totaliza 12 machos adultos. Cada ninhada será de cerca de 8 filhotes, assim, a partir das 24 fêmeas, estima-se um total de 192 filhotes. Ainda,

serão necessários ratos juvenis de cerca de 21 dias para o teste de Reconhecimento Social, sendo 1 juvenil para cada 4 animais. Esse teste será realizado em 96 filhotes (serão 8 grupos com 12 filhotes em cada grupo), portanto serão necessários 24 ratos juvenis. Além disso, inicialmente será realizado um estudo piloto, a fim de padronizar a dose ideal de canabidiol para os fins propostos, para isso, serão necessárias 6 fêmeas, 3 machos e seus 48 filhotes, totalizando 57 animais para o experimento piloto. Dessa forma, será necessário um total de 309 animais para os experimentos *in vivo*.

Já para os experimentos *in vitro*, o cálculo do tamanho amostral foi realizado considerando um erro α de 0.05 e um poder $(1 - \beta)$ 0.90 e o valor de “N” estimado para cada grupo experimental foi de 3 cultivos celulares independentes utilizando 5 neonatos, de ambos os sexos, por cultivo, tendo como parâmetro de análise a medida de viabilidade celular (PACHECO et al., 2018).

4.5. Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais adultos e juvenis serão submetidos a um jejum de 6 horas previas a eutanásia, uma vez que este período é suficiente para gerar as melhores respostas de glicose e lipídeos em jejum sem que haja alteração nos marcadores de estresse, como ocorre em períodos superiores de jejum (NOWLAND et al, 2011).

As mães, os animais da prole e os neonatos utilizados para cultura celular serão sacrificados por decapitação em sala silenciosa, no ciclo claro. As coletas de material biológico serão realizadas em gelo e utilizando-se material estéril. Serão coletadas as estruturas de interesse do SNC (córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo) e o sangue troncular. Após, o sangue será centrifugado a 12.100 G, a 4°C, por 10 min, e o soro armazenado em microtubos e mantido a -80°C para posterior análise. Simultaneamente, o encéfalo e do tecido adiposo serão retirados e, imediatamente o material será processado de acordo com cada técnica a ser utilizada (nitrogênio líquido, RNA later, meio de crioproteção, entre outros) para posterior armazenamento.

A prole excedente, os machos (que serão usados para o cruzamento) e os juvenis (que serão usados para o teste comportamental) serão eutanasiados por sobredose anestésica (cetamina 270mg/Kg de cetamina e 30mg/kg de xilazina) por via intraperitoneal.

4.6. Testes comportamentais

4.6.1. Ordem dos testes comportamentais

Os animais adultos serão submetidos aos seguintes testes comportamentais na seguinte ordem: Labirinto em cruz elevado, Campo aberto, Reconhecimento social e Preferência à sacarose. A tarefa de campo aberto será realizada após 48 horas do término do labirinto em cruz elevado. Já a tarefa de reconhecimento social será realizada 24 horas após a tarefa de campo aberto, uma vez que o aparato do campo aberto e de reconhecimento é o mesmo e, portanto, a primeira tarefa serve como habituação da segunda. Por fim, o teste de preferência à sacarose será realizado por último em função das 24 horas de jejum necessárias, a fim de não interferir nas demais análises. Para isso, o período de jejum será iniciado 48 horas após o término do reconhecimento social (N = 12 machos e 12 fêmeas por grupo).

Os animais juvenis serão submetidos aos seguintes testes comportamentais na seguinte ordem: Marble burying, Campo aberto, Habituação e desabituação social e Labirinto em cruz elevado. Cada tarefa será realizada após 48 horas do término da anterior. A ordem das tarefas foi definida com base na variação dos ambientes nos quais são realizadas e do grau de estresse inerente a cada uma, uma vez que a primeira e a terceira são realizadas em uma caixa forrada com maravalha da própria gaiola do animal, enquanto a segunda e a quarta em seus próprios aparatos. Dessa forma, minimiza-se uma possível intervenção da associação entre o contexto e o aprendizado da tarefa (N = 12 machos e 12 fêmeas por grupo).

4.6.2. Campo aberto

Os animais serão testados inicialmente no paradigma de campo aberto, a fim de avaliar atividades locomotoras e exploratórias, estado emocional e comportamentos repetitivos. A tarefa é realizada em um aparato construído de madeira laminada escura, medindo 60 x 60 x 40 cm (largura x profundidade x altura), o qual o animal ficará livre para explorar por 10 minutos (FEYISSA et al., 2017).

As atividades locomotoras e exploratórias serão expressas pela distância total percorrida pelo animal no aparato, os níveis de ansiedade serão medidos pelo tempo despendido pelo animal nos quadrantes centrais do campo e pela contagem dos restos fecais excretados pelo animal durante o teste, e, por fim, o comportamento de *grooming* (ato de limpar as próprias vibrissas e pelos) será avaliado como índice de comportamento repetitivo do tipo-compulsivo.

As medidas de distância e permanência no centro serão aferidas de forma automatizada através de software especializado, enquanto o *grooming* e a contagem de fezes serão avaliados por um observador cego aos grupos experimentais.

4.6.3. *Labirinto em cruz elevado*

Os animais serão submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado a fim de avaliar comportamentos do tipo-ansioso, baseado na aversão natural dos roedores a áreas elevadas e abertas (PELLOW et al., 1985). O aparato possui quatro braços que surgem da mesma base (5 x 5 x 0,5 cm) a 50 cm do chão, sendo dois braços abertos (25 x 5 x 0,5 cm) e os outros dois fechados (25 x 5 x 16 cm).

O animal será posicionado no centro do aparato, voltado para um dos braços fechados, e ficará livre para explorar o espaço por 5 minutos (SCHRADER et al., 2018). Será mensurada a distância total percorrida, número de entradas em cada braço e o tempo de permanência em cada braço. Os dados serão avaliados de forma automatizada por software especializado.

4.6.4. *Comportamento de enterrar esferas (Marble Burying)*

O teste de enterrar esferas será utilizado para avaliar comportamento do tipo-compulsivo, uma vez que roedores que apresentam comportamentos repetitivos/compulsivos tendem a enterrar um número muito superior de esferas quando comparados com animais controle (AMODEO et al., 2012; CHANG; COLE; COSTA, 2017).

Para isso, uma caixa acrílica semelhante a casa moradia do animal será forrada com maravalha limpa com 20 esferas de vidro aleatoriamente dispostas na superfície. O animal ficará livre na caixa por 30 minutos e, então, será registrado o número de esferas que foram enterradas. A esfera é considerada como enterrada quando pelo menos dois terços do seu volume se encontram cobertos por maravalha. Os dados serão avaliados por um observador cego aos grupos experimentais.

4.6.5. *Preferência à sacarose*

O teste de preferência à sacarose será utilizado conforme Boyko e colaboradores, a fim de avaliar comportamento do tipo-depressivo nos animais experimentais (BOYKO et al., 2013). O teste é dividido em três fases: na primeira fase,

duas garrafas contendo sacarose 1% são colocadas nas gaiolas no lugar da água dos animais. Um dia depois, uma dessas garrafas é trocada por uma garrafa de água sem nenhum aditivo, e será mantida por mais 24 horas. Posteriormente, os animais serão deixados sem comida ou água por 24 horas. A terceira fase do teste é realizada após as 24 horas de jejum, consistindo em colocar nas gaiolas duas garrafas: uma contendo 100 mL de água e outra contendo 100 mL de sacarose 1%. Nessa fase, as garrafas são deixadas nas gaiolas por quatro horas, e, ao final, o consumo de sacarose e de água é quantificado. A preferência à sacarose é calculada conforme a fórmula $\text{Pref sacarose (\%)} = \frac{\text{consumo sacarose (mL)}}{\text{consumo sac (mL)} + \text{consumo água (mL)}} \times 100$.

4.6.6. Reconhecimento social

Os animais serão submetidos ao teste de reconhecimento social a fim de avaliar a capacidade de socialização, discernimento e preferência entre coespecíficos e objetos inanimados e a memória social desses.

O aparato é constituído por uma caixa de madeira laminada escura, medindo 60 x 60 x 40 cm (largura x profundidade x altura), e duas gaiolas acrílicas com o mesmo espaço entre si e as paredes do aparato. Num primeiro momento, é colocado um animal juvenil em uma das gaiolas e um objeto na outra, então o animal experimental adulto fica livre para explorar o aparato e as gaiolas por 10 minutos. 24 horas depois, é colocado o mesmo animal juvenil na primeira gaiola, e um segundo animal juvenil na gaiola onde anteriormente encontrava-se o objeto, então o animal adulto fica livre para explorar o aparato por 5 minutos. A tendência natural do animal é, no primeiro dia, explorar por mais tempo a gaiola contendo outro animal em relação à gaiola contendo um objeto e, no segundo dia, explorar por mais tempo a gaiola contendo o animal novo em relação à gaiola contendo o animal conhecido (GARRIDO ZINN et al., 2016).

O tempo de exploração das gaiolas pelo animal adulto será avaliado de forma automatizada por software especializado.

4.6.7. Habituação e desabituação social

O teste de habituação e desabituação social será utilizado a fim de analisar a capacidade de discriminação social através do olfato. Para isso, será apresentado a cada animal dois odores não sociais (extratos de plantas) e dois odores sociais

(urina de outro animal) em *swabs* descartáveis. Cada odor será apresentado três vezes consecutivas, por 2 minutos cada vez. A tendência natural do animal é explorar por mais tempo os odores sociais em relação aos não sociais e, ainda, o tempo de exploração tende a decair ao longo das apresentações (habituação), voltando a crescer quando um novo odor é apresentado (desabituação) (ZOU et al., 2015).

O tempo de exploração dos *swabs* pelo animal será avaliado por um observador cego aos grupos experimentais.

4.7. Parâmetros metabólicos sistêmicos

O plasma será separado do sangue total por centrifugação e, em seguida, estocado a -20°C, para as análises posteriores. A glicose, o colesterol total e suas frações (HDL-C, LDL-C e VLDL-C), e os triacilgliceróis, serão determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, usando kits comerciais.

4.8. Dosagens hormonais e de citocinas inflamatórias

Os níveis plasmáticos de insulina, leptina e citocinas inflamatórias serão determinados por ELISA utilizando kits comerciais.

4.9. Controle de peso e composição corporal

As progenitoras serão pesadas antes do início da dieta e semanalmente até o parto. As proles serão pesadas semanalmente até o dia da eutanásia. A composição corporal será determinada pela avaliação da massa gorda, representada pelo peso em gramas do tecido adiposo branco periepididimal e do tecido adiposo marrom interescapular e pela massa magra, composta do peso em gramas do músculo esquelético gastrocnêmio e do músculo cardíaco. Os tecidos serão removidos e pesados imediatamente após o sacrifício dos animais. Os dados serão expressos em g de tecido por 100 g de peso corporal.

4.10. Análises moleculares (extração, quantificação de RNA e RT-PCR)

O RNA total das amostras será extraído através do método do TRIzol®. A quantificação será feita por espectrometria a 260nm e 280nm. A análise da expressão relativa dos genes de interesse (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-8, CCL2, IL-10, IL-4, TLR4, SIRT1, receptores de leptina,) será realizada usando transcrição

reversa combinada com PCR quantitativo em tempo real. Os *primers* serão selecionados com base em dados do *Rattus norvegicus* do National Center for Biotechnology Information. Como controle, será analisada a expressão dos genes da β -actina, da ubiquitina-C e da ciclofilina-A. Os produtos de amplificação serão analisados com o método *SYBR™ Green*, por PCR em tempo real, e a análise de quantificação relativa será realizada conforme os resultados dos testes de eficiência de amplificação dos genes.

4.11. Análise da expressão proteica (Western Blot)

Após quantificação, as proteínas de interesse (caspases, AKT, p-AKT, GSK3, p-GSK3, TLR4, SIRT1, mTOR, p38, p-p38, JNK, p-JNK, Iba-1, GFAP, ocludina, zonula ocludens-1 e claudina-5) serão separadas por SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose usando um sistema de transferência, a 110 V por 1-2 h. As membranas serão incubadas com leite em pó 8% em tampão tris salino contendo 0,1% de tween 20 (TTBS) por 90 min. As membranas serão incubadas *overnight* com o anticorpo primário. Em seguida, as membranas serão incubadas com anticorpos secundários por 2 horas em temperatura ambiente. Para revelação, será realizada reação de quimiluminescência, com exposição das membranas ao filme radiográfico. Os resultados de cada membrana serão relativizados aos valores encontrados com a incubação das mesmas com antiGAPDH ou anti-b-actina.

4.12. Análise histológica

Amostras de fígado e intestino serão incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e coradas pelas técnicas de hematoxilina/eosina e picrossírius.

4.13. Imuno-histoquímica

Os tecidos serão fixados em tampão de zinco por 48 horas. Após, as peças serão desidratadas, diafanizadas e incluídas em bloco de parafina. Cortes seriados de 5 μ m de espessura serão realizados em micrótomo. Para o procedimento imunohistoquímico, inicialmente será realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena e de sítios inespecíficos de ligação. Em sequência, os cortes serão lavados em PBS-T (tampão fosfato salino com 0,02% de triton x-100), sendo, logo após, incubados com os anticorpos primários (anti-CD4, anti-CD8, anti-GFAP,

anti-Iba-1, anti-occludina, anti-zonula occludens-1 e anti-claudina-5, anti-IL1b, anti-IL-6, anti-IL10, anti-TNFa) e secundários. O complexo de reação será revelado por meio de solução de 3-3'diaminobenzidina 0,06% em PBS e solução de H₂O₂ 10%. Os cortes permanecerão neste meio até o aparecimento do precipitado marrom. Depois da revelação, os cortes serão contra-corados com hematoxilina-eosina e posteriormente cobertos com Entellan (Merck) e lamínulas.

4.14. Imunocitoquímica

As culturas celulares serão fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min, seguido de metanol 100% por 3-5 minutos. Após, serão lavadas com PBS-T (tampão fosfato salino com 0,02% de triton x-100) duas vezes por 5 minutos. Será utilizada a imunocitoquímica para avaliar a pureza das culturas celulares e também o estado de ativação microglial e astrocitária. A incubação com os anticorpos primários (GFAP para astrócitos e Iba-1 para micróglia) terá duração de 18-24 horas. Em sequência, as lâminas serão lavadas em PBS-T sendo, logo após, incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes por 1h. Após serão incubadas com DAPI por 30 minutos, para marcação nuclear. As lâminas serão montadas com meio FluorSave (Merck) e cobertas com lamínulas. As lâminas serão observadas em microscópio de fluorescência e as imagens obtidas serão fotografadas. A morfologia celular será avaliada e a ramificação das células gliais será analisada (GZIELO et al., 2019).

4.15. Análise metagenômica da microbiota intestinal

As fezes dos animais serão coletadas juntamente com os demais tecidos e armazenadas a -20°C para posterior processamento. Para a análise metagenômica, o DNA será extraído das amostras e será realizado sequenciamento de nova geração conforme descrito por Pinheiro de Oliveira e colaboradores (PINHEIRO DE OLIVEIRA et al., 2016).

4.16. Determinação de LPS por LC-QTOF.

A quantificação das concentrações de LPS em amostras de plasma será realizada adaptando a metodologia propostas por Pais de Barros *et al.* 2015. Assim, alíquotas de 150 µL de plasma serão hidrolisadas pela adição de 75 µL de NaCl 150 mM e 300 µL de HCl 8 mol, seguido pelo condicionamento a 90 °C por 4 horas. A

extração do ácido 3-hidroxitetradecanoico, produto da hidrólise do LPS, será realizada pela adição de 4 mL de hexano. A fração coletada será evaporada sob fluxo de nitrogênio e ressuspensa em 20 µL de solução contendo água e acetonitrila (4:1; v/v). Alíquotas de 10 µL da amostra purificada serão injetadas em um sistema constituído por um cromatógrafo líquido Prominence UFLC (Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas binárias (LC-30AD), um forno para coluna (CTO-20A), um detector de absorvância de arranjo de diodos (SPD-M20A) e um injetor automático (SIL-20A). O sistema de LC é integrado ao analisador QTOF (do inglês, *quadrupole-time-of-flight*) em posição ortogonal e em série para alta resolução e precisão de massas, marca Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII. Os dados serão processados utilizando os *softwares* Data Analysis e HyStar™ (Bruker Corporation, Alemanha). As análises serão realizadas com ionização por *eletrospray* no modo negativo (ESI^- , $[\text{M-H}]^-$), empregando os seguintes parâmetros otimizados: tensão capilar de 5000 V; gás nebulizador a 3 bar; fluxo de gás de secagem de 6 L / h; temperatura de secagem de 200 ° C; faixa de massa m/z de 200 a 300 adquirida com uma taxa de espectro de 5 Hz; e os íons monocarregados m/z 243.1944 (pico monoisotópico; C_{12}) e m/z 244.1980 (C_{13}) serão monitorados para a quantificação. O equipamento será calibrado diariamente com uma solução de formato de sódio (10 mM) com um erro de massas inferior a 5 ppm.

4.17. Análise Estatística

Com base nos resultados das análises, serão calculadas as médias e os desvios padrões para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. A normalidade dos dados será avaliada pelo teste de KolmogorovSmirnov. Em caso de dados paramétricos, será utilizada ANOVA e pós-teste correspondente. Caso os dados sejam não-paramétricos será utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste. As diferenças serão consideradas significativas quando a análise estatística apresentar $p < 0,05$. Todas as análises serão feitas utilizando-se o pacote estatístico SPSS versão 18.0 (Statistical Packages for the Social Sciences).

5. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Durante o período da dieta, os animais permanecerão no biotério da UFCSPA. Os testes comportamentais serão realizados nas salas de procedimento do biotério e a eutanásia dos animais será realizada no Laboratório de Fisiologia da UFCSPA. As dosagens metabólicas sistêmicas e a técnica de Western blot serão realizadas no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica da UFCSPA. A técnica de imuno-histoquímica será realizada no Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA. A RT-qPCR e o sequenciamento de nova geração serão realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. As dosagens de neurotransmissores e ácidos graxos de cadeia curta serão realizadas na Central Analítica da UFCSPA. Em conjunto, todos os laboratórios envolvidos dispõem dos equipamentos e da infraestrutura necessária para a realização das técnicas propostas neste estudo.

6. ORÇAMENTO

Material de consumo (CUSTEIO)	
Dieta de cafeteria	R\$ 3.000,00
Reagentes diversos	R\$ 15.000,00
Anticorpos	R\$ 15.000,00
Kits de ELISA	R\$ 15.000,00
Material descartável	R\$ 2.000,00
TOTAL	R\$ 50.000,00

*Reagentes: Tris, PMSF, temed, APS, glicina, metanol, SDS, glicerol, albumina, fluoromount G, Entellan, etc

*Material descartável inclui vidraria, tubos, luvas, ponteiros, lâminas histológicas, e demais materiais de plástico ou vidro.

O projeto será submetido aos editais de fomento regionais e nacionais no ano de 2021 para obtenção de recursos financeiros.

7. CRONOGRAMA

As atividades propostas neste projeto serão desenvolvidas no período de 48 meses, tendo seu início previsto após aprovação do CEUA-UFSPA, conforme tabela abaixo:

	1º ano	2º ano	3º ano	4º ano
Período da dieta	X	X		
Testes comportamentais	X	X		
Obtenção de amostras		X		
Realização dos ensaios <i>in vitro</i>		X		
Dosagens plasmáticas		X	X	
Análise de expressão proteica		X	X	
Análise de expressão gênica		X	X	
Análises histológicas		X	X	
Análise da microbiota intestinal		X	X	
Análise de neurotransmissores		X	X	
Apresentação de resultados preliminares		X	X	X
Redação e defesa da tese				X

REFERÊNCIAS

- ABARCA-GÓMEZ, L. et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627–2642, dez. 2017.
- AMODEO, D. A. et al. Differences in BTBR T+ tf/J and C57BL/6J mice on probabilistic reversal learning and stereotyped behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 1, p. 64–72, fev. 2012.
- ARCEGO, D. M. et al. Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2740–2753, abr. 2018.
- ARGENZIANO, M. et al. The Endocannabinoid System in Pediatric Inflammatory and Immune Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5875, 23 nov. 2019.
- ATIVIE, F. et al. Cannabinoid 1 Receptor Signaling on Hippocampal GABAergic Neurons Influences Microglial Activity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 295, 28 ago. 2018.
- BARANOWSKI, B. J.; BOTT, K. N.; MACPHERSON, R. E. K. Evaluation of neuropathological effects of a high-fat high-sucrose diet in middle-aged male C57BL6/J mice. **Physiological Reports**, v. 6, n. 11, p. e13729, jun. 2018.
- BARICHELLO, T. et al. Cannabidiol reduces host immune response and prevents cognitive impairments in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 697, n. 1–3, p. 158–164, dez. 2012.
- BERGDOLT, L.; DUNAEVSKY, A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 175, p. 1–19, abr. 2019.
- BIEDERMANN, S. V. et al. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, 21 dez. 2017.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, maio 2007.
- BLÜHER, M. **Obesity: global epidemiology and pathogenesis** *Nature Reviews Endocrinology* Nature Publishing Group, , 1 maio 2019.
- BONDY, S. C. **Aspects of the immune system that impact brain function** *Journal of Neuroimmunology* Elsevier B.V., , 15 mar. 2020.
- BOYKO, M. et al. The influence of aging on poststroke depression using a rat model via middle cerebral artery occlusion. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 847–859, 13 dez. 2013.

BROWN, A. S. et al. Elevated maternal C-reactive protein and autism in a national birth cohort. **Molecular Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 259–264, fev. 2014.

BROWN, J. et al. Lifestyle interventions for the treatment of women with gestational diabetes. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 4 maio 2017.

BRUCE-KELLER, A. J.; KELLER, J. N.; MORRISON, C. D. Obesity and vulnerability of the CNS. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 5, p. 395–400, maio 2009.

BUCKLEY, P. F. Neuroinflammation and Schizophrenia. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 8, p. 72, ago. 2019.

BURNS, T. M. et al. Developmental Regulation of Cytokine Expression in the Mouse Brain. **Growth Factors**, v. 9, n. 4, p. 253–258, jan. 1993.

BUSQUETS GARCIA, A. et al. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. **F1000Research**, v. 5, p. 990, 24 maio 2016.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 119–127, out. 2016.

CANETTA, S. et al. Elevated Maternal C-Reactive Protein and Increased Risk of Schizophrenia in a National Birth Cohort. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 9, p. 960–968, set. 2014.

CASSOL-JR, O. J. et al. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. **Brain Research**, v. 1348, p. 128–138, ago. 2010.

CASTRO, H. et al. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 3, p. 430–437, mar. 2015.

CENSIN, J. C. et al. Causal relationships between obesity and the leading causes of death in women and men. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 10, 2019.

CHANG, Y.-H.; LEE, S. T.; LIN, W.-W. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: Involvement of eicosanoids. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 715–723, 2001.

CHANG, Y.; COLE, T. B.; COSTA, L. G. Behavioral Phenotyping for Autism Spectrum Disorders in Mice. **Current Protocols in Toxicology**, v. 72, n. 1, maio 2017.

CHOUINARD, F. et al. The Endocannabinoid 2-Arachidonoyl-Glycerol Activates Human Neutrophils: Critical Role of Its Hydrolysis and De Novo Leukotriene B₄ Biosynthesis. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 3188–3196, 1 mar. 2011.

CHYE, Y. et al. The Endocannabinoid System and Cannabidiol's Promise for the Treatment of Substance Use Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 63, 19 fev. 2019.

CONWAY, F.; BROWN, A. S. Maternal Immune Activation and Related Factors in the Risk of Offspring Psychiatric Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 430, 28 jun. 2019.

COUSSENS, N. P. et al. Assay Guidance Manual: Quantitative Biology and Pharmacology in Preclinical Drug Discovery. **Clinical and Translational Science**, 11(5), 461-470. 2018.

COVEY, D. P. et al. Endocannabinoid modulation of dopamine neurotransmission. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 52–61, set. 2017.

CRIVELARO DO NASCIMENTO, G. et al. Cannabidiol increases the nociceptive threshold in a preclinical model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 163, p. 107808, fev. 2020.

CRUNFLI, F. et al. Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist ACEA Improves Cognitive Deficit on STZInduced Neurotoxicity Through Apoptosis Pathway and NO Modulation. **Neurotoxicity Research**, v. 35, n. 3, p. 516–529, abr. 2019.

CUNHA, A. et al. “Comfort-foods” chronic intake has different behavioral and neurobiological effects in male rats exposed or not to early-life stress. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 18–24, fev. 2020.

DE CARVALHO LIMA, C. N. et al. Maternal Immune Activation as a Risk Factor for Schizophrenia: Evidence From Preclinical and Clinical Studies. In: TEIXEIRA, A. L.; MACEDO, D.; BAUNE, B. T. (Eds.). . **Perinatal Inflammation and Adult Psychopathology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 84p. 129–154.

DE LUIS, D. et al. Genetic variation in the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) and their influence on weight loss and insulin resistance under a high monounsaturated fat hypocaloric diet. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 3, p. 235– 239, maio 2013.

DE MACEDO, I. C.; DE FREITAS, J. S.; DA SILVA TORRES, I. L. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

DONVITO, G. et al. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 52–79, jan. 2018.

DORIS, J. M. et al. Genetic polymorphisms of the endocannabinoid system in obesity and diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 382–387, fev. 2019.

DURNIN, J. V. G. A. Energy Metabolism During Pregnancy. In: COWETT, R. M. (Ed.). . **Principles of Perinatal—Neonatal Metabolism**. New York, NY: Springer New York, 1998. p. 309–318.

DUTHEIL, S. et al. High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1874–1887, jun. 2016.

EDLOW, A. G. Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring: Maternal obesity and offspring neurodevelopmental disorders. **Prenatal Diagnosis**, v. 37, n. 1, p. 95–110, jan. 2017.

EISSA, N. et al. Role of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder and the Emergence of Brain Histaminergic System. Lessons Also for BPSD? **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 886, 16 jun. 2020.

ENGIN, A. Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. In: ENGIN, A. B.; ENGIN, A. (Eds.). **Obesity and Lipotoxicity**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 960p. 571–606.

FAGHERAZZI, E. V. et al. Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology**, v. 219, n. 4, p. 1133–1140, fev. 2012.

FEYISSA, D. D. et al. Individual Differences in Male Rats in a Behavioral Test Battery: A Multivariate Statistical Approach. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, 17 fev. 2017.

FISCHER, N. Infection-induced epigenetic changes and their impact on the pathogenesis of diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, n. 2, p. 127–130, abr. 2020.

FUSTER, J. J. et al. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1786–1807, 27 maio 2016.

GARCÍA, C. et al. Cannabinoid-dopamine interactions in the physiology and pathophysiology of the basal ganglia: Cannabinoid-dopamine interactions in basal ganglia. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 13, p. 2069–2079, jul. 2016.

GARRIDO ZINN, C. et al. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 33, p. E4914–E4919, 16 ago. 2016.

GLASTRAS, S. J. et al. Maternal obesity increases the risk of metabolic disease and impacts renal health in offspring. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. BSR20180050, 27 abr. 2018.

GRAHAM, A. M. et al. Maternal Systemic Interleukin-6 During Pregnancy Is Associated With Newborn Amygdala Phenotypes and Subsequent Behavior at 2 Years of Age. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 2, p. 109–119, jan. 2018.

GRECO, E. A. et al. Epigenetic Modifications Induced by Nutrients in Early Life Phases: Gender Differences in Metabolic Alteration in Adulthood. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 795, 11 set. 2019.

GRILLO, C. A. et al. **Insulin resistance and hippocampal dysfunction: Disentangling peripheral and brain causes from consequences** *Experimental Neurology* Academic Press Inc., , 1 ago. 2019.

GZIELO, K. et al. The Impact of the Ketogenic Diet on Glial Cells Morphology. A Quantitative Morphological Analysis. **Neuroscience**, v. 413, p. 239–251, 2019.

HANEY, M. et al. Oral Cannabidiol does not Alter the Subjective, Reinforcing or Cardiovascular Effects of Smoked Cannabis. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 8, p. 1974–1982, jul. 2016.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673–689, jul. 2015.

IFFLAND, K.; GROTENHERMEN, F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 2, n. 1, p. 139–154, jan. 2017.

KATHMANN, M. et al. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 372, n. 5, p. 354–361, fev. 2006.

KENTNER, A. C. et al. Maternal immune activation: reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 2, p. 245–258, jan. 2019.

KIRKHAM, T. C. Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight: **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 5–6, p. 297–313, set. 2005.

KLEIN, T. W.; CABRAL, G. A. Cannabinoid-Induced Immune Suppression and Modulation of AntigenPresenting Cells. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 50–64, mar. 2006.

KOEKKOEK, L. L.; MUL, J. D.; LA FLEUR, S. E. Glucose-Sensing in the Reward System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 716, 19 dez. 2017.

KÖFALVI, A. et al. Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. **BMC Biology**, v. 18, n. 1, p. 9, dez. 2020.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 22, 22 dez. 2008.

KONG, L. et al. Relationship of prenatal maternal obesity and diabetes to offspring neurodevelopmental and psychiatric disorders: a narrative review. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. 10, p. 1981–2000, out. 2020.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, fev. 2007.

KOWASH, H. M. et al. Poly(I:C) source, molecular weight and endotoxin contamination affect dam and prenatal outcomes, implications for models of maternal immune activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 82, p. 160–166, nov. 2019.

KRUK-SLOMKA, M. et al. Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes—a Short Review. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8332–8347, dez. 2017.

KWON, E. J.; KIM, Y. J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 60, n. 6, p. 506, 2017.

LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB₁ receptor: Negative allosteric modulation of CB₁ by cannabidiol. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 20, p. 4790–4805, out. 2015.

LASSELIN, J.; ALVAREZ-SALAS, E.; GRIGOLEIT, J.-S. Well-being and immune response: a multi-system perspective. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 29, p. 34–41, ago. 2016.

LEE, H.-S. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9492–9507, 17 nov. 2015.

LEE, Y. H. et al. Maternal Bacterial Infection During Pregnancy and Offspring Risk of Psychotic Disorders: Variation by Severity of Infection and Offspring Sex. **American Journal of Psychiatry**, v. 177, n. 1, p. 66–75, 1 jan. 2020.

LEIGH, S.-J.; KENDIG, M. D.; MORRIS, M. J. Palatable Western-style Cafeteria Diet as a Reliable Method for Modeling Diet-induced Obesity in Rodents. **Journal of Visualized Experiments**, n. 153, p. 60262, 1 nov. 2019.

LI, M. et al. The Association of Maternal Obesity and Diabetes With Autism and Other Developmental Disabilities. **PEDIATRICS**, v. 137, n. 2, p. e20152206–e20152206, 1 fev. 2016.

LINGE, R. et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT_{1A} receptors. **Neuropharmacology**, v. 103, p. 16–26, abr. 2016.

LOMBARDO, M. V. et al. Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 4, p. 1001–1013, abr. 2018.

LOWENSOHN, R. I.; STADLER, D. D.; NAZE, C. Current Concepts of Maternal Nutrition. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 71, n. 7, p. 413–426, jul. 2016.

MA, Y. et al. Higher risk of dementia in English older individuals who are overweight or obese. **International Journal of Epidemiology**, v. 49, n. 4, p. 1353–1365, 1 ago. 2020.

MACHADO, C.; MONTEIRO, S.; OLIVEIRA, M. J. Impact of overweight and obesity on pregnancy outcomes in women with gestational diabetes – results from a retrospective multicenter study. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 25 set. 2019.

MARCINIAK, A. et al. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 133–138, abr. 2017.

MARTIN, A. A.; DAVIDSON, T. L. Human cognitive function and the obesogenic environment. **Physiology & Behavior**, v. 136, p. 185–193, set. 2014.

MCLAUGHLIN, T. et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 5–13, 3 jan. 2017.

MIRANDA FURTADO, C. L. Epigenetic Markers in Human Diseases. **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 6, n. 2, p. 119–121, 12 nov. 2019.

MOAZZAMI, K. et al. Independent and Joint Association of Obesity and Metabolic Syndrome with Depression and Inflammation. **Health Psychology**, v. 38, n. 7, p. 586–595, 1 jul. 2019.

MOHAMMED, N. et al. Neuroprotective Effects of Cannabidiol in Hypoxic Ischemic Insult. The Therapeutic Window in Newborn Mice. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 1, p. 102–108, 11 jan. 2017.

MONTEIRO, C. A. et al. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system: Ultra-processed products: global dominance. **Obesity Reviews**, v. 14, p. 21–28, nov. 2013.

MOORE, B. J. The Cafeteria Diet—An Inappropriate Tool for Studies of Thermogenesis. **The Journal of Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 227–231, 1 fev. 1987.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA Methylation and Its Basic Function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23–38, jan. 2013.

MOTULSKY, H. & CHRISTOPOULOS, A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting. **Oxford: Oxford Univ. Press**. 2010.

NESSE, R. M.; BERRIDGE, K. C. Psychoactive Drug Use in Evolutionary Perspective. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 63–66, 3 out. 1997.

NORONHA, S. S. R. et al. Association of high-fat diet with neuroinflammation, anxiety-like defensive behavioral responses, and altered thermoregulatory responses in male rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 500–511, 1 ago. 2019.

NOWLAND, M. H. et al. Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawley rats. **Comp Med**. Apr;61(2):138-44, 2011.

OLIVEIRA, S. et al. Zinc Supplementation Decreases Obesity-Related Neuroinflammation and Improves Metabolic Function and Memory in Rats. **Obesity**, v. 29, n. 1, p. 116–124, jan. 2021.

O'LOUGHLIN, E. et al. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 212, dez. 2017.

OSBORNE, A. L. et al. Improved Social Interaction, Recognition and Working Memory with Cannabidiol Treatment in a Prenatal Infection (poly I:C) Rat Model. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 7, p. 1447–1457, jun. 2017.

OTTAIANO, A. et al. Obesity and Cancer: Biological Links and Treatment Implications. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 3, p. 231–238, 19 fev. 2018.

PACHECO, S. M. et al. Glioprotective Effects of Lingonberry Extract Against Altered Cellular Viability, Acetylcholinesterase Activity, and Oxidative Stress in Lipopolysaccharide-Treated Astrocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 5, p. 1107–1121, jul. 2018.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 1985.

PETRAKIS, D. et al. Obesity-a risk factor for increased COVID-19 prevalence, severity and lethality (Review). **Molecular Medicine Reports**, 5 maio 2020.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, F. et al. Phenylketonuria and Gut Microbiota: A Controlled Study Based on Next-Generation Sequencing. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157513, 23 jun. 2016.

PRICKETT, C.; BRENNAN, L.; STOLWYK, R. Examining the relationship between obesity and cognitive function: A systematic literature review. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 9, n. 2, p. 93–113, mar. 2015.

PRYCE, G. et al. Neuroprotection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Progressive Multiple Sclerosis by Cannabis-Based Cannabinoids. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 281–292, jun. 2015.

RAMOS-LOPEZ, O. et al. Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. **Chronobiology International**, v. 35, n. 7, p. 969–981, 3 jul. 2018.

RANA, A.; MUSTO, A. E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 144, dez. 2018.

RASMUSSEN, J. M. et al. Maternal Interleukin-6 concentration during pregnancy is associated with variation in frontolimbic white matter and cognitive development in early life. **NeuroImage**, v. 185, p. 825–835, jan. 2019.

REARDON, T. et al. Rapid transformation of food systems in developing regions: Highlighting the role of agricultural research & innovations. **Agricultural Systems**, v. 172, p. 47–59, jun. 2019.

REZENDE, L. F. M. et al. Adults at high-risk of severe coronavirus disease-2019 (Covid-19) in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, p. 50, 18 jun. 2020.

ROBERTSON, S. H.; RASMUSSEN, E. B. Effects of a cafeteria diet on delay discounting in adolescent and adult rats: Alterations on dopaminergic sensitivity. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 1419–1429, nov. 2017.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M. et al. Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55840–55862, 23 ago. 2016.

ROHLEDER, C. et al. Cannabidiol as a Potential New Type of an Antipsychotic. A Critical Review of the Evidence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 8 nov. 2016.

ROSSI, F. et al. Cannabinoid Receptor 2 as Antiobesity Target: Inflammation, Fat Storage, and Browning Modulation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 9, p. 3469–3478, 1 set. 2016.

RULLMANN, M. et al. Adiposity Related Brain Plasticity Induced by Bariatric Surgery. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 13, 27 ago. 2019.

SALES, A. J. et al. Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, p. 255–261, ago. 2018.

SAMBLAS, M.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **Epigenetics**, v. 14, n. 5, p. 421–444, 4 maio 2019.

SANTOS, J. H. D. DIETA DE CAFETERIA E SEU IMPACTO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PREDITIVOS DA SÍNDROME METABÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL. p. 30, 2016.

SARDINHA, J. et al. Experimental Cannabinoid 2 Receptor-Mediated Immune Modulation in Sepsis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

SCHIAVON, A. P. et al. Protective Effects of Cannabidiol Against Hippocampal Cell Death and Cognitive Impairment Induced by Bilateral Common Carotid Artery Occlusion in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 4, p. 307–316, nov. 2014.

SCHRADER, A. J. et al. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (*Rattus norvegicus*). **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207804, 26 nov. 2018.

SCHRÖDER, N. et al. Cannabidiol and Neuroprotection: Evidence from Preclinical Studies. In: **Handbook of Cannabis and Related Pathologies**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 802–812.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 3, p. 461–471, set. 1976.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxietylike behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, 6 fev. 2015.

SHANNON, S. Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. **The Permanente Journal**, 2019.

SHENGLONG ZOU; UJENDRA KUMAR. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, 13 mar. 2018.

SIMÕES, L. R. et al. Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 71–83, maio 2018.

SINISCALCO, D. et al. The in vitro GcMAF effects on endocannabinoid system transcriptionomics, receptor formation, and cell activity of autism-derived macrophages. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 78, 2014.

SIPE, J. C. Reduced endocannabinoid immune modulation by a common cannabinoid 2 (CB2) receptor gene polymorphism: possible risk for autoimmune disorders. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 1, p. 231–238, 13 abr. 2005.

SKELLEY, J. W. et al. Use of cannabidiol in anxiety and anxiety-related disorders. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 60, n. 1, p. 253–261, jan. 2020.

SOUZA, D. G. et al. Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.

STONE, L. Radiotherapy induces epigenetic changes. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 5, p. 241–241, maio 2016.

STOTT, C. G. et al. The Proposed Multimodal Mechanism of Action of Cannabidiol (CBD) in Epilepsy: Modulation of Intracellular Calcium and Adenosine-mediated Signalling. **Epilepsy & Behavior**, v. 101, p. 106734, dez. 2019.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, jan. 2000.

STRAIKER, A. et al. Cannabidiol Inhibits Endocannabinoid Signaling in Autaptic Hippocampal Neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 94, n. 1, p. 743–748, jul. 2018.

SWINBURN, B. A. et al. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. **The Lancet**, v. 393, n. 10173, p. 791–846, fev. 2019.

TANAKA, M. et al. Anti-Inflammatory Effects by Pharmacological Inhibition or Knockdown of Fatty Acid Amide Hydrolase in BV2 Microglial Cells. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 491, 22 maio 2019.

TAYLOR, L. et al. A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. **CNS Drugs**, v. 32, n. 11, p. 1053–1067, nov. 2018.

THAM, M. et al. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidioldimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors: CBD and CBD-

DMH at the cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1455–1469, maio 2019.

THOMAS, A. et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB₁ and CB₂ receptor agonists *in vitro*: Cannabinoid antagonism by cannabidiol. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 613–623, mar. 2007.

TOPLAK, H. et al. „Diabesity“ – Adipositas und Typ-2-Diabetes (Update 2019). **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 131, n. S1, p. 71–76, maio 2019.

VIGITEL. **Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico**. [s.l: s.n.].

VOET, S. et al. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, jun. 2019.

WANG, X. et al. Oral probiotic administration during pregnancy prevents autism-related behaviors in offspring induced by maternal immune activation via anti-inflammation in mice. **Autism Research**, v. 12, n. 4, p. 576–588, abr. 2019.

WATANABE, M. et al. Obesity and SARS-COV -2: A population to safeguard. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 11 jun. 2020.

WENZEL, J. M.; CHEER, J. F. Endocannabinoid Regulation of Reward and Reinforcement through Interaction with Dopamine and Endogenous Opioid Signaling. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 103–115, jan. 2018.

WIDMANN, M.; NIESS, A. M.; MUNZ, B. Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle. **Sports Medicine**, v. 49, n. 4, p. 509–523, abr. 2019.

WILLIAMS, L. M. **Hypothalamic dysfunction in obesity**. Proceedings of the Nutrition Society. **Anais...Proc Nutr Soc**, nov. 2012

WILLIAMSON, R.; MCNEILLY, A.; SUTHERLAND, C. Insulin resistance in the brain: An old-age or newage problem? **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 6, p. 737–745, set. 2012.

YIP, P. K. et al. Rapid isolation and culture of primary microglia from adult mouse spinal cord. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 183, n. 2, p. 223–237, 2009.

ZHANG, H. et al. Antagonism of Cannabinoid Receptor 1 Attenuates the Anti-Inflammatory Effects of Electroacupuncture in a Rodent Model of Migraine. **Acupuncture in Medicine**, v. 34, n. 6, p. 463–470, dez. 2016.

ZOU, J. et al. Methods to Measure Olfactory Behavior in Mice. **Current Protocols in Toxicology**, v. 63, n. 1, fev. 2015

ZOU, Z. et al. Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Suppresses LPS-Induced Inhibition of A-Type Potassium Channel Currents in Caudate Nucleus Neurons Through CB1 Receptor. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 59, n. 4, p. 493–503, ago. 2016.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO
ALEGRE – UFCSPA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Flávia Pires Peña

**Desenvolvimento e caracterização de
uma formulação nanotecnológica
inovadora de Eudragit® L30-D55
contendo a associação da proteína S
do SARS-CoV-2 e do peptídeo CpG
para o tratamento da COVID-19**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2020**

Flávia Pires Peña

**Desenvolvimento e caracterização de
uma formulação nanotecnológica
inovadora de Eudragit® L30-D55
contendo a associação da proteína S
do SARS-CoV-2 e do peptídeo CpG
para o tratamento da COVID-19**

Projeto de Tese submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a o curso de
Doutorado acadêmico.

Orientador(a): Dr(a). Tanira Alessandra Silveira Aguirre
Coorientador(a): Dr(a). Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

**Porto Alegre
2020**

RESUMO

Coronaviridae é uma ampla família de coronavírus conhecidos até hoje capazes de causar diferentes doenças em humanos e animais. O SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) pertence a essa família, sendo transmitido principalmente por gotículas respiratórias e apresentando como sintomas de sua infecção são tosse seca, dificuldade de respirar, febre, dor de cabeça, dentre outras. Esses vírus possuem em sua superfície a proteína S, que lhes possibilita a entrada nas células hospedeiras. A nanotecnologia para aplicação em vacinas como uma forma de prevenção ou tratamento de doenças é uma alternativa que vem sendo utilizada. Essas nanovacinas induzem a resposta imunológica, entregam moléculas a tecidos específicos, protegem essas moléculas da degradação enzimática, além de que as nanopartículas de uma forma geral possuem liberação controlada, o que prolonga a meia-vida das vacinas, são biocompatíveis e biodegradáveis. Diferentes tipos de nanopartículas podem ser empregados em nanovacinas para entrega de moléculas, e as nanopartículas poliméricas são um desses sistemas nanoestruturados amplamente utilizados atualmente. Um exemplo de polímero que pode ser empregado para o desenvolvimento desses sistemas carreadores de moléculas é o Eudragit[®] L30-D55. Esse polímero é uma dispersão aquosa de polímeros aniônicos, solúvel em pH acima de 5,5. Para contornar problemas como a utilização de solventes orgânicos que gera desnaturação de antígenos, riscos ambientais, altos custos e bioincompatibilidade, o presente trabalho objetiva desenvolver e caracterizar suspensões de nanopartículas de Eudragit[®] L30-D55 sem a utilização de solvente orgânico, a fim de encapsular a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG.

Palavras-chave: Nanocápsulas, nanovacinas, proteína S, peptídeo CpG, Eudragit[®] L30-D55

ABSTRACT

Coronaviridae is a large family of coronavirus known to date capable of causing different diseases in humans and animals. SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) belongs to this family, being transmitted primarily via respiratory droplets, and presenting as symptoms dry cough, difficulty in breathing, fever, headache, and others. These viruses have an S protein on their surface, which allows them to enter host cells. The nanotechnology for application in vaccines as a form of prevention or a treatment of diseases is an alternative that has been used. These nanovaccines induce the immune response, deliver molecules to specific tissues, protect these molecules from enzymatic degradation, in addition to, in general, the nanoparticles having controlled release, which prolongs the half-life of vaccines, are biocompatible and biodegradable. Different types of nanoparticles can be used in nanovaccines to deliver molecules, and polymeric nanoparticles are one of those nanostructured systems widely used today. An example of a polymer that can be used for the development of these molecule carrier systems is Eudragit[®] L30-D55. This polymer is an aqueous dispersion of anionic polymers, soluble at pH above 5.5. To avoid problems like the use of organic solvents that cause denaturation of antigens, environmental risks, high costs, and bioincompatibility, this study aims at developing and characterizing suspensions of Eudragit[®] L30-D55 nanoparticles without organic solvent, to encapsulate the SARS-CoV-2 S protein and CpG peptide.

Keywords: Nanocapsules, nanovaccines, S protein, CpG peptide, Eudragit[®] L30-D55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de ligação e infecção do coronavírus às células-alvo.....	13
Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	14
Figura 3. Representação esquemática de sistemas nanoestruturados para entrega de moléculas em vacinas.....	19
Figura 4. Estrutura química do Eudragit® L30-D55.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de formulações nanotecnológica estudadas para aplicações em vacinas em diferentes doenças e suas fases de estudos.....	21
Tabela 2. Parâmetros utilizados para a metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. HIPÓTESES.....	9
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivo Geral.....	9
3.2. Objetivos Específicos.....	10
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
4.1. Coronavírus e Proteína S.....	10
4.2. Nanotecnologia.....	13
4.3. Vacinas e Nanovacinas.....	14
4.4. Eudragit®	23
5. MÉTODOS.....	25
5.1. Desenvolvimento das suspensões de nanopartículas.....	25
5.2. Caracterização das suspensões de nanopartículas.....	26
5.3. Estudos <i>in vitro</i>	28
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	29
8. ORÇAMENTO.....	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. Introdução

Os coronavírus são amplamente conhecidos por causarem doenças infecciosas em humanos e em animais. Diversos são os vírus da família *Coronaviridae* conhecidos até hoje, porém o SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave), o MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) e o SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) ganharam destaque nos últimos anos tendo em vista seu grande potencial de acometer o ser humano e causar desordens mais graves. Esses vírus possuem a capacidade de se replicar no trato respiratório inferior e causar pneumonia, que pode ser fatal dependendo do caso (RABI *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020). A infecção causada pelo SARS-CoV-2 tornou-se uma pandemia decretada pela Organização Mundial da Saúde em março de 2020, mas foi relatada pela primeira vez em Wuhan, na China, em dezembro de 2019 e desde então, vem se espalhando por todos os continentes devido a sua alta taxa de contaminação, ausência de tratamento e vacina preventiva (FLORINDO *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 é transmitido principalmente por gotículas respiratórias e os sintomas associados geralmente são tosse seca, dificuldade de respirar, hiposmia, febre, dores musculares e /ou articulares, dor de cabeça / tontura, náusea, diarreia e tosse com sangue (GUAN *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020). São vírus de RNA, que possuem a proteína pico (S) expressa na superfície, o que lhes confere a aparência característica de coroa dessa família (TUROŇOVÁ *et al.*, 2020). Essa proteína é a responsável pela ligação com receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e consequente infecção viral no hospedeiro (FLORINDO *et al.*, 2020; RABI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020).

Ainda não existe um tratamento ou uma vacina aprovada para Covid-19, mas pesquisas científicas anteriores serviram para embasar e direcionar o desenvolvimento de vacinas de forma mais ágil. O desenvolvimento de alternativas utilizando os sistemas nanoestruturados vem sendo muito explorados nessa área de promoção de saúde através de vacinas, que atuam eliminando infecções ou evitando que novas infecções ou doenças se propaguem (BHARDWAJ *et al.*, 2020; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). As nanovacinas oferecem diversas vantagens potenciais, destacando-se seu uso como adjuvante, indução da resposta imunológica inata e adaptativa, proteção da molécula frente a degradação

enzimática, atuar na melhora da estabilidade das formulações e entregar peptídeos ou proteínas a tecidos específicos (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

Diferentes tipos de nanopartículas podem ser empregados em nanovacinas para entrega de moléculas, como: lipossomas, virossomas, vesículas multilamelares reticuladas entre camadas (ICMVs), partículas semelhantes a vírus (VLPs), complexos imunoestimulatórios (ISCOMs), nanoemulsões, nanopartículas inorgânicas e nanopartículas poliméricas. No entanto, as partículas poliméricas são as formulações que mais têm se destacado devido sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, em especial as nanopartículas de PLGA, poli (D, L ácido láctico-co-glicólico) ou PLA, poli (ácido láctico) (BHARDWAJ *et al.*, 2020; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). Vacinas contendo nanopartículas de PLGA e PLA já foram utilizadas com antígenos do vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011), malária por *Plasmodium vivax* (MOON *et al.*, 2012), tétano (DIWAN; TAFAGHODI; SAMUEL, 2002), *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001) e ovalbumina (DEMENTO *et al.*, 2012).

Alternativas estão sendo testadas para o aprimoramento do uso de nanopartículas poliméricas em vacinas para a entrega de moléculas e a indução de da resposta imunológica. Estudos demonstraram que a associação de nanopartículas poliméricas com o peptídeo CpG aumentou a ativação de células dendríticas, gerou imunidade celular duradoura (DE TITTA *et al.*, 2013) e resultou em uma forte atividade de linfócito T citotóxico específico para o antígeno (BEAUDETTE *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2008). Isso pois o CpG é um oligonucleotídeo que atua como agonista do receptor Toll-Like 9 (TLR-9), promovendo respostas de células Th1 (BEAUDETTE *et al.*, 2009; DE TITTA *et al.*, 2013). Dependendo do seu tipo, o CpG pode atuar estimulando as células dendríticas (CD) a secretarem IFN- α , ou induzir as células B e CDs a amadurecer e segregar citocinas como interleucinas ou TNF- α (DE TITTA *et al.*, 2013).

O polímero Eudragit® L30-D55 é uma dispersão aquosa de polímeros aniônicos, contendo o ácido metacrílico como grupo funcional, que é solúvel em pH acima de 5,5. Esse biomaterial, possui resistência aos fluidos estomacais e solubilidade nos fluidos intestinais, logo é muito utilizado como polímero de revestimento entérico em *pellets*, em micro ou

nanopartículas (GASS *et al.*, 2005; GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017; RAHMAN; ALI, 2008).

Um grande desafio das técnicas de obtenção de nanopartículas com esses polímeros, é a utilização de solventes orgânicos, que pode gerar a desnaturação de antígenos, riscos ambientais, altos custos com o aumento de escala industrial além bioincompatibilidade (DATE *et al.*, 2010). Muitos avanços já foram feitos para a utilização de nanopartículas de Eudragit[®], como a utilização do Labrasol[®] como agente solubilizante e estabilizador dos polímeros, porém em sua grande maioria, ainda são utilizados solventes orgânicos como acetona, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e etanol (DATE *et al.*, 2010; PINTO REIS *et al.*, 2006). Tendo em vista a escassez de alternativas mais sustentáveis e biocompatíveis disponíveis atualmente quanto ao desenvolvimento de nanopartículas, o presente trabalho visa desenvolver suspensões de nanopartículas de Eudragit[®] L30-D55 sem a utilização de solvente orgânico, a fim de encapsular a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG.

2. Hipóteses

Hipótese nula: O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados visando o encapsulamento da proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG, não será possível utilizando o polímero Eudragit[®] L30-D55, sem a presença de solventes orgânicos, pelo método de nanoprecipitação.

Hipótese alternativa: O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados utilizando o polímero Eudragit[®] L30-D55, visando o encapsulamento da proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG, sem a presença de solventes orgânicos, será possível pelo método de nanoprecipitação.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento e caracterização físico-química de suspensões de nanopartículas inovadoras de Eudragit[®] L30-D55 sem a utilização de solvente orgânico contendo a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo CpG.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Desenvolver suspensões de nanopartículas com o polímero Eudragit® L30-D55, sem a utilização de solventes orgânicos pelo método de nanoprecipitação;
- b) Caracterizar as suspensões de nanopartículas desenvolvidas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia;
- c) Encapsular a proteína S nas suspensões de nanopartículas desenvolvidas e caracterizá-las quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia;
- d) Incorporar o peptídeo CpG (citosina-guanina fosfodiéster) nas suspensões de nanopartículas desenvolvidas, via encapsulação ou via adsorção na superfície das partículas e caracterizá-las quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e morfologia;
- e) Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação da proteína S e do peptídeo CpG, a fim de realizar a determinação do teor e da taxa de encapsulação dos ativos nas nanopartículas;
- f) Avaliar o perfil de liberação da proteína S e do peptídeo CpG a partir das nanopartículas desenvolvidas;

4. Revisão Bibliográfica

4.1. Coronavírus e Proteína S

Coronavírus, os vírus da família *Coronaviridae*, são assim conhecidos por possuírem em sua superfície pontas características que remetem a coroas e por causar doenças diarreicas e resfriados comuns em humanos. No entanto, o surgimento de espécies causadoras de doenças mais graves como SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) em 2003, que causou uma mortalidade de 10%, MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) em 2012, que causou uma mortalidade de 37% e SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) em 2019, que ainda encontra-se em contaminação em todos os continentes, demonstraram a importância desses agentes como patógenos emergentes (COLEMAN *et al.*, 2014; RABI *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2020). Acredita-se que os três vírus tenham origem de espécies de morcegos, tendo o SARS-CoV-2, 79% de semelhança genética com o SARS-CoV humano, 98% de semelhança

genética com coronavírus RaTG13 de morcego e alta similaridade com sequências de coronavírus de pangolim (um tamanduá escamoso) (TAY *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por meio de gotículas respiratórias suspensas no ar e estudos demonstraram que esses vírus apresentam afinidade pelos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que são encontrados em células epiteliais das vias aéreas, células epiteliais alveolares, células endoteliais vasculares e macrófagos do pulmão (TAY *et al.*, 2020). Estudos indicam que o SARS-CoV-2 possa infectar também o cérebro, tendo em vista a presença de receptores (ACE2) no endotélio, ou da placa cribiforme próxima ao bulbo olfatório (FLORINDO *et al.*, 2020). O período médio de incubação do vírus, tempo em que as pessoas estão infectadas, porém sem sintomas, é de 4-5 dias. Geralmente, os sintomas associados são tosse seca, dificuldade de respirar, hiposmia, febre, dores musculares e / ou articulares, dor de cabeça / tontura, náusea, diarreia e tosse com sangue, podendo estar presentes ou não, num período de 11,5 dias (GUAN *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

Os coronavírus são vírus envelopados, de RNA fita simples, que codificam quatro proteínas estruturais principais: S (pico), M (membrana), E (envelope) e N (nucleocapsídeo). Existem também regiões genômicas para codificação de proteínas específicas para a replicação viral além de outras proteínas, como protease principal do coronavírus (3CLpro) e protease tipo papaína (PLpro). Dentre as quatro proteínas estruturais principais, a proteína S é o principal foco para o desenvolvimento de vacinas, tendo em vista que é uma glicoproteína transmembrana expressa na superfície do vírus, responsável pela ligação ao receptor e entrada do vírus nas células (COLEMAN *et al.*, 2014; FLORINDO *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2020; TUROŇOVÁ *et al.*, 2020). Os SARS-CoV-2 possuem a proteína S, que contém os domínios de ligação ao receptor, ou RBD. Esses domínios ligam-se a receptores da ACE2 localizados nas células de órgãos como rins, pulmões, coração e trato gastrointestinal de forma a tornar possível a entrada dos vírus nas células do hospedeiro (RABI *et al.*, 2020).

A proteína S é um trímero e exibe a organização do domínio das proteínas de fusão de classe I. Uma característica das proteínas dessa classe é a necessidade de ativação proteolítica por enzimas da célula hospedeira. A proteína S pode ser clivada na interface

entre as subunidades S1 e S2 por furina. A subunidade funcional S1 (N-terminal S1 ou amino-terminal) abriga o receptor da célula hospedeira RBD, que se liga à receptores da ACE2 e inicia o processo de infecção. A subunidade funcional S2 (C-terminal S2) é a responsável pela fusão e âncora das membranas viral e celular. A clivagem da proteína S por furina está ligada à virulência *in vivo* dos coronavírus, dessa forma, a infecção celular é um processo complexo que depende da ligação do vírus ao receptor e do processamento proteolítico da proteína S para promover a fusão vírus-célula (FLORINDO *et al.*, 2020; GLOWACKA *et al.*, 2011; RABI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020; WALLS *et al.*, 2020).

Estudos indicam que a ligação do SARS-CoV-2 às células humanas ocorra da mesma forma como acontece nas infecções por SARS-CoV, tendo em vista a semelhança entre os dois vírus. Sabe-se que uma cascata de inflamação no trato respiratório inferior é desencadeada após a ocorrência da ligação do SARS-CoV aos receptores da ACE2 nos pulmões (RABI *et al.*, 2020). Esse fato ocorre, pois, a ACE2 atua na regulação do sistema renina-angiotensina (SRA). Dessa forma, após a infecção viral, e consequente ocupação desses receptores, ocorre uma desregulação do SRA (desregula a pressão arterial e o equilíbrio hidroeletrólítico), levando a um aumento da inflamação e permeabilidade vascular das vias aéreas (TAY *et al.*, 2020).

Basicamente, a infecção do SARS-CoV-2 ocorre após a ligação da proteína S ao receptor da ACE2 (Figura 1A) em células que expressam esse receptor e a serina protease transmembrana tipo 2, TMPRSS2. A TMPRSS2 atua no complexo, clivando a ACE2 e ativando a proteína S (Figura 1B), de forma a facilitar a entrada do vírus na célula (Figura 1C). Essa entrada e infecção viral nas células dos hospedeiros desencadeiam a piroptose delas, uma resposta imune e as células apresentadoras de antígeno (APC) desencadeiam uma cascata inflamatória. As APC apresentam o antígeno para células TCD₄ (Th1) e desencadeiam a liberação de interleucina-2, interleucina-12, IFN- γ e TNF- α , que promovem a estimulação de novos Th1. Esse aumento de células TCD₄, ativa duas vias no organismo: 1) estimula as células TCD₈ (T-Killer), que são as responsáveis por eliminar toda e qualquer célula contaminada por antígeno estranho; 2) estimula as células B a produzir anticorpos de memória para aquele patógeno. Esses processos juntos compõem a invasão e infecção celular

por SARS-CoV-2 além de processos de reconhecimento, neutralização, eliminação e geração de imunidade contra o vírus (RABI *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

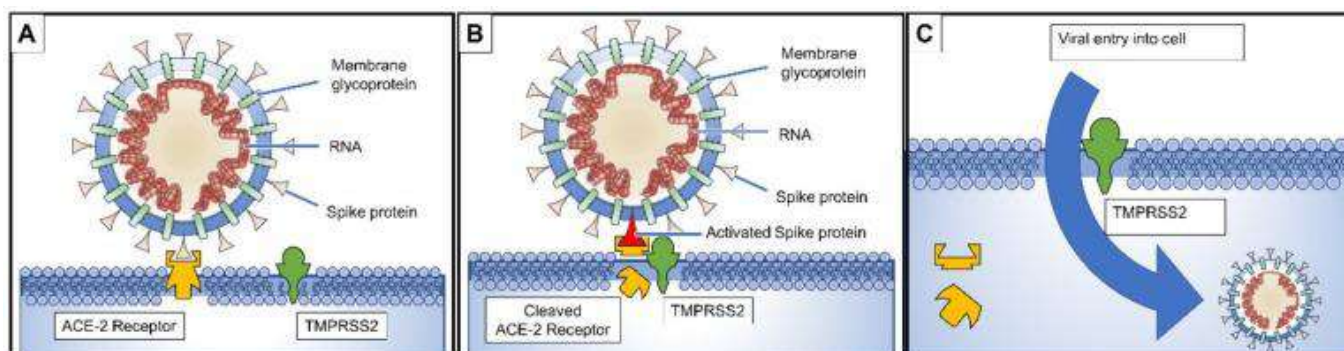


Figura 1: Modelo de ligação e infecção do coronavírus às células-alvo. Imagem extraída de Rabi *et al.*, 2020.

4.2. Nanotecnologia

A possibilidade de projetar e administrar no corpo humano nanopartículas que atuem na promoção da saúde vêm sendo amplamente estudada. Para a área farmacêutica, as nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm (MEDINA *et al.*, 2007). Existem diferentes tipos de nanopartículas, com variadas composições e métodos de preparação. Basicamente, as nanopartículas podem ser classificadas como orgânicas, sendo constituídas por partículas lipossomais e poliméricas (nanocápsulas ou nanoesferas), ou inorgânicas, sendo constituídas por partículas metálicas, cerâmicas ou baseadas em carbono (nanotubos de carbono e fulerenos) (MEDINA *et al.*, 2007). Dentre esses sistemas, destacam-se os lipossomas e as nanopartículas poliméricas para uso como sistema de liberação de fármacos, tendo em vista sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (BIZERRA; SILVA, 2016).

As nanocápsulas são sistemas reservatórios, constituídas por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Figura 2 a e b). Já as nanoesferas, não possuem núcleo em sua composição e apresentam uma matriz polimérica na qual o fármaco se encontra retido ou adsorvido (Figura c e d) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

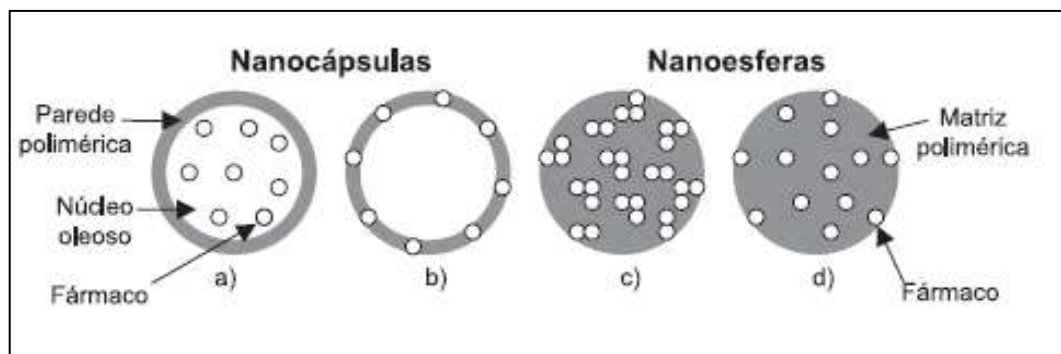


Figura 2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco incorporado na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Imagem retirada de Schaffazick *et al.*, 2003.

A utilização de nanocarreadores poliméricos para a liberação de fármacos permite o direcionamento e controle da liberação de ativos em sítios de ação específicos, maiores concentrações de fármaco no local desejado, redução de efeitos adversos e otimização da velocidade de entrega (BIZERRA; SILVA, 2016; POHLMANN *et al.*, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Tendo em vista suas vantagens, sistemas nanoestruturados têm sido aplicados como opção para o encapsulamento de fármacos antitumorais (BAETKE; LAMMERS; KIESSLING, 2015), peptídeos (CAO *et al.*, 2019), proteínas (PACHIONI-VASCONCELOS *et al.*, 2016) e vacinas (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

4.3. Vacinas e Nanovacinas

Historicamente, as vacinas foram uma das maiores revoluções na sociedade, transformando o modo de vida da população do século XX, por eliminar a maioria das doenças infantis que costumavam causar milhões de mortes infantis (RAPPUOLI *et al.*, 2011). No século XXI, as vacinas continuam protegendo a saúde da população, tendo em vista que novas doenças infecciosas surgiram e continuarão a surgir (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; RAPPUOLI *et al.*, 2011). Desde o início da vacinação, muitos casos históricos de sucesso envolvendo erradicação ou prevenção de doenças virais podem ser relatados como poliomielite, varíola, hepatite A, papiloma, difteria, tétano, sarampo, febre amarela e gripe (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; SULCZEWSKI *et al.*, 2018). No entanto, ainda não estão disponíveis vacinas eficazes contra muitos vírus clinicamente relevantes como HIV, vírus da hepatite C, Zika vírus e tuberculose (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Essa

falta de vacinas eficazes para certos tipos de vírus pode ser explicada por diversos fatores, como por exemplo: alta taxa de mutação viral, baixa imunogenicidade de antígenos virais recombinantes, instabilidade de proteínas antigênicas virais administradas *in vivo*, mecanismos sofisticados de evasão imune viral e indução ineficiente de imunidade da mucosa (SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Uma forma de contornar esses obstáculos, é a utilização de sistemas de entrega de vacinas baseados em nanopartículas, que otimizam a entrega dessas moléculas no local alvo, de forma a induzir resposta imunológica duradoura, reduzindo efeitos colaterais e forneça essas respostas a uma exposição mínima de doses (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

Existem disponíveis vacinas baseadas em organismos vivos atenuados ou inativados, de subunidades, toxóides (toxinas inativadas), combinadas, de RNA e DNA (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Essas vacinas, apesar de promissoras, apresentam algumas desvantagens como por exemplo: risco de reversão à virulência patogênica - para as vacinas de patógenos vivos atenuados; resposta imunológica fraca - para as vacinas de patógenos inativados; necessidade de componentes complexos no meio de cultura - para as vacinas à base de toxóides; ativação de oncogenes - para vacinas baseadas em DNA (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019). Por isso, é crescente a necessidade de desenvolver uma nova geração de vacinas com capacidade de atuar como imunógeno e adjuvante, sendo as nanopartículas uma formulação proposta para sanar esse problema.

Formulações nanotecnológicas para o desenvolvimento de vacinas podem atuar como adjuvantes, induzir a resposta imune inata e adaptativa, proteger o antígeno / molécula de degradação enzimática, melhorar a estabilidade das formulações, atuar como antígenos, auxiliar na entrega direcionada de um imunógeno às células apresentadoras de antígeno (APCs), entregar peptídeos ou proteínas a tecidos específicos e ajudar as células a gerar uma resposta imune mais forte (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Além disso, nanopartículas de uma forma geral possuem liberação controlada, o que prolonga a meia-vida das vacinas, são biocompatíveis, biodegradáveis e relativamente fáceis de produzir (ZOLNIK *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de sistemas nanoestruturados têm sido utilizados como adjuvantes, imunógenos e veículos de entrega de moléculas para ativação imunológica (LIN *et al.*,

2018). As nanovacinas compostas por esses sistemas possuem a capacidade de induzir a imunidade mediada por células e imunidade mediada por anticorpos, com indução de resposta de memória. A liberação prolongada de moléculas das nanopartículas tende a causar uma estimulação da resposta imunológica prolongada, aliviando a necessidade de doses de reforço. Dessa forma, as nanovacinas podem ser usadas como profiláticas (administradas antes da ocorrência da doença), ou terapêuticas (administradas após a ocorrência da doença). No entanto, para se obter melhores resultados, ainda devem ser otimizados parâmetros como segurança, biodistribuição e residência das nanopartículas no organismo (BHARDWAJ *et al.*, 2020).

Modelos de nanopartículas utilizados para desenvolvimento de nanovacinas

Muito tem se buscado aprimorar as técnicas de desenvolvimento de nanovacinas. Diferentes tipos de nanopartículas têm sido amplamente utilizados como adjuvantes, imunógenos e veículos de entrega de antígenos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, cápsulas ou toxinas para ativação imunológica (BHARDWAJ *et al.*, 2020). Os modelos de nanopartículas usados mais frequentemente para o desenvolvimento de nanovacinas estão listados abaixo e representados na Figura 3:

- 1) Lipossomas - consistem em uma bicamada lipídica em torno de um núcleo aquoso, não tóxico e biodegradável, menos imunogênicos com propriedades físico-químicas ajustáveis, podendo ser unilamelar ou multilamelar (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).
 - a. Virossomas - consistem em uma bicamada lipídica conjugada com glicoproteínas virais específicas para receptores de células-alvos. São esféricos, mas, ao contrário do lipossoma, eles possuem um envelope vesicular viral unilamelar com materiais de vírus não infecciosos (SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Vacinas como Epaxal[®], contra hepatite A, Infelxal[®] V, contra influenza, Invivac[®] e NasalFlu[®], contra gripe, são vacinas virossomais aprovadas e comercializadas (ZHAO *et al.*, 2014).
 - b. Vesículas multilamelares reticuladas entre camadas (ICMVs) - consistem em nanovesículas construídas para estabilizar os lipossomas, reduzir sua

toxicidade e aumentar o tempo de liberação do antígeno / molécula *in vivo* (SULCZEWSKI *et al.*, 2018).

- 2) Partículas semelhantes a vírus (VLPs) – consistem em nanoestruturas de automontagem, sem ácido nucleico infeccioso, que são montadas a partir de proteínas estruturais virais, incapazes de se replicar, com alta densidade de epítomos. É possível acoplar na superfície dessas partículas, antígenos não proteicos e pequenas moléculas para produzir bioconjugados (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; ZHAO *et al.*, 2014). As VLPs têm recebido muita atenção por causa de sua facilidade de produção e capacidade de estimular fortes respostas imunológicas (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019). As vacinas baseadas em VLP são a primeira classe de nanovacinas a chegar no mercado, sendo a vacina para o vírus da hepatite B comercializada em 1986. As vacinas de VLP para o papilomavirus humano e hepatite E foram aprovados para uso em humanos em 2006 e 2011, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2014). Está em desenvolvimento uma vacina brasileira de VLP para o SARS-CoV – 2, sob coordenação do Doutor Jorge Kalil, em que o grupo de pesquisa visa conjugar sequências peptídicas do SARS-CoV-2 aos VLPs da proteína S utilizando-os como mecanismo de entrega de antígenos peptídicos aos componentes celulares do sistema imunológico.
- 3) Complexos imunoestimulatórios (ISCOMs) – são partículas semelhantes a gaiolas com cerca de 40 nm de tamanho, produzidas pela combinação do adjuvante saponina Quil A, colesterol, fosfolipídios e antígenos de proteínas, podendo ser utilizadas para aprisionar moléculas hidrofóbicas. Diversos antígenos têm sido usados para formar ISCOMs, incluindo antígenos derivados de influenza, vírus herpes simplex, HIV e doença de Newcastle (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2014).
- 4) Nanoemulsões – consistem em duas fases líquidas imiscíveis entre si, estabilizadas por um emulsificante para formar uma fase única. Essas nanovacinas podem ser formadas por nanopartículas nas formas óleo em água ou água em óleo, com o tamanho variando de 50 nm a 600 nm. As nanoemulsões podem transportar moléculas dentro do seu núcleo ou misturando-se com elas (KHEIROLLAHPOUR

et al., 2019; ZHAO *et al.*, 2014). Existem diferentes emulsões utilizadas como adjuvantes em vacinas comercializadas atualmente, como por exemplo, MF59 TM, uma emulsão óleo em água utilizada em vacinas contra a gripe; e Montanide TM, uma grande família de emulsões óleo em água e água em óleo, usadas em vacinas contra malária e febre aftosa (DAR *et al.*, 2013; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019).

- 5) Nanopartículas inorgânicas - consistem em nanoestruturas rígidas, de diferente formas (esféricos, hastes, cúbicos, camadas) e tamanhos, fabricados a partir de ouro, carbono, sílica, à base de alumínio, fosfato de cálcio, magnéticos, que induzem respostas humorais e celulares (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019). Por exemplo, nanopartículas de ouro têm sido usadas como adjuvantes em vacinas de DNA para vírus HIV (XU *et al.*, 2012), proteína (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019), vírus influenza (TAO; ZIEMER; GILL, 2014), febre aftosa (CHEN *et al.*, 2010), dentre outros.

- 6) Nanopartículas poliméricas – consistem em partículas formadas por diferentes polímeros, naturais ou sintéticos, que aprisionam a molécula ativa através de cápsulas ou redes poliméricas. Essas partículas apresentam características interessantes para aplicação em vacinas como: facilidade de preparação, estabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, citotoxicidade reduzida e possibilidade de ajustar as propriedades da superfície conforme necessário. Esses sistemas nanoestruturados possuem vantagens como: liberação sustentada, proteção das moléculas nanoencapsuladas contra o ambiente hostil e da degradação enzimática, entrega direcionada e efeitos adjuvantes. Além disso, controlar a taxa de liberação das nanovacinas é relativamente fácil, tendo em vista a possibilidade de alteração da composição ou proporção de copolímeros durante o processo de desenvolvimento das nanopartículas (BHARDWAJ *et al.*, 2020; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Vacinas baseadas em nanopartículas poliméricas já foram estudadas para transportar, por exemplo, vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011), *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013) e *Mycobacterium tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001).

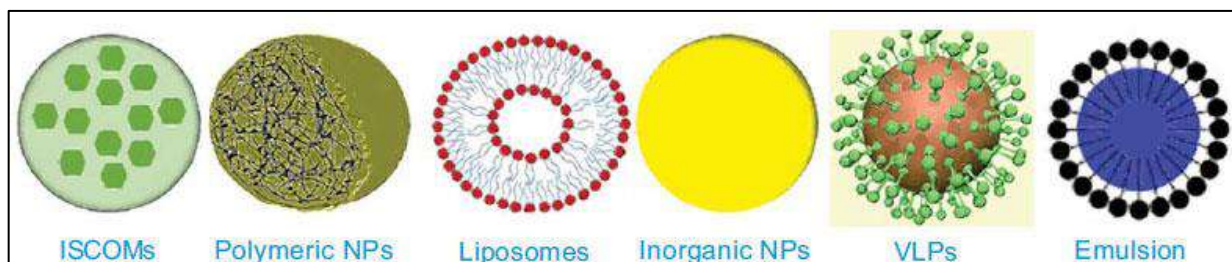


Figura 3: Representação esquemática de sistemas nanoestruturados para entrega de moléculas em vacinas. Imagem extraída de Kheirollahpour *et al.*, 2020

Nanopartículas poliméricas para uso em vacinas

Diversos polímeros sintéticos são utilizados para preparar nanopartículas visando aplicação em nanovacinas. Polímeros sintéticos como poli (D , L -lactídeo-co-glicolídeo) - PLG; poli (D , L ácido láctico-co-glicólico) – PLGA (THOMAS *et al.*, 2011); poli (ácido γ -glutâmico) - γ -PGA (AKAGI; BABA; AKASHI, 2011); poli (etilenoglicol) – PEG (SILVA *et al.*, 2016); e polímeros naturais como pululano (HASEGAWA *et al.*, 2006), alginato (LI *et al.*, 2013), inulina (SAADE *et al.*, 2013) e quitosana (FENG *et al.*, 2013) são utilizados para o encapsulamento de diferentes moléculas.

Nanopartículas de PLGA, ou PLA, poli (ácido láctico), são as partículas mais utilizadas na entrega e direcionamento de antígenos para as nanovacinas poliméricas, visando atuar nas células dendríticas e ativar respostas celulares potentes (BHARDWAJ *et al.*, 2020; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). Vacinas contendo nanopartículas de PLGA e PLA já foram utilizadas com antígenos do vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011), malária por *Plasmodium vivax* (MOON *et al.*, 2012), tétano (DIWAN; TAFAGHODI; SAMUEL, 2002), *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (LIMA *et al.*, 2001) e ovalbumina (DEMENTO *et al.*, 2012). Nanopartículas de γ -PGA são compostas de poli (aminoácidos) anfifílicos, que se auto-organizam em nanomicelas com uma camada externa hidrofílica e um núcleo interno hidrofóbico e são usadas para encapsular moléculas hidrofóbicas (AKAGI *et al.*, 2005; AKAGI; BABA; AKASHI, 2011). Polímeros aniônicos obtidos do ácido acrílico como o PAA, ácido poliacrílico, são uma alternativa utilizada para a entrega de antígenos peptídicos e apresentam uma forte resposta imunológica (ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013).

Nanopartículas à base de quitosana (poli – D – glucosamina) têm sido amplamente estudadas tendo em vista as suas características como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, natureza não tóxica e capacidade de ser facilmente modificável quanto a sua forma e tamanho (AKAGI; BABA; AKASHI, 2011). Esses sistemas nanoestruturados foram utilizados em vacinas contra o vírus da hepatite B (BORGES *et al.*, 2008), vacinas contra a doença de Newcastle (ZHAO *et al.*, 2012) e vacinas de DNA para *Mycobacterium tuberculosis* (FENG *et al.*, 2013). A inulina pode ser utilizada como adjuvante em vacinas, como é o caso do Advax™, um adjuvante derivado da inulina, obtendo um aumento da resposta imune em vacinas contra vírus como influenza (HONDA-OKUBO; SAADE; PETROVSKY, 2012) e hepatite B (SAADE *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que administração intradérmica de nanopartículas poliméricas conjugadas com o peptídeo CpG aumentou a ativação de células dendríticas, gerou imunidade celular duradoura e resultou em uma eficácia de vacina comparável em dose de vacina ~ 400 vezes menor, quando comparada com o CpG livre (DE TITTA *et al.*, 2013). Alternativas estão sendo testadas para o aprimoramento do uso de nanopartículas poliméricas em vacinas para a entrega de moléculas. A utilização de partículas de hidrogel à base de poliacrilamida, que são instáveis em pH ácidos, contendo um antígeno modelo e o peptídeo CpG, quando em contato com o pH ácido endossomal, tiveram uma forte atividade de linfócito T citotóxico específico para o antígeno (BEAUDETTE *et al.*, 2009). Outro estudo utilizando o peptídeo CpG ODN em partículas de quitosana revestidas com alginato contendo o antígeno da Hepatite B, resultou em um aumento do anticorpo circulante específico (BORGES *et al.*, 2008). O CpG é um oligonucleotídeo que atua como agonista do receptor Toll-Like 9 (TLR-9), promovendo respostas de células Th1 (BEAUDETTE *et al.*, 2009; DE TITTA *et al.*, 2013). Dependendo do seu tipo, o CpG pode atuar estimulando as células dendríticas (CD) a secretarem IFN- α , ou induzir as células B e CDs a amadurecer e segregar citocinas como interleucinas ou TNF- α . Essa secreção de IFN- α promove as células T natural killer, ativa as células T CD8⁺ e citotoxicidade. A liberação de interleucinas induz respostas Th1 e maturação de células B, e o TNF- α estimula a maturação de CD e ativação de células T (DE TITTA *et al.*, 2013).

No entanto, as técnicas utilizadas para obtenção de nanopartículas baseadas nesses polímeros geralmente utilizam solventes orgânicos para a solubilização dessas macromoléculas, o que pode levar a desnaturação de antígenos. Dessa forma, o

desenvolvimento de técnicas alternativas de preparo de carreadores, como a obtenção de micropartículas por *spray drying* (AÑO *et al.*, 2011; PASTOR *et al.*, 2013) e métodos que não utilizem solventes orgânicos se faz necessário. Tendo em vista as características mencionadas das nanopartículas poliméricas, baixa toxicidade e a biocompatibilidade já conhecidas, tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo*, essas formulações são candidatas promissoras para a continuidade das pesquisas pré-clínica e clínicas necessárias para aplicações terapêuticas.

Alguns exemplos de nanovacinas baseadas em sistemas nanoestruturados e seu estado clínico estão citados na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Exemplos de formulações nanotecnológica estudadas para aplicações em vacinas em diferentes doenças e suas fases de estudos.

Doença	Sistema Nanoestruturado	Fase de estudo	Referência
Influenza	VLP	Pré-clínica	RAMIREZ <i>et al.</i> , 2018
Influenza	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	BABAPOOR <i>et al.</i> , 2011
Influenza	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	KARCH <i>et al.</i> , 2017
Influenza	Lipossoma	Fase I	BEEH <i>et al.</i> , 2013
Influenza	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	TAO; ZIEMER; GILL, 2014
Influenza	Nanofibras peptídicas de automontagem	Pré-clínica	SI <i>et al.</i> , 2018
Malária	Nanopartículas proteicas de automontagem	Pré-clínica	SETH <i>et al.</i> , 2017
Malária	Nanopartículas de óxido de ferro	Pré-clínica	PUSIC <i>et al.</i> , 2013
Malária	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	MCCOY <i>et al.</i> , 2013
HIV	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	EL BISSATI <i>et al.</i> , 2014
HIV	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	CLIMENT <i>et al.</i> , 2018
HIV	Nanopartículas de quitosana e ácido hialurônico	Pré-clínica	DACOBIA <i>et al.</i> , 2019
HIV	Lipossoma	Fase I	ROMÁN <i>et al.</i> , 2013
Tuberculose	Nanopartículas peptídicas de automontagem	Pré-clínica	CHESSON <i>et al.</i> , 2018
Pneumonia	Nanopartícula de polianidrido	Pré-clínica	WAGNER-MUÑIZ <i>et al.</i> , 2018
Vírus Sincial Respiratório	Lipossoma	Pré-clínica	LIU <i>et al.</i> , 2015
Hepatite B	Nanoesferas de PLGA	Pré-clínica	THOMAS <i>et al.</i> , 2011
Toxoplasmose	Nanopartículas peptídicas de automontagem em α -hélice	Pré-clínica	EL BISSATI <i>et al.</i> , 2017
Dengue	Lipossoma	Pré-clínica	LIU <i>et al.</i> , 2015
Antraz	Nanoesferas de PLGA	Pré-clínica	MANISH <i>et al.</i> , 2013
Doença de Newcastle	Nanopartículas de quitosana	Pré-clínica	ZHAO <i>et al.</i> , 2012
Tétano	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	BARHATE <i>et al.</i> , 2014
Infecção enterohemorrágica	Nanopartículas de ouro	Pré-clínica	SANCHEZ-VILLAMIL; TAPIA; TORRES, 2019
Câncer	Nanoclusters de Fe ₃ O ₄	Pré-clínica	LI <i>et al.</i> , 2019
Câncer	PLGA	Pré-clínica	NIU <i>et al.</i> , 2019

Câncer de mama	Lipossoma	Fase I	HAMILTON <i>et al.</i> , 2012
Câncer de próstata	Nanopartícula de PLGA	Pré-clínica	CHEN <i>et al.</i> , 2019
Melanoma	VLP	Pré-clínica	MOHSEN <i>et al.</i> , 2019
Melanoma	Lipossoma	Fase I	SHEVTSOV; MULTHOFF, 2016
Melanoma	Gliconanopartículas de ouro	Pré-clínica	TERÁN-NAVARRO <i>et al.</i> , 2019
Linfoma de Hodgkin	Lipossoma	Fase I	SHEVTSOV; MULTHOFF, 2016
Glioblastoma	Lipossoma	Fase I-II	BLOCH <i>et al.</i> , 2014
Neuroblastoma	PLA-PEG	Pré-clínica	NGUYEN <i>et al.</i> , 2018
Asma alérgica persistente	VLP	Fase II	BEEH <i>et al.</i> , 2013

Tabela adaptada de Bhardwaj *et al.*, 2020.

Interações das nanopartículas

Para que as nanopartículas desempenhem seu papel como nanocarreadores de moléculas e potenciadores imunológicos, fatores como tamanho, forma, área de superfície, porosidade, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade na interação entre partícula e a célula-alvo devem ser avaliados (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Nanopartículas com um tamanho semelhante aos patógenos tendem a ser facilmente reconhecidas e absorvidas por células apresentadoras de antígeno (APCs) para indução da resposta imune (ZHAO *et al.*, 2014). As células dendríticas preferencialmente absorvem partículas de tamanho entre 20-200 nm, enquanto os macrófagos absorvem preferencialmente partículas maiores, 0,5-5 μm (XIANG *et al.*, 2006). A hidrofobicidade também interfere com a resposta imunológica. Nanopartículas poliméricas hidrofóbicas resultaram em uma maior indução de citocinas e moléculas coestimuladoras, ou seja, em uma resposta imunológica maior, quando comparada com nanopartículas poliméricas hidrofílicas (WATSON; ENDSLEY; HUANG, 2012; ZHAO *et al.*, 2014).

Quanto ao formato, foi demonstrado que nanopartículas esféricas foram capazes de induzir uma resposta imunológica mais forte do que nanopartículas em forma de cubo ou bastonete (NIIKURA *et al.*, 2013). Além disso, o formato desempenha papel fundamental na fagocitose por macrófagos, tendo em vista que a captação depende da interação entre as partículas e APCs (ZHAO *et al.*, 2014). A carga superficial das nanopartículas é responsável pela interação com moléculas superficiais congênicas presentes nas células alvo. Nanopartículas catiônicas são internalizadas mais eficientemente pelas APCs quando

comparadas com nanopartículas neutras. Essa internalização pode ser explicada devido às interações eletrostáticas entre as nanopartículas catiônicas com as membranas celulares aniônicas (FOGED *et al.*, 2005; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

A ativação de células T e B também depende da característica do sistema nanoestruturado utilizado para carrear a molécula de interesse. Antígenos encapsulados em lipossomas obtiveram uma melhor apresentação por APCs às células TCD4⁺, e nanopartículas de 200 nm aumentaram a expressão de MHC de classe I e II, além de produzir mais células TCD4⁺ específicas do antígeno quando comparada com nanopartículas de 30 nm (PERISÉ-BARRIOS *et al.*, 2014; STANO *et al.*, 2012). Além disso, células B normalmente são induzidas após o reconhecimento de estruturas altamente repetitivas (AGARWAL *et al.*, 2013). Dessa forma, nanopartículas modificadas, contendo altas concentrações de peptídeos ou proteínas virais, podem ser desenvolvidas para a aplicação de vacinas, gerando respostas humorais elevadas e duradouras quando comparadas com as mesmas vacinas na forma não encapsulada (AGARWAL *et al.*, 2013; SULCZEWSKI *et al.*, 2018).

Estudos demonstram também, que a associação de peptídeos e proteínas imunogênicas conjugados a superfície das nanopartículas ou encapsulados nessas partículas são capazes de ativar a proliferação de células B de forma muito mais eficaz do que somente com a molécula alvo encapsulada (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; SULCZEWSKI *et al.*, 2018). Uma única dose de nanopartículas de PLGA com ovalbumina (OVA) em sua superfície resultou em uma resposta imunológica mais forte, com mais geração de anticorpos *in vivo* quando comparado com OVA administrada livre (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018).

4.4. Eudragit®

Diversos são os polímeros de polimetacrilatos disponíveis comercialmente, podendo estar na forma de pó seco, dispersão aquosa ou solução orgânica. Esses polímeros podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros sintéticos de acordo com as proporções variáveis de metacrilatos de dimetilaminoetil, ácido metacrílico e ésteres de ácido metacrílico. São polímeros muito utilizados para proteção de moléculas com efeito terapêutico frente à degradação nas variações de pH do trato gastrointestinal, tendo em vista a variedade de

classes de polímeros disponíveis (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017). São exemplos desses polímeros: Eudragit® E100, utilizado como liberação gástrica; Eudragit® L100-55, utilizado como liberação entérica; Eudragit® L100 e Eudragit® S100, utilizado como liberação colônica; Eudragit® RLPO e Eudragit® RSPO, utilizado como liberação prolongada (DATE *et al.*, 2010).

Eudragit® L30-D55

O Eudragit® L30-D55 (Figura 4) é a dispersão aquosa de polímeros aniônicos, contendo o ácido metacrílico como grupo funcional (grupos carboxílicos livres e grupos éster na proporção 1:1) e sua estrutura está ilustrada abaixo na Figura 4. Esses grupos carboxílicos sofrem ionização em meio aquoso em pH acima de 5,5. Devido a essa característica, é um polímero muito utilizado em formulações para revestimento entérico tendo em vista sua solubilidade em fluidos intestinais e resistência aos fluidos estomacais (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017; RAHMAN; ALI, 2008). É um líquido de cor branca, baixa viscosidade, leve odor característico e apresenta miscibilidade em álcoois de acetona, HCl 1N e éter de petróleo (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015). Possui histórico de ser utilizado em micropartículas obtidas por *spray drying* (AÑO *et al.*, 2011; PASTOR *et al.*, 2013), como revestimento de *pellets* para proteção entérica (GASS *et al.*, 2005; RAHMAN; ALI, 2008), como polímero de partículas revestimento com rápida dissolução no intestino superior, em formulações de liberação controlada e entrega em locais específicos (GUPTA; KUMAR; SACHAN, 2015; PATRA *et al.*, 2017).

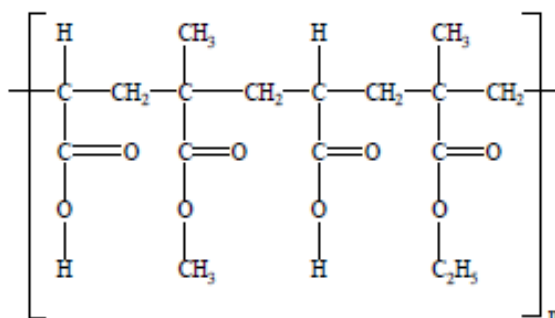


Figura 4: Estrutura química do Eudragit® L30-D55. Imagem extraída de Gupta *et al.*, 2015.

Nanopartículas de Eudragit® L30-D55 foram desenvolvidas pelo método de deslocamento de solvente com algumas modificações. Basicamente, após a secagem Eudragit® para obtenção de um pó, esse pó foi dissolvido em acetona e essa solução foi

adicionada lentamente a uma solução aquosa de PVA a 5%, com posterior homogeneização em alto cisalhamento. Após, prosseguiu-se com a rotaevaporação. Essa técnica gerou partículas de diâmetro médio de $368,6 \pm 7,2$ nm e potencial zeta médio de $-36,3 \pm 1,0$ mV (POOL *et al.*, 2012).

Muitos avanços têm sido feitos para o aprimoramento de nanopartículas de Eudragit[®] como carreadores de moléculas, no entanto, pouco desses estudos são focados em buscar alternativas que não utilizem solventes orgânicos para a fabricação dessas nanopartículas. Diferentes solventes orgânicos já foram utilizados até o momento para a fabricação de nanopartículas, como por exemplo, acetona, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e etanol (PINTO REIS *et al.*, 2006). O uso de solventes orgânicos na fabricação de nanopartículas representa uma preocupação por gerar riscos ambientais, não ser biocompatível e gerar altos custos com o aumento de escala industrial (DATE *et al.*, 2010).

Nanopartículas de Eudragit[®] RSPO, Eudragit[®] RLPO e Eudragit[®] EPO foram desenvolvidas utilizando somente o Labrasol[®], um estabilizador anfifílico, muito utilizado para estabilizar microemulsões orais e tópicas. O Labrasol[®] foi utilizado como solubilizante e estabilizador para as nanopartículas a uma concentração final de 5% v/v, não precisando ser retirado da dispersão posteriormente por ser um solvente biodegradável com produtos de degradação seguros. Essas nanopartículas obtiveram um diâmetro médio e potencial zeta médio, respectivamente, de $125,4 \pm 4,25$ nm e $+ 39,6 \pm 1,6$ mV para Eudragit[®] RSPO; $92,4 \pm 1,30$ nm e $+ 42,3 \pm 2,1$ mV para Eudragit[®] RLPO e $141,9 \pm 2,85$ nm e $33,2 \pm 1,5$ mV para Eudragit[®] EPO (DATE *et al.*, 2010).

Não foram encontrados relatos disponíveis na literatura sobre o uso do Eudragit[®] L30 D55 no desenvolvimento de nanopartículas sem a utilização de solvente orgânico, visando a liberação imediata de proteínas em meios com pH acima de 5,5. É um campo de desenvolvimento muito restrito e talvez ainda não explorado, sendo este o objetivo deste trabalho.

5. Métodos

5.1. Desenvolvimento das suspensões de nanopartículas

As suspensões de nanopartículas serão desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação, sem a utilização de solvente orgânico para solubilização do polímero. Para isso, o polímero Eudragit[®] L30-D55 será solubilizado em uma solução aquosa em pH 5,5-

7,0, sendo essa a fase 1, que será injetada em uma fase 2, composta por um tampão em pH mais ácido e tensoativo. Nesse processo, o polímero tende a ficar insolúvel no meio devido à mudança de pH, ocorrendo o arranjo em partículas esféricas das cadeias poliméricas em suspensão coloidal. Ambas as fases ficarão sob agitação magnética constante, a 36 °C até total solubilização dos componentes. O excedente de solvente será eliminado por meio de evaporação por pressão reduzida até volume final desejado. Em formulações contendo a proteína S, essa será solubilizada na fase 1. Essa fase também poderá conter substâncias com caráter lipofílico a fim de serem obtidas nanopartículas com núcleo lipídico (nanocápsulas). Na fase 2, serão testados diferentes tensoativos para a estabilização das nanopartículas em suspensão coloidal.

Além disso, a incorporação do peptídeo CpG nas nanopartículas via encapsulação ou via adsorção na superfície das partículas será avaliada.

5.2. Caracterização das suspensões de nanopartículas

a) Caracterização físico-química

A determinação do *span* e do diâmetro de partículas para a suspensão de nanopartículas proposta será realizada por meio de difração de laser (Mastersizer® 2000, Malvern), com o intuito de realizar um rastreamento inicial da formulação e verificar a presença exclusiva ou não, das partículas na faixa nanométrica. Utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons em Zetasizer (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA) e a diluição adequada da amostra em água ultrapurificada, será possível obter a distribuição de tamanho de partículas e o índice de polidispersão da suspensão de nanopartículas. O potencial zeta da formulação proposta será obtido pela técnica de mobilidade eletroforética em Zetasizer (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA), após a diluição adequada da amostra em solução de NaCl 1mM. O diâmetro das partículas será rastreado também por Nanosight (Nanosight® LM10–NanoSight – Amesbury, Reino Unido). Já a determinação do pH, será realizada em potenciômetro calibrado, através da imersão direta do potenciômetro na formulação não diluída.

As análises serão realizadas em três momentos distintos: 1) com as nanopartículas intituladas brancas, que serão as formulações desenvolvidas sem a presença da proteína S e do peptídeo CpG; 2) com as nanopartículas na presença da proteína S e 3) com as nanopartículas na presença da proteína S e do peptídeo CpG. Todas as análises serão realizadas em triplicata.

b) Determinação do teor

Para a quantificação da proteína S e do peptídeo CpG, as formulações serão tratadas com solvente adequado, visando a dissolução das nanopartículas. Após as diluições necessárias, a solução final será filtrada para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um método previamente desenvolvido e validado; os parâmetros de partida para o desenvolvimento do método estão descritos na Tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros utilizados para a metodologia de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência

Fase estacionária	Coluna Shim-Pack CLC C8(M) (4,6 mm ×15 cm, 5 µm)
Modo	Fase reversa
Fase móvel	Acetonitrila acidificada com ácido trifluoracético a 0,05% (de 31% a 48%)
Vazão	1 mL/min
Comprimento de onda	214 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	40 °C
Tempo de leitura de cada amostra	18 minutos

c) Eficiência de encapsulação

A concentração de ativos encapsulados será determinada pela técnica de ultrafiltração-centrifugação, considerando-se a diferença entre a concentração total do ativo na suspensão de nanopartículas (teor) e a concentração de ativo no meio de dispersão. Para isso, será necessário transferir uma determinada quantidade de suspensão de nanopartículas para uma unidade filtrante (Ultrafree Microcon 10000 MW, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e realizar a ultrafiltração-centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm, obtendo-se com isso, um ultrafiltrado de ativos não encapsulados, podendo ser quantificados por CLAE.

Após a obtenção das duas concentrações presentes na suspensão de nanopartículas (concentração de ativo total [Ct] e concentração de ativo no meio de dispersão [Cw]), a eficiência de encapsulação (EE) poderá ser calculada conforme a equação abaixo:

$$EE\% = \frac{Ct - Cw}{Ct} \times 100$$

d) Análise morfológica

A morfologia da suspensão de nanopartículas será avaliada através da microscopia eletrônica de transmissão, utilizando-se microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 ExII no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As análises serão realizadas em três momentos distintos: 1) com as nanopartículas intituladas brancas, que serão as formulações desenvolvidas sem a presença da proteína S e do peptídeo CpG; 2) com as nanopartículas na presença da proteína S e 3) com as nanopartículas na presença da proteína S e do peptídeo CpG. Todas as análises serão realizadas em triplicata.

5.3. Estudos *in vitro*

a) Perfil de liberação das nanopartículas

Será avaliado o perfil de liberação da proteína S na forma livre e associada às nanopartículas desenvolvidas, por Célula de Franz manual. Nesse sistema, existem dois compartimentos distintos, que serão separados por uma membrana de celulose. Um dos compartimentos é chamado de doador, no qual as nanopartículas contendo a proteína S ou a proteína S na forma livre serão depositadas, e o outro compartimento é chamado de acceptor, contendo uma solução em que essas formulações são solúveis, mantendo a condição de diluição *sink*. Alíquotas serão retiradas do compartimento acceptor nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 min e serão quantificadas por CLAE. O volume do compartimento acceptor será sempre preenchido com a mesma solução após cada coleta para manter a constância do meio. Os dados de concentração liberada *versus* tempo serão modelados utilizando o software Micromath Scientist®, utilizando equações mono e biexponenciais. Os perfis também serão avaliados segundo equações específicas, a fim de determinar o mecanismo de liberação das substâncias a partir dos sistemas nanoestruturados.

6. Análise estatística

As formulações desenvolvidas serão comparadas com relação à presença ou ausência da proteína S e do peptídeo CpG, quanto às análises físico-químicas realizadas nas nanopartículas. Os dados serão analisados estatisticamente por meio do teste T de *Student*, com intervalo de confiança de 95%. Os demais dados serão analisados estatisticamente

através da análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% e, quando identificada diferença significativa ($\alpha \leq 0,05$) para os ensaios realizados, será utilizado o teste de Tuckey para identificar quais grupos diferem estatisticamente dos demais. Todas as análises estatísticas serão realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.

7. Cronograma de atividades

Atividades	Tempo em semestres					
	1	2	3	4	5	6
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X
Realização das disciplinas	X	X	X	X	X	
Participação em Seminário Científicos	X	X	X	X	X	X
Participação em Seminário de Dados Experimentais	X	X	X	X	X	X
Participação em Referatas em grupo	X	X	X	X	X	X
Desenvolvimento das nanopartículas	X	X	X			
Caracterização físico-química das nanopartículas desenvolvidas		X	X			
Encapsulação da proteína S nas nanopartículas		X	X			
Caracterização físico-química das nanopartículas desenvolvidas		X	X			
Incorporação do peptídeo CpG nas nanopartículas			X			
Caracterização físico-química das nanopartículas desenvolvidas			X			
Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação da proteína S e do peptídeo CpG			X	X		
Avaliação do perfil de liberação das nanopartículas				X		
Realização da análise dos dados			X	X	X	X
Redação da Qualificação e Tese			X	X	X	X
Elaboração de artigo científico				X	X	X
Qualificação				X		
Defesa da tese						X

8. Orçamento

Descrição do Objeto	Quantidade	Unidade	Valor orçado por unidade	Valor total
Frasco Reagente 250 mL	2	250 mL	R\$ 20,70	R\$ 41,40
Frasco Reagente 500 mL	2	500 mL	R\$ 27,10	R\$ 54,20
Copo Bécker 100 mL	4	100 mL	R\$ 5,80	R\$ 23,20

Erlenmeyer 250 mL	2	250 mL	R\$ 13,70	R\$ 27,40
Barra magnética pequena	5	Unidade de 7X22 mm	R\$ 10,70	R\$ 53,50
Ácido orto-fosfórico 85% PA. Número CAS: 7664 -38 -2	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 48,90	R\$ 48,90
Álcool Etilico Absoluto 99,8% P.A. Número CAS: 64-17-5	4 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 19,10	R\$ 76,40
Caixa de Cubas Descartáveis DTS1070 para medição de Potencial Zeta ou tamanho de Partículas.	10	Caixa com 10 cubas descartáveis e 20 tampas	R\$ 3737,50	R\$ 3737,50
Luva nitrílica (Tamanhos PP, P, M, G)	400	Embalagem com 100 unidades	R\$ 79,00	R\$ 316,00
Filtro de seringa em PVDF – hidrofílico 0,45 µm x 25 mm.	100	Embalagem com 100 unidades	R\$ 335,00	R\$ 335,00
Ponteira sem filtro 5-200 µL, tipo Gilson, amarela.	1000	Embalagem com 1000 unidades	R\$ 12,00	R\$ 12,00
Ponteira sem filtro 100-1000 µL, tipo Gilson, azul.	1000	Embalagem com 500 unidades	R\$ 16,50	R\$ 33,00
Total			R\$ 4758,50	
Materiais disponíveis no laboratório				
Eudragit® L30-D55	1 L	Embalagem de 1000 mL	Doação da EVONIK	Doação da EVONIK
Monoestearato de sorbitano. Número CAS: 1338-41-6	250 g	Embalagem de 250 g	R\$ 940,00	R\$ 940,00
Triglicerídeo de cadeia média (TCM). Número CAS: 65381-09-1/73398-61-5.	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 90,00	R\$ 90,00
Polissorbato 80	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 93,70	R\$ 93,70
Ácido acético glacial 99,8% PA. Número CAS: 64-19-7	1 L	Embalagem de 1000 mL	R\$ 29,90	R\$ 29,90
Acetato de Sódio Trihidratado P.A. Número CAS: 6131-90-4	1000 g	Embalagem de 1000 g	R\$ 29,90	R\$ 29,90
Fosfato de Potássio Monobásico Anidro P.A. Número CAS: 7778-77-0	1000 g	Embalagem de 1000 g	R\$ 54,00	R\$ 54,00
Peptídeo CpG ODN (citosina-guanina fosfodiéster)	200 µg	Embalagem de 200 µg	R\$ 2166,01	R\$ 2166,01
Total			R\$ 3404,41	
Total estimado			R\$ 8162,91	

9. Referências bibliográficas

1. AGARWAL, R. *et al.* Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17247–17252, 2013.
2. AKAGI, T. *et al.* Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly(γ -glutamic acid) with L-phenylalanine as a protein carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 108, n. 2–3, p. 226–236, 2005.
3. AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. In: KUNUGI, S.; YAMAOKA, T. (Eds.). . **Polymers in Nanomedicine**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 31–64.
4. AÑO, G. *et al.* A new oral vaccine candidate based on the microencapsulation by spray-drying of inactivated *Vibrio cholerae*. **Vaccine**, v. 29, n. 34, p. 5758–5764, 2011.
5. BABAPOOR, S. *et al.* A Novel Vaccine Using Nanoparticle Platform to Present Immunogenic M2e against Avian Influenza Infection. **Influenza Research and Treatment**, v. 2011, p. 1–12, 2011.
6. BAETKE, S. C.; LAMMERS, T.; KIESSLING, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. **British Journal of Radiology**, v. 88, n. 1054, 2015.
7. BARHATE, G. *et al.* Enhanced mucosal immune responses against tetanus toxoid using novel delivery system comprised of chitosan-functionalized gold nanoparticles and botanical adjuvant: Characterization, immunogenicity, and stability assessment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 11, p. 3448–3456, 2014.
8. BEAUDETTE, T. T. *et al.* In vivo studies on the effect of co-encapsulation of CpG DNA and antigen in acid-degradable microparticle vaccines. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 4, p. 1160–1169, 2009.
9. BEEH, K. M. *et al.* The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 3, p. 866–874, 2013.
10. BHARDWAJ, P. *et al.* Advancements in prophylactic and therapeutic nanovaccines. **Acta Biomaterialia**, v. 108, p. 1–21, 2020.

11. BIZERRA, A.; SILVA, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, n. 2, p. 1–12, 2016.
12. BLOCH, O. *et al.* Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: A phase II, single-arm trial. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 2, p. 274–279, 2014.
13. BORGES, O. *et al.* Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 405–416, 2008.
14. CAO, S. JUN *et al.* Nanoparticles: Oral Delivery for Protein and Peptide Drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, p. 1–11, 2019.
15. CHEN, Q. *et al.* Tumor growth inhibition by mSTEAP peptide nanovaccine inducing augmented CD8⁺ T cell immune responses. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, n. 6, p. 1095–1105, 2019.
16. CHEN, Y. S. *et al.* Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. **Nanotechnology**, v. 21, n. 19, 2010.
17. CHESSON, C. B. *et al.* Nanoscale Peptide Self-assemblies Boost BCG-primed Cellular Immunity Against Mycobacterium tuberculosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
18. CLIMENT, N. *et al.* Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 339–351, 2018.
19. COLEMAN, C. M. *et al.* Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, v. 32, n. 26, p. 3169–3174, 2014.
20. DACOBA, T. G. *et al.* Polysaccharide Nanoparticles Can Efficiently Modulate the Immune Response against an HIV Peptide Antigen. **ACS Nano**, v. 13, n. 5, p. 4947–4959, 2019.
21. DAR, P. *et al.* Montanide ISATM 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. **Vaccine**, v. 31, n. 33, p. 3327–3332,

- 2013.
22. DATE, A. A. *et al.* Organic solvent-free approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol. **Pharmazie**, v. 65, n. 10, p. 733–736, 2010.
 23. DE TITTA, A. *et al.* Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 49, p. 19902–19907, 2013.
 24. DEMENTO, S. L. . *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype Stacey. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4957–4964, 2012.
 25. DIWAN, M.; TAFAGHODI, M.; SAMUEL, J. Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1–3, p. 247–262, 2002.
 26. EL BISSATI, K. *et al.* Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for Toxoplasma peptide vaccine in HLA transgenic mice. **Vaccine**, v. 32, n. 26, p. 3243–3248, 2014.
 27. EL BISSATI, K. *et al.* Protein nanovaccine confers robust immunity against Toxoplasma. **npj Vaccines**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2017.
 28. FENG, G. *et al.* Enhanced Immune Response and Protective Effects of Nano-chitosan-based DNA Vaccine Encoding T Cell Epitopes of Esat-6 and FL against Mycobacterium Tuberculosis Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.
 29. FLORINDO, H. F. *et al.* Immune-mediated approaches against COVID-19. **Nature Nanotechnology**, v. 15, n. 8, p. 630–645, 2020.
 30. FOGED, C. *et al.* Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 2, p. 315–322, 2005.
 31. GASS, J. *et al.* Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: Implications for celiac sprue therapy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 674–684, 2005.
 32. GLOWACKA, I. *et al.* Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and

- Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. **Journal of Virology**, v. 85, n. 9, p. 4122–4134, 2011.
33. GUAN, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020.
 34. GUPTA, P.; KUMAR, M.; SACHAN, N. An Overview on Polymethacrylate Polymers in Gastroretentive Dosage Forms. **Open Pharmaceutical Sciences Journal**, v. 9, n. 1, p. 31–42, 2015.
 35. HAMILTON, E. *et al.* Phase I clinical trial of HER2-specific immunotherapy with concomitant HER2 kinase inhibition. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 28, 2012.
 36. HASEGAWA, K. *et al.* In vitro stimulation of CD8 and CD4 T cells by dendritic cells loaded with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan and NY-ESO-1 protein: Identification of a new HLA-DR15-binding CD4 T-cell epitope. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 6, p. 1921–1927, 2006.
 37. HONDA-OKUBO, Y.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. **Vaccine**, v. 30, n. 36, p. 5373–5381, 2012.
 38. KARCH, C. P. *et al.* Vaccination with self-adjuvanted protein nanoparticles provides protection against lethal influenza challenge. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 241–251, 2017.
 39. KHEIROLLAHPOUR, M. *et al.* Nanoparticles and Vaccine Development. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 6–21, 2019.
 40. LI, F. *et al.* Engineering Magnetosomes for High-Performance Cancer Vaccination. **ACS Central Science**, v. 5, n. 5, p. 796–807, 2019.
 41. LI, P. *et al.* Bio-reducible alginate-poly(ethylenimine) nanogels as an antigen-delivery system robustly enhance vaccine-elicited humoral and cellular immune responses. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 3, p. 271–279, 2013.
 42. LIMA, V. M. F. *et al.* Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5305–5312, 2001.
 43. LIN, L. C. W. *et al.* Advances and Opportunities in Nanoparticle- and Nanomaterial-

- Based Vaccines against Bacterial Infections. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 1–26, 2018.
44. LIU, G. *et al.* Immunogenicity and efficacy of flagellin-envelope fusion dengue vaccines in mice and monkeys. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 5, p. 516–525, 2015.
 45. MANISH, M. *et al.* A Single-Dose PLGA Encapsulated Protective Antigen Domain 4 Nanoformulation Protects Mice against Bacillus anthracis Spore Challenge. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
 46. MCCOY, M. E. *et al.* Erratum: Mechanisms of protective immune responses induced by the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based, self-assembling protein nanoparticle vaccine (Malaria Journal (2013) 12 (136) doi:10.1186/1475-2875-12-136). **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, 2013.
 47. MEDINA, C. *et al.* Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 552–558, 2007.
 48. MOHSEN, M. O. *et al.* Targeting mutated plus germline epitopes confers pre-clinical efficacy of an instantly formulated cancer nano-vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.
 49. MOON, J. J. *et al.* Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
 50. NGUYEN, F. *et al.* Enhanced Intratumoral Delivery of SN38 as a Tocopherol Oxyacetate Prodrug Using Nanoparticles in a Neuroblastoma Xenograft Model. **Clin Cancer Res.**, v. 24, n. 11, p. 2585–2593, 2018.
 51. NIIKURA, K. *et al.* Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 3926–3938, 2013.
 52. NIU, L. *et al.* Intradermal delivery of vaccine nanoparticles using hollow microneedle array generates enhanced and balanced immune response. **Journal of Controlled Release**, v. 294, n. November 2018, p. 268–278, 2019.
 53. PACHIONI-VASCONCELOS, J. D. A. *et al.* Nanostructures for protein drug delivery. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 2, p. 205–218, 2016.
 54. PASTOR, M. *et al.* An approach to a cold chain free oral cholera vaccine: In vitro and in vivo characterization of Vibrio cholerae gastro-resistant microparticles.

- International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 247–258, 2013.
55. PATI, R.; SHEVTSOV, M.; SONAWANE, A. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, 2018.
 56. PATRA, C. N. *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 33–45, 2017.
 57. PERISÉ-BARRIOS, A. J. *et al.* Carbosilane dendrimers as gene delivery agents for the treatment of HIV infection. **Journal of Controlled Release**, v. 184, n. 1, p. 51–57, 2014.
 58. PINTO REIS, C. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.
 59. POHLMANN, A. R. *et al.* Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623–638, 2013.
 60. POOL, H. *et al.* Polymeric Nanoparticles as Oral Delivery Systems for Encapsulation and Release of Polyphenolic Compounds: Impact on Quercetin Antioxidant Activity & Bioaccessibility. **Food Biophysics**, v. 7, n. 3, p. 276–288, 2012.
 61. PUSIC, K. *et al.* Iron oxide nanoparticles as a clinically acceptable delivery platform for a recombinant blood-stage human malaria vaccine. **FASEB Journal**, v. 27, n. 3, p. 1153–1166, 2013.
 62. RABI, F. A. *et al.* Sars-cov-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2020.
 63. RAHMAN, M. A.; ALI, J. Development and in vitro Evaluation of Enteric Coated Multiparticulate System for Resistant Tuberculosis. **Indian J Pharm Sci**, v. 70, n. 4, p. 477–481, 2008.
 64. RAMIREZ, A. *et al.* A virus-like particle vaccine candidate for influenza A virus based on multiple conserved antigens presented on hepatitis B tandem core particles. **Vaccine**, v. 36, n. 6, p. 873–880, 2018.
 65. RAPPUOLI, R. *et al.* Vaccines for the twenty-first century society. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 865–872, 2011.
 66. ROMÁN, V. R. G. *et al.* Therapeutic vaccination using cationic liposome-adjuvanted HIV type 1 peptides representing HLA-supertype-restricted subdominant

- t cell epitopes: Safety, immunogenicity, and feasibility in guinea-Bissau. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 11, p. 1504–1512, 2013.
67. SAADE, F. *et al.* A novel hepatitis B vaccine containing Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, induces robust humoral and cellular immunity with minimal reactogenicity in preclinical testing. **Vaccine**, v. 31, n. 15, p. 1999–2007, 2013.
 68. SANCHEZ-VILLAMIL, J. I.; TAPIA, D.; TORRES, A. G. Development of a gold nanoparticle vaccine against enterohemorrhagic escherichia coli o157:H7. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2019.
 69. SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
 70. SETH, L. *et al.* Development of a self-assembling protein nanoparticle vaccine targeting Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein delivered in three Army Liposome Formulation adjuvants. **Vaccine**, v. 35, n. 41, p. 5448–5454, 2017.
 71. SHEVTSOV, M.; MÜLTHOFF, G. Heat shock protein-Peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–7, 2016.
 72. SI, Y. *et al.* Intranasal delivery of adjuvant-free peptide nanofibers elicits resident CD8+ T cell responses. **Journal of Controlled Release**, v. 282, n. December 2017, p. 120–130, 2018.
 73. SILVA, A. L. *et al.* PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 1056–1069, 2016.
 74. STANO, A. *et al.* Nanoparticle size influences the magnitude and quality of mucosal immune responses after intranasal immunization. **Vaccine**, v. 30, n. 52, p. 7541–7546, 2012.
 75. SU, Q. DONG *et al.* The biological characteristics of SARS-CoV-2 spike protein Pro330-Leu650. **Vaccine**, v. 38, n. 32, p. 5071–5075, 2020.
 76. SULCZEWSKI, F. B. *et al.* Nanoparticle vaccines against viral infections. **Archives of Virology**, v. 163, n. 9, p. 2313–2325, 2018.
 77. TAO, W.; ZIEMER, K. S.; GILL, H. S. Gold nanoparticle-M2e conjugate

- coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. **Nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 237–251, 2014.
78. TAY, M. Z. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020.
 79. TERÁN-NAVARRO, H. *et al.* Pre-clinical development of Listeria-based nanovaccines as immunotherapies for solid tumours: insights from melanoma. **OncoImmunology**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2019.
 80. THOMAS, C. *et al.* Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 405–415, 2011.
 81. TUROŇOVÁ, B. *et al.* In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. **Science (New York, N.Y.)**, v. 370, n. 6513, p. 203–208, 2020.
 82. WAGNER-MUÑIZ, D. A. *et al.* Room temperature stable PspA-based nanovaccine induces protective immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–11, 2018.
 83. WALLS, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, 2020.
 84. WATSON, D. S.; ENDSLEY, A. N.; HUANG, L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. **Vaccine**, v. 30, n. 13, p. 2256–2272, 2012.
 85. XIANG, S. D. *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2006.
 86. XU, L. *et al.* Surface-Engineered Gold Nanorods: Promising DNA Vaccine Adjuvant for HIV-1 Treatment. **Nano Letters**, v. 12, n. 4, p. 2003–2012, 2012.
 87. ZAMAN, M.; GOOD, M. F.; TOTH, I. Nanovaccines and their mode of action. **Methods**, v. 60, n. 3, p. 226–231, 2013.
 88. ZHAO, K. *et al.* Preparation and Efficacy of a Live Newcastle Disease Virus Vaccine Encapsulated in Chitosan Nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2012.
 89. ZHAO, L. *et al.* Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 327–337, 2014.

90. ZOLNIK, B. S. *et al.* Minireview: Nanoparticles and the immune system. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 458–465, 2010.

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

TÍTULO: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE DNA MEDIADA POR LOOP (LAMP) EM ISOLADOS DE *Candida* spp.

RESUMO:

A prevalência de doenças invasivas causadas por fungos oportunistas tem aumentado nos últimos anos, especialmente no contexto atual da pandemia de Covid-19. Os fungos do gênero *Candida* são os principais agentes etiológicos, estando associados a taxas de mortalidade de até 40%. O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas permanece difícil e demorado, o que impede o tratamento adequado, principalmente em pacientes de alto risco. Nos últimos anos, tem se explorado a utilização de técnicas de biologia molecular na identificação desses microrganismos, contudo, devido ao alto custo das técnicas, sua aplicação fica restrita aos laboratórios de grande porte. Nesse sentido, este trabalho pretende validar a técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP), buscando uma metodologia diagnóstica que seja rápida, precisa e de baixo custo. Uma vez validada e padronizada, esta metodologia poderá ser empregada no desenvolvimento de métodos diagnósticos de infecções por outros fungos, vírus e bactérias, podendo ser utilizada tanto no contexto da pesquisa científica como de inovação e diagnóstico.

Palavras-chave: candidíase; LAMP; diagnóstico

2. DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

Vanessa Suñé Mattevi – Doutora em Genética e Biologia Molecular. Professora Associada da UFCSPA na área de Biologia Molecular, responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular desta Instituição, orientadora permanente nos Programas de Pós-graduação em Biociências e Patologia da UFCSPA. Líder do grupo de pesquisa da UFCSPA "Aspectos moleculares na caracterização e tratamento de doenças multifatoriais".

Helena Schirmer - Doutora em Biologia Celular e Molecular, tem experiência na área de micologia trabalhando especialmente na área do diagnóstico das infecções fúngicas causadas por fungos filamentosos e leveduras. Especialista em micologia pelo Instituto Pasteur - França. Membro do grupo de pesquisa "Aspectos moleculares na caracterização e tratamento de doenças multifatoriais", atuando na linha de micologia molecular. Iniciou em 2018 trabalho sobre perfil de sensibilidade de leveduras, com foco na *Candida* sp. Atualmente é Professora Adjunta de Parasitologia e Micologia da UFCSPA.

Cecília Bitencourt Severo - Doutora em Ciências Pneumológicas. Atualmente é Professora Adjunta de Parasitologia e Micologia da UFCSPA e micologista do Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Membro do grupo de pesquisa "Aspectos moleculares na caracterização e tratamento de doenças multifatoriais", atuando na linha de micologia molecular.

Amanda Herter – Biomédica egressa da UFCSPA, aluna do Programa de Pós-graduação em Biociências no nível de Mestrado, sob orientação da Professora Vanessa Suñé Mattevi.

3. CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

O gênero *Candida* consiste em um grupo de leveduras oportunistas associado desde a infecções leves de pele e mucosa até a doenças invasivas severas. Presente na microbiota normal dos sistemas gastrointestinal e genitourinário, esse fungo é frequentemente responsável por infecções nesses locais, como a candidíase de orofaringe e a candidíase vulvovaginal. Em pacientes hígidos, as micoses provocadas por *Candida* sp não costumam ter prognóstico ruim; no entanto, em pacientes com o sistema imunológico comprometido, o quadro pode evoluir para a forma disseminada da candidíase, causando

doenças graves como candidemia, endocardite e infecções do sistema nervoso central (FALLAHI et al., 2019).

Nos últimos anos, a ocorrência de doenças invasivas causadas por fungos oportunistas tem aumentado e o gênero *Candida* se destaca como o principal agente etiológico (SCHMIEDEL e ZIMMERLI, 2016). A taxa de mortalidade da candidíase invasiva está entre 20% e 40%, porém pode chegar a até 70% em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (MARRA et al., 2011; KULLBERG e ARENDRUP, 2015). A candidemia é a apresentação mais comum da candidíase invasiva e uma das principais infecções sanguíneas em imunocomprometidos. Estima-se que sua incidência seja por volta de 3,88 casos a cada cem mil habitantes (QUINDÓS et al., 2018; VASILEIOU et al., 2020).

As espécies de *Candida* mais encontradas em isolados sanguíneos são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (QUINDÓS et al., 2018). *Candida albicans* ainda é a mais comumente associada à candidíase invasiva. Contudo, outros achados, especialmente de *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, têm sido frequentes nos últimos anos. Os principais fatores predisponentes, que também estão relacionados a essa mudança na etiologia da infecção, são idade inferior a um ano e superior a 65 anos, doenças hematológicas e oncológicas, longas internações hospitalares, cateter venoso central e o uso de corticoesteroides, antibióticos e antifúngicos (BERGAMASCO et al. 2013). Fu et al. (2017) relataram que mais de 55% dos isolados sanguíneos de neonatos correspondiam a *Candida* não-*albicans*, dos quais cerca de 33% eram *C. glabrata*. No Brasil, Trabasso et al. (2014) relataram achados de espécies não-*albicans* em isolados de pacientes de alto risco (principalmente *C. tropicalis* e complexo *C. parapsilosis*), revelando elevada taxa de mortalidade associada ao complexo *C. parapsilosis* (47,2%).

Além das espécies já citadas, há um crescente número de casos de *C. auris* relatados em todo o mundo. No Brasil, ela foi isolada pela primeira vez no final de 2020, no estado da Bahia, em amostra de cateter de paciente internado na unidade de tratamento intensivo. A grande importância médica dessa espécie se deve a sua resistência às principais classes de antifúngicos utilizados (polienos, azóis e equinocandinas) e a sua capacidade de causar infecções disseminadas que podem levar à morte (YAMAMOTO et al., 2018; ANVISA, 2020).

Além do problema de resistência antifúngica associado à *C. auris*, as demais espécies não-*albicans* de *Candida* são normalmente menos suscetíveis e até resistentes ao fluconazol, o que dificulta o tratamento e torna necessário o uso de outros antifúngicos considerados mais tóxicos ao organismo, como as equinocandinas e a anfotericina B. Dessa forma, o aumento na incidência dessas espécies aumenta consideravelmente a morbidade e a mortalidade em pacientes de risco. Assim, o diagnóstico precoce da micose se torna

extremamente relevante para que se obtenha um bom resultado no tratamento, melhorando as chances de sobrevivência desses pacientes (LAMOTH et al. 2018; QUINDÓS et al., 2018; KOTHALAWALA et al., 2019).

Na presente pandemia causada pelo vírus SARS-CoV2, onde os pacientes graves permanecem hospitalizados por longo tempo, agravados pela intubação, diabetes e tempestade de citocinas, as co-infecções por fungos têm sido detectadas em uma frequência aumentada (SILVA et al., 2020). Os fungos que têm sido mais relatados em pacientes com COVID-19 hospitalizados têm sido aqueles que normalmente colonizam o trato respiratório e a mucosa da orofaringe, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Candida*. Enquanto o gênero *Aspergillus* causa principalmente infecções pulmonares nestes pacientes, as espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, causam infecções disseminadas e são encontradas na corrente sanguínea. Além do agravamento da doença causado pela co-infecção, a emergência de fungos multirresistentes a terapias farmacológicas e a imunossupressão dos pacientes associada ao uso de glicocorticóides e outros fármacos, que pode favorecer infecções fúngicas oportunistas, tornam o rápido diagnóstico destes fungos de importância ainda maior no contexto atual.

3.1. Diagnóstico convencional

O diagnóstico da candidíase normalmente é feito através do exame direto com hidróxido de potássio 10%, isolamento em meio ágar *Sabouraud* dextrose com cloranfenicol e provas bioquímicas ou crescimento em meio cromogênico *Candida*. Na microscopia, são observados blastoconídios, pseudohifas e hifas hialinas septadas, estruturas que definem o pleomorfismo do gênero; já a macroscopia, em geral, é marcada por colônias brancas cremosas de superfície lisa (MURRAY, 2017). Embora muito utilizados na rotina laboratorial, esses métodos tradicionais apresentam limitações, como a baixa sensibilidade e a demora na identificação. Em amostras de sangue, por exemplo, o cultivo não consegue constatar a presença da levedura em até 70% dos casos de candidemia porque a técnica detecta apenas estruturas fúngicas ativas (FORTÚN et al., 2014; QUINDÓS, 2014).

3.2. Diagnóstico molecular

A fim de superar as limitações das metodologias tradicionais de diagnóstico, tem se investido cada vez mais em técnicas de biologia molecular para a identificação dos fungos. Os testes moleculares incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações como PCR em tempo real, *multiplex* PCR e *nested* PCR. Eles apresentam elevada sensibilidade e menor tempo de resultado, permitindo um diagnóstico preciso e rápido para as micoses invasivas. No entanto, a necessidade de equipamentos sofisticados e o alto

custo desses métodos dificultam a sua aplicabilidade em muitos laboratórios. Estas limitações levaram ao desenvolvimento das técnicas de amplificação isotérmica do DNA.

3.2.1 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

Há alguns anos, vem sendo empregada na microbiologia a técnica de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) para a detecção de bactérias e genes de resistência, bem como para a identificação de fungos anemófilos e patogênicos, em isolados e em amostras clínicas (YAMAMOTO et al., 2015; CHEN et al., 2016; NOGUCHI et al., 2017; YAMAMOTO et al., 2018). Essa metodologia foi descrita pela primeira vez por Notomi et al. (2000) e se destaca por apresentar sensibilidade, especificidade e acurácia bastante elevadas e por ser menos exigente que as técnicas de PCR, embora ainda seja pouco difundida.

O método baseia-se em uma reação isotérmica de amplificação do DNA mediada por *loop*, utilizando um conjunto de quatro *primers*: dois *primers* internos e dois *primers* externos - além da possibilidade de utilizar os *primers* “*loop*” internos e/ou externos, que melhoram o desempenho da técnica. Os *primers* reconhecem 6 a 8 regiões distintas do DNA alvo para uma reação de amplificação altamente específica. Uma DNA polimerase de deslocamento de fita inicia a síntese e dois primers especialmente projetados formam estruturas em alça (*loop*) para facilitar as rodadas subsequentes de amplificação por meio da extensão nas alças e anelamento adicional de primers. Os produtos de DNA são muito longos (> 20 kb) e formados a partir de numerosas repetições da sequência alvo curta (80–250 bp), conectada com regiões de *loop* de fita simples em concatâmeros longos. Esses produtos não são normalmente apropriados para posterior manipulação, mas a amplificação do alvo é tão extensa que vários modos de detecção são possíveis. Diferente da PCR, a reação acontece em uma única temperatura, sem a necessidade do uso de termociclador, gerando inúmeras cópias do material genético em cerca de 60 minutos. Além da rapidez e do baixo custo pela dispensa de equipamentos sofisticados, a técnica de LAMP não exige extração prévia de DNA da amostra e a leitura do resultado pode ser feita pela simples inspeção visual da turbidez ou mudança de cor, sem a necessidade de eletroforese posterior (NOTOMI et al., 2015).

A técnica de LAMP tem sido utilizada com sucesso na detecção de numerosos vírus e bactérias, tendo passado recentemente a ser aplicada no diagnóstico da Covid-19 (SUBALI e WIYNONO, 2021). Fallahi et al. (2019) testaram a técnica de LAMP na identificação de *C. albicans*, revelando 100% de concordância dessa com os métodos tradicionais de meio cromogênico para *Candida* e teste do tubo germinativo. Ainda, outros estudos demonstram a eficácia da técnica de LAMP na detecção de leveduras de

importância médica, tais como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, complexo *C. parapsilosis*, *C. auris* e *Saccharomyces cerevisiae* (TRABASSO et al. 2014; YAMAMOTO et al., 2018).

3.3. Justificativa

As doenças invasivas causadas por fungos oportunistas são cada vez mais frequentes em todo o mundo e, apesar de não serem tão prevalentes quanto aquelas causadas por bactérias, representam uma importante condição naqueles pacientes cujo sistema imunológico está debilitado. Os principais patógenos associados a essas infecções são as leveduras do gênero *Candida*, que normalmente constituem a microbiota dos sistemas gastrointestinal e genitourinário. Porém, graças ao aumento das internações hospitalares em centros de unidades intensivas, ao crescente número de pacientes em tratamento oncológico, transplantados e em outras condições de comprometimento imunológico, tem se constatado uma elevação nos casos de candidíase invasiva – a forma disseminada da infecção por *Candida* sp. (BERGAMASCO et al. 2013; QUINDÓS et al., 2018; FALLAHI et al., 2019). Ainda, estudos mais recentes provam a existência de casos de candidíase associada a COVID-19, uma vez que a infecção pelo SARS CoV-2 coloca o paciente em situação de alto risco para o desenvolvimento da micose – internação prolongada, uso de cateter venoso central, antibióticos e corticoesteroides (CHOWDHARY et al., 2020; WHITE et al. 2020).

A espécie predominante nos achados laboratoriais da candidíase invasiva é *C. albicans*; contudo, esse perfil tem se modificado, havendo um aumento na incidência de espécies não *albicans*, como *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Essas espécies são menos suscetíveis e até resistentes ao tratamento convencional com fluconazol, levando a um pior prognóstico especialmente nos pacientes imunocomprometidos. Dessa maneira, um resultado laboratorial rápido e preciso torna-se essencial para garantir o diagnóstico precoce e a terapêutica adequada (QUINDÓS et al., 2018).

As metodologias tradicionais de isolamento e identificação de *Candida* sp, apesar de amplamente utilizadas, são demoradas e pouco sensíveis. A confirmação de candidemia pela cultura de amostra de sangue, por exemplo, só é possível em cerca de 40% dos pacientes, pois a técnica detecta apenas estruturas fúngicas viáveis em infecções ativas. Isto implica com que não seja possível o diagnóstico de candidemia em pacientes de alto risco sem manifestação clínica da doença (FORTÚN et al., 2014; QUINDÓS, 2014). Os testes moleculares têm se mostrado uma alternativa eficiente na obtenção de um diagnóstico rápido e preciso, mas apresentam desvantagens quanto à complexidade e ao custo das técnicas, o que impede a sua implantação em muitos laboratórios de rotina.

No sentido de superar as limitações das demais metodologias, a técnica de LAMP se mostra bastante promissora, uma vez que é de simples e rápida execução. Além disso, diferente de outras técnicas de amplificação isotérmica, a LAMP não exige etapas como extração de DNA ou realização prévia de PCR, nem a utilização de enzimas de alto custo (NOTOMI et al., 2015).

Embora existam estudos a respeito da utilização da técnica de LAMP na identificação de *Candida* sp, essa ainda é pouco utilizada. A utilização da LAMP para detecção de espécies multirresistentes aos antifúngicos, como *C. auris*, é altamente promissora, podendo auxiliar no controle de infecção hospitalar. Porém, ainda se faz necessário estudar a validação da técnica em uma gama mais ampla de isolados clínicos, para avaliar aspectos como a efetividade e escolha de *primers*, o tempo e a temperatura de reação mais adequados, bem como sensibilidade e especificidade para as diferentes espécies encontradas em nosso meio.

4. OBJETIVOS

Frente ao exposto, o presente projeto tem os seguintes objetivos.

4.1. Objetivo geral

Validar a metodologia de amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP) para detecção de *Candida* sp.

4.2. Objetivos específicos

- Implantar a técnica de LAMP no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA;
- Comparar a identificação de isolados de *Candida* sp a partir da técnica de LAMP com a identificação pela reação em cadeia da polimerase;
- Determinar a especificidade e a sensibilidade de detecção da reação de LAMP para identificação de *Candida* sp.

5. METODOLOGIA

O presente estudo apresenta um delineamento experimental não-randomizado, no qual as etapas de manipulação direta dos isolados de *Candida* sp serão realizadas no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). A identificação molecular (LAMP e PCR) será realizada no Laboratório de Biologia Molecular da mesma instituição.

5.1. Isolados

Os isolados de *Candida* sp utilizados no trabalho serão provenientes da micoteca do Laboratório de Micologia da UFCSPA, que conta com cerca de mil isolados do gênero.

5.1.1 Preparo da amostra para a técnica de LAMP

A partir do isolado de *Candida* sp. será preparada uma suspensão em solução fisiológica na concentração equivalente a 5 na escala de McFarland.

5.1.2 Preparo da amostra para a PCR

A partir da suspensão preparada conforme item 4.1.1, será realizada a etapa de extração de DNA a fim de proceder a execução da técnica de PCR. O protocolo de extração se dará de acordo com as orientações do fabricante.

5.2. PCR

As sequências correspondentes às espécies de *Candida* serão obtidas do banco de dados *GenBank* e os *primers* serão desenhados utilizando ferramentas *on-line* apropriadas. Para confirmar a especificidade dos *primers* LAMP para a detecção dos fungos, um ensaio de PCR será realizado com os dois primers externos, contendo 0,1 U de Taq DNA polimerase, 5 μmol / L de cada um dos primers, 10 mmol / L de Tris-HCl, pH 8,3 (a 25 ° C), 50 mmol / L de KCl, 1,5 mmol / L de MgCl_2 , 250 μmol / L de cada dNTP e 1 μL de extraído DNA (100 ng / μL). Dez microlitros dos produtos de PCR serão submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 μg / mL) para visualização sob luz ultravioleta. Os reagentes para a realização desta etapa já estão disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

5.3. Técnica de LAMP

Inicialmente, a suspensão do microrganismo será aquecida por 5 minutos a 99°C. Em seguida, a suspensão será adicionada ao mix para LAMP contendo 1,6 uM de cada primer interno, 0,2 mM de cada primer externo, 3,2U de Bst polimerase, 900 μM de cada dNTP, 0,8M de betaína, 3mM de MgCl_2 e tampão para um volume final de 10uL. As condições ótimas de tempo de aquecimento para amplificação do produto serão validadas durante a execução do trabalho. A leitura da amplificação será realizada através de inspeção visual da mudança de coloração e confirmada após da adição de solução *SYBR Green* e visualização em luz ultravioleta. Serão utilizadas amostras de DNA extraídas das amostras com kits comerciais como controles positivos e reações sem adição de amostras biológicas como controles negativos.

5.4. Determinação da especificidade da técnica de LAMP

A especificidade da técnica de LAMP será determinada pela inclusão de outros gêneros de fungos: *Trichosporon* sp, *Cryptococcus* sp, *Rhodotorula* sp, *Saccharomyces* sp e *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp e *Fusarium* sp.

5.5. Determinação da sensibilidade da técnica de LAMP

Uma diluição em série de dez vezes preparada a partir de DNA extraído de cepa padrão dos microrganismos de 1 ng a 1 fg será usada para determinar a sensibilidade analítica da técnica LAMP.

5.6. Análise estatística

As variáveis serão descritas através de frequências absolutas e relativas. O teste de McNemar será utilizado para comparação de sensibilidade entre as técnicas e a determinação da concordância entre LAMP e PCR será realizada através do coeficiente *kappa*. As análises serão realizadas através do programa SPSS v.20.0.

6.6. Aspectos éticos

Os objetos deste estudo serão os fungos isolados em cultura e disponíveis na micoteca do Laboratório de Micologia da UFCSPA. Desta forma, o presente projeto não necessita avaliação por comitê de ética em pesquisa em seres humanos e está registrado na Comissão de Pesquisa da UFCSPA.

7. CRONOGRAMA

O plano de execução das atividades seguirá conforme o quadro a seguir. Uma vez que as amostras a serem utilizadas pertencem à micoteca da UFCSPA, as análises podem aguardar a chegada dos reagentes e a liberação dos laboratórios da UFCSPA para a sua execução, sem prejuízos.

Atividades	Mês de execução											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Repiques dos isolados da micoteca												
Extração de DNA												
LAMP												
PCR												
Análise dos resultados												
Redação do artigo												

8. PRODUTOS ESPERADOS

Espera-se que o presente projeto de pesquisa gere uma Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências da UFCSPA bem como resumos a serem apresentados em eventos e um artigo científico a ser publicado em periódico de circulação internacional.

9. POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO E/OU DIFUSÃO

A partir do desenvolvimento do presente projeto, espera-se implantar na UFCSPA uma metodologia inovadora, rápida e de baixo custo para o diagnóstico de infecções oportunistas por *Candida sp.* Uma vez validada e padronizada, esta metodologia poderá ser empregada no diagnóstico de infecções por outros fungos, vírus e bactérias, podendo ser utilizada nos mais diferentes serviços. Também espera-se que, pela sua simplicidade e rapidez, a mesma possa vir a ser utilizada nas aulas práticas das disciplinas de Micologia e Biologia Molecular da UFCSPA, promovendo a integração dos conhecimentos das duas disciplinas.

Espera-se que divulgação dos resultados do presente estudo em eventos destinados à comunidade acadêmica e um artigo científico contribua para consolidar o nome da UFCSPA como instituição de pesquisa. A divulgação do presente estudo nos perfis de redes sociais da Instituição e do PPG em Biociências, bem como em eventos destinados à comunidade em geral, como o UFCSPA Acolhe, contribuirá para a divulgação do papel social e da relevância da Universidade.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa no 01/2020.

Bergamasco MD, Garnica M, Colombo AL, Nucci M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses*. 2013; 56:256–263.

Chowdhary A, Tarai B, Singh A, Sharma A. Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients, India, April–July 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 2020, 26.

Chen M, Zhou J, Li J, Li M, Sun J, Fang WJ, Al-Hatmi AM, Xu J, Boekhout T, Liao WQ, Pan WH. Evaluation of five conventional and molecular approaches for diagnosis of cryptococcal meningitis in non-HIV-infected patients. *Mycoses*. 2016; 59:494–502. doi:10.1111/myc.12497.

Fallahi S, et al. Diagnosis of *Candida albicans*: conventional diagnostic methods compared to the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Archives of Microbiology. 2019. doi: 10.1007/s00203-019-01736-7

Fortún J, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. J Antimicrob Chemother. 2014; 69:3134–3141.

Fu J, et al. Epidemiology of *Candida albicans* and *non-C.albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. BMC Infectious Diseases 2017; 17:329. doi: 10.1186/s12879-017-2423-8

Kasahara K, Ishikawa H, Sato S, Shimakawa Y, Watanabe K. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification assays to detect medically important yeasts in dairy products. FEMS Microbiol Lett 357. 2014; 208–216. doi: 10.1111/1574-6968.12512

Kothalawala M, Jayaweera AAS, Arunan S, Jayathilake A. The emergence of non-albicans candidemia and evaluation of HiChrome Candida differential agar and VITEK2 YST® platform for differentiation of Candida bloodstream isolates in teaching hospital Kandy, Sri Lanka. BMC Microbiology. 2019; 19:136. doi: 10.1186/s12866-019-1518-3

Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. New Engl. J. Med. 2015; 373, 1445–1456.

Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. J Antimicrob Chemother. 2018; 73(Suppl. 1):i4–i13.

Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. J. Clin. Microbiol. 2011, 49, 1866–1871.

Murray PR. Microbiologia Médica. 8ª Edição, 2017.

Noguchi H, Iwase T, Omagari D, Asano M, Nakamura R, Ueki K, Shinozuka K, Kaneko T, Tonogi M, Ohki H. Rapid detection of *Candida albicans* in oral exfoliative cytology samples by loop-mediated isothermal amplification. J. Oral Sci. 2017; 59:541–547. doi: 10.2334/josnusd.16-0717.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28: E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.

Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. J Microbiol. 2015; 53(1):1–5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.

Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol. 2014; 31:42–48

Quindós G, et al. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. International Microbiology. 2018. doi: 10.1007/s10123-018-0014-1

Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. Swiss Med Wkly. 2016; 146:w14281. doi: 10.4414/smw.2016.14281

Silva LN, de Mello TP, de Souza Ramos L, Branquinha MH, Roudbary M, Dos Santos ALS. Fungal Infections in COVID-19-Positive Patients: A Lack of Optimal Treatment Options. Curr Top Med Chem. 2020;20(22):1951-1957. doi: 10.2174/156802662022200917110102.

Subali AD, Wiyono L. Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. Pathog Glob Health. 2021 Jun 4:1-11. doi: 10.1080/20477724.2021.1933335. Epub ahead of print.

Trabasso P, et al. Isolation and Drug Susceptibility of *Candida parapsilosis* Sensus Lato and other Species of *C. parapsilosis* Complex from Patients with Blood Stream Infections and Proposal of a Novel LAMP Identification Method for the Species. Mycopathologia. 2014. doi: 10.1007/s11046-014-9830-9

Vasileiou E, et al. Candidemia in Children with Malignancies: Report from the InfectionWorking Group of the Hellenic Society of Pediatric Hematology-Oncology. J. Fungi. 2020; 6, 276. doi:10.3390/jof6040276

Yamamoto N, Hamaguchi S, Akeda Y, Santanirand P, Kerdsin A, Seki M, et al. Clinical Specimen-Direct LAMP: A Useful Tool for the Surveillance of blaOXA-23-Positive Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE 10(7):e0133204, 2015.

Yamamoto M, Alshahni MM, Tamura T, Satoh K, Iguchi S, Kikuchi K, Mimaki M, Makimura K. Rapid detection of *Candida auris* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Clin Microbiol; 2018; 56:e00591-18. doi: 10.1128/JCM.00591-18.

White PL, Dhillon R, Cordey A, Hughes H, Faggian F, Soni S, Pandey M, Whitaker H, May A, Morgan M, et al. A national strategy to diagnose COVID-19 associated invasive fungal disease in the ICU. Clin. Infect. Dis. 2020.

EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE
EXERCÍCIO FÍSICO NO SISTEMA
IMUNOLÓGICO, NA FUNCIONALIDADE DO
ASSOALHO PÉLVICO E NA QUALIDADE DE
VIDA DE ATLETAS

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Efeito de diferentes intensidades de exercício físico no sistema imunológico, na funcionalidade do assoalho pélvico e na qualidade de vida de atletas

Equipe de Trabalho:

Coordenador: Alessandra Peres

Alunos Pós-Graduação: Joane Severo Ribeiro (PPG Ciências da Reabilitação)
Priscila Flores (PPG Biociências)
Chaiane Aiolfi Tilton (PPG Ciências da Nutrição)
Caroline Joana Kuyven (PPG Ciências da Nutrição)
Caroline Portela de Oliveira (PPG Biociências)
Bruna Isidoro (PPG Biociências)

Alunos Graduação: Bruno Maurício Conterno Guimarães (Curso de Biomedicina)
Sofia de Lima Silva (Curso de Biomedicina)
Gabriela Wrase (Curso de Fisioterapia)
Alisson Santana da Luz (Curso de Biomedicina)
Lara Scopel (Curso de Biomedicina)

**Porto Alegre
2022**

RESUMO

A prática de exercício físico vem conquistando cada vez mais espaço na rotina dos indivíduos, na busca de bem estar, melhora e /ou manutenção da saúde e também na conquista de desafios pessoais. Essa tem influência sobre o sistema imunológico, gerando uma cascata de citocinas pró e anti-inflamatórias, sendo que o mesmo responde de forma aguda e crônica aos efeitos do exercício. Apesar do exercício físico, trazer muitos benefícios para a saúde, sabe-se que quando praticado de forma extenuante, pode influenciar no mau funcionamento dos sistemas corporais. Os músculos do assoalho pélvico (MAP) fazem parte do sistema de estabilização do corpo, sendo interdependente de outros sistemas corporais, e podem sofrer disfunções por ação direta do impacto gerado por exercício físico, principalmente os de maior impacto como a corrida e o ciclismo. Dessa forma, o objetivo deste estudo é compreender os efeitos do exercício físico, em diferentes intensidades, sobre o sistema imunológico, funcionalidade do assoalho pélvico e a qualidade de vida dos atletas. O estudo será transversal comparativo entre grupos de diferentes práticas esportivas e volumes de treino semanais, onde serão aplicados questionários para a obtenção informações de saúde e qualidade de vida, e análise salivar para a quantificação de marcadores imunológicos. A saliva será utilizada para a dosagem de cortisol, proteína C reativa (PCR), testosterona, melatonina, vitamina D, imunoglobulinas de COVID-19, imunoglobulina A (IgA), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), de interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) através do método de ELISA.

Palavras-chave: Atletas, assoalho pélvico, sistema imune, exercício físico.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP: dor pélvica

DS: disfunção sexual

DSF: disfunção sexual feminina

EVA : escala visual analógica de dor

FS: função sexual

FSFI: Female Sexual Function Index (Índice de função sexual feminina)

IgA: imunoglobulina A

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

IF: incontinência fecal

IU: incontinência urinária

MAP: músculos do assoalho pélvico

NK: células natural Killers

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR : proteína C reativa

PFDI-20: Pelvic Floor Disability Index (Questionário de Desconforto no Assoalho Pélvico)

QV: qualidade de vida

TC: termo de confidencialidade

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	7
1.1 PROBLEMA DE PESQUISA.....	8
1.2 OBJETIVOS	8
1.2.1 Objetivo Geral	8
1.2.2 Objetivos Específicos.....	8
1.2 Hipóteses	9
1.3 Justificativa	9
2- REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 Sistema Imunológico e Exercício	10
2.2 Disfunções Do Assoalho Pélvico.....	11
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Tipo de Estudo	15
3.2 Delineamento experimental.....	15
3.2.1 Etapas	15
3.2.2 Intervenções	15
3.3 Amostra do Estudo	16
3.3.1 Critérios de Inclusão:	16
3.3.2 Critérios de Exclusão:	16
3.4 Instrumentos De Pesquisa	17
3.4.1 Questionário de Anamnese e Volume do exercício físico.....	17
3.4.2 Escala Visual Analógica da Dor – EVA	17
3.4.3 Ficha de avaliação adaptada de Etienne e Waitman.....	17
3.4.4 Questionário <i>Female Sexual Function Index</i> (FSFI).....	18
3.4.5 Questionário de Desconforto no Assoalho Pélvico - Pelvic Floor Disability Index (PFDI-SF-20)	18
3.4.6 International Consultation On Incontinence Questionnaire - Short Form (ICIQ – SF)	19
3.4.7 Análise dos marcadores inflamatórios	19
3.4.8 Qualidade de Vida - WHOQOL-BREF.....	19
3.4.9 Avaliação do Perfil Nutricional.....	19
3.5 Análise Estatística	20
3.6 Riscos E Benefícios.....	20
3.7 Conduta Ética	21

3.8 Descarte de Resíduos	21
3.9 Cronograma.....	21
4- Orçamento	23
5- REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	24
ANEXO 1 – FICHA DE ANAMNESE E DE VOLUME DE TREINO.....	25
ANEXO 2 – ESCALA VISUAL ANALÓGICA (EVA).....	27
ANEXO 3 - FICHA DE AVALIAÇÃO ADAPTADA DE ETIENNE E WAITMANN.....	28
ANEXO 4 – FEMALE SEXUAL FUNCTION INDEX (FSFI)	30
ANEXO 5 – QUESTIONÁRIO DE DESCONFORTO NO ASSOALHO PÉLVICO- PELVIC FLOOR DISTRESS INVENTORY - PFDI-SF-20	36
ANEXO 6 - INTERNATIONAL CONSULTATION ON INCONTINENCE QUESTIONNAIRE - SHORT FORM (ICIQ – SF)	38
ANEXO 7 – WHOQOL-BREF.....	40
ANEXO 8– FICHA DE CONSUMO ALIMENTAR	45
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	46
APÊNDICE B – Termo de confidencialidade	49
APÊNDICE C – TERMO DE ORIENTAÇÕES AO VOLUNTÁRIO.....	50
APÊNDICE D – Termo de AUTODECLARAÇÃO DE DOENÇAS GENGIVAIS E PERIODONTAIS.....	52

1- INTRODUÇÃO

A prática de exercício físico tem muitas nuances, visto que depende do tipo, da quantidade, da intensidade e o volume de treino, assim como depende das características individuais de seus praticantes, sexo, idade, estado geral de saúde. E apresenta efeitos agudos e crônicos, de sua prática sobre os sistemas corporais, inclusive do sistema imune.

As respostas do exercício a curto ou longo prazo, poderão ser benéficas ou maléficas ao organismo dependendo da intensidade praticada. Visto que práticas moderadas pode estimular parâmetros imunológicos, reduzindo o risco de infecções, por exemplo, enquanto que uma prática mais extenuante pode promover um decréscimo desse mesmo sistema, proporcionando maior susceptibilidade à infecções, principalmente relacionadas à mucosas do trato respiratório superior e genitourinário.

A crescente exponencial na prática de exercício físico, nos remete também à crescente pela busca da prática de corrida de rua, não só no Brasil, como no mundo e dia a dia vem ganhando cada vez mais adeptos (SHIPWAY e HOLLOWAY , 2016; GOTAAS, 2013). No que se refere a corrida, isso deve-se também pela facilidade de sua prática, visto que não é necessário materiais caros e muito específicos, além de proporcionar sociabilidade, melhora da saúde e redução da ansiedade e estresse. No Brasil, estima-se que pelo menos 5% da população pratique essa modalidade de corrida – cerca de 10 milhões de pessoas, fato que pode ser explicado por ser uma atividade de fácil prática e de baixo custo para seus adeptos (HINO et al., 2015).

Tal prática, ao longo do tempo, vai gerando a busca por desafios pessoais a serem alcançados, aumentam-se as distâncias, muda-se os tipos de solo, diferentes cidades, e também se busca novas modalidades esportivas. E nessa busca pelo novo, muitos deparam-se com o triathlon, que envolve natação, ciclismo e corrida, que são praticadas de forma contínua e ininterrupta, demanda um volume de treino semanal mais intenso. O triathlon apresenta distâncias iniciais, tendo 750 metros (m) de natação, 20 quilômetros (Km) de ciclismo e 5Km de corrida, e a prova de maior distância que é o IronMan, sendo 3,8Km de natação, 180Km de ciclismo e 42Km de corrida.

Pensando nos efeitos, das diferentes intensidades e volumes de treino sobre os sistemas, verifica-se que no sistema imunológico temos relação de quanto mais, pior poderá ser ao sistema imune, pois predispõe ao risco de episódios infecciosos. Nesse caso, doses moderadas poderiam ser melhores ao organismo à longo prazo. Assim como, no sistema musculoesquelético do sistema genitourinário, exercícios intensos tem sido considerado um potencial fator de risco para as disfunções do AP, entretanto outros fatores podem contribuir para a etiopatogenia destas

disfunções, como a obesidade, idade avançada, número de partos vaginais, doenças neurológicas, diabetes, entre outros (MEMON e HANDA, 2013).

Embora a prática do exercício físico venha num crescimento exponencial ainda há poucos estudos que reportem o efeito de diferentes intensidades a nível sistêmico em seus praticantes. Dessa forma, este projeto investigará modalidades esportivas diferentes, com diferentes intensidades de treino, e seus efeitos sobre o sistema imunológico, na funcionalidade do assoalho pélvico e na qualidade de vida dos atletas. Com isso espera-se compreender melhor a ação do exercício físico nos marcadores imunológicos, nos padrões pró e anti-inflamatórios pré e pós exercício, e a susceptibilidade à infecções do trato respiratório superior e genitourinário.

1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

Qual o impacto de diferentes intensidades de exercício físico na resposta imunológica, na funcionalidade do assoalho pélvico e na qualidade de vida de atletas?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Compreender os efeitos do exercício físico, em diferentes intensidades, sobre o sistema imunológico, funcionalidade do assoalho pélvico e a qualidade de vida de atletas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os volumes e intensidades de exercícios físicos dos atletas investigados;
- Entender a relação entre volume de treino e a presença de infecções de mucosas, de trato respiratório e genitourinário de atletas;
- Entender a relação entre volume de treino e possíveis disfunções do assoalho pélvico de atletas;
- Entender a relação entre volume de treino e a qualidade de vida de atletas;
- Quantificar os níveis de marcadores imunológicos: cortisol, proteína C reativa (PCR), imunoglobulina-a (IgA); interleucina-1 (IL-1), interleucina-4 (IL-4),

interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de necrose tumoral- α (TNF- α), imunoglobulinas do COVID-19 em saliva no pré e pós treino;

- Quantificar a produção de testosterona e melatonina pré e pós treino;
- Avaliar a qualidade de vida de atletas;
- Avaliar funcionalidade de assoalho pélvico de atletas;
- Verificar a relação entre dosagens de vitamina D e disfunções de assoalho pélvico;
- Delinear o perfil ginecológico de mulheres atletas;
- Avaliar a função sexual de mulheres atletas;
- Verificar se há relação do perfil alimentar e de suplementação, bem como da intensidade do exercício com os índices inflamatórios dos atletas amadores;

1.2 Hipóteses

O volume de treino interfere na resposta imunológica de atletas, deixando-os mais propensos à infecções de mucosas (trato respiratório e ginecológico).

O volume de treino não interfere na resposta imunológica de atletas, não havendo maior propensão à infecções de mucosas (trato respiratório e ginecológico).

1.3 Justificativa

A prática de exercício físico está cada vez mais presente na rotina dos indivíduos, sabe-se dos benefícios de sua prática constante, entretanto não sabemos qual o efeito de volumes mais intensos de treinos no sistema imunológico dos atletas amadores. Por isso, este estudo, visa compreender os efeitos dos volumes de treino na resposta imunológica desses indivíduos, bem como compreender se há correlação entre volume de treino e propensão à infecções de mucosas, sistema respiratório e genitourinário, qualidade de vida e na funcionalidade do assoalho pélvico. A utilização de saliva como amostra biológica é uma forma de reduzir o contato com os indivíduos a serem avaliados, bem como ampliar as formas de análise bioquímicas em pesquisas. Ela tem a vantagem que pode ser coletada várias vezes e de forma indolor, sem ser invasiva ou trazer maiores desconfortos aos indivíduos.

Desse modo, considerando os fatores descritos e a existência de poucos estudos sobre o tema, encontra-se a relevância desse estudo.

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistema Imunológico e Exercício

O sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo contra vírus, bactérias, moléculas estranhas ao organismo e também atua no combate ao crescimento anormal de células cancerosas. A resposta imunológica pode ser dividida em resposta inata e resposta adaptativa. A resposta inata é a primeira linha de defesa do organismo, ela tem por função bloquear a entrada de patógenos ou eliminar rapidamente os que conseguem entrar, é inespecífica e não gera memória, tem a participação de células como neutrófilos, macrófagos, células natural killers (NK), células dendríticas e moléculas microbidas, ela inclui barreiras físicas (ex.: pele e mucosa), químicas (ex.: secreções), mecânicas (ex.: movimentos peristálticos) e biológicas (ex.: microbiota). A resposta imune adaptativa gera uma resposta altamente específica, a qual gera memória, mas é uma resposta imunológica mais lenta e envolve principalmente os linfócitos T (TCD4+ e TCD8+) e B e seus produtos, citocinas e anticorpos. Essa pode ser dividida em resposta imune humoral (conduzida pelos anticorpos) e resposta imune celular (conduzida por células, como os linfócitos e os macrófagos). Os linfócitos T auxiliares podem se diferenciar em células Th1 e Th2, as quais produzem padrões diferentes de citocinas.

As citocinas podem ser classificadas como pró ou anti-inflamatórias, conforme a função que irão desempenhar no organismo. Podemos citar como principais citocinas anti-inflamatórias a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento beta (TGF- β), que podem, como uma de suas funções, inibir a ação das citocinas pró inflamatórias, as quais podemos citar a interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interterferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α).

Alguns estudos tem abordado o efeito do exercício sobre o sistema imunológico, tanto de forma aguda quanto crônica (DAVIDSON et al., 2006). De forma aguda, o exercício aumenta as funções imunes naturais por algumas horas, enquanto que de forma crônica tem-se uma melhora na imunidade, pois aumentam a atividade citotóxica das células NK, e a redução das funções depreciativas ao organismo das células T e na produção de citocinas pró-inflamatórias.

O exercício de intensidade moderada pode estimular aspectos relacionados à imunidade celular e assim diminuir o risco de infecções, enquanto o exercício de alta intensidade pode promover um decréscimo destes mesmos, aumentando assim a

susceptibilidade à doenças infecciosas (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; LEANDRO, 2007). Sugere-se que os atletas, praticantes de exercício físico extenuante, sejam mais susceptíveis à infecções possivelmente por uma imunossupressão crônica, em que tem-se uma redução da atividade das NK, neutrófilos, linfócitos T e B e a diminuição da IgA salivar (DIMENT et al., 2015; MERCER e DENSMORE, 2005; SUZUKI e SHIGEYUKI, 2002). O exercício tem uma ação corporal sistêmica, mas grandes variações de intensidade e volume de treino poderão trazer diferentes efeitos em seus praticantes.

Segundo autores, há uma percepção entre atletas e seus treinadores de que altas cargas de treinamento e competições, de forma crônica, sem respeitar o devido tempo de recuperação e ingesta nutricional inadequada, podem favorecer a uma redução da resposta imunológica, deixando os atletas mais susceptíveis a infecções, principalmente do trato respiratório superior (COUTO et al., 2013; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; GLEESON, 2000; GLEESON e PYNE, 2000). No entanto a imunossupressão induzida pelo exercício é reversível, quando compreende um período descanso suficiente entre as diversas sessões de treino a que os atletas são sujeitos (GLEESON, 2006).

Vale ressaltar, que o controle nutricional de nutrientes essenciais, são fundamentais para uma melhor manutenção da resposta imunológica, principalmente os atletas que praticam exercícios mais vigorosos e de maior volume de treino semanal.

2.2 Disfunções Do Assoalho Pélvico

A região pélvica agrupa ossos, músculos e ligamentos, ocupando posição intermediária entre os membros inferiores e o tronco (HENSCHER, 2007). A estrutura óssea da pelve é constituída por dois ossos ilíacos que se articulam posteriormente ao sacro e anteriormente entre si com a sínfise púbica, e a pelve feminina distingue-se da masculina, apresentando um arcabouço ósseo mais afunilado, (REIS, BARROTE, BARACHO & NETO, 2002).

O assoalho pélvico (AP) é constituído por camadas musculares (músculos do assoalho pélvico - MAP), fáscia endopélvica, aponeurose e ligamentos. Tem como função o suporte aos órgãos da pelve, auxilia na expulsão do feto durante o parto normal, a manutenção da continência anal e urinária por meio de esfíncteres, além de ser responsável pela resposta sexual. A partir da atividade contínua dos MAP, há preservação do tecido conjuntivo em relação à sobrecarga, aliviando a tensão sobre as demais estruturas (ALMEIDA et al., 2015; BAYTUR et al. 2005). Além disso, esses músculos

permitem o intercuro sexual e o parto; suas contrações involuntárias são as características principais do orgasmo e quando fracos, podem causar hipoestesia vaginal e anorgasmia. Por isso, MAP podem interferir negativamente na função sexual feminina (ROSENBAUM, 2007).

Segundo Camargo (2016, p.3), “a atividade sexual é vida e é uma necessidade fisiológica”. A atividade sexual leva a um bem-estar psíquico que é capaz de aliviar tensões, combater o estresse, aumentar a autoestima e o bom humor (CAMARGO et al., 2016).

A disfunção sexual feminina (DSF) é a alteração em uma fase da atividade sexual que pode culminar em frustração, dor e redução dos intercursos sexuais, atingindo 40% das mulheres. Ela interfere em aspectos da qualidade de vida (QV), como dor, estado geral, aspectos emocionais, capacidade e saúde mental (BARRETO et al., 2018). Dessa forma, afeta aspectos físicos, emocionais e sociais, interferindo no bem-estar (CORREIA et al., 2016).

Disfunções da musculatura do assoalho pélvico, como prolapsos, incontinência urinária (IU) e incontinência fecal (IF) podem estar associadas a sintomas dolorosos ou desconfortos (BO et al., 2017). Estes distúrbios do assoalho pélvico podem ter um impacto na qualidade de vida (QV) das mulheres. A utilização do questionário de desconforto no assoalho pélvico (PFDI-20) ajuda a avaliar esses distúrbios, contribuindo para a melhoria dos cuidados de saúde nessas mulheres (AROUCA et al., 2016).

No que diz respeito as disfunções do assoalho pélvico, verificamos estudos que apontam fatores que aumentam a pressão intra-abdominal, como tosse crônica, constipação intestinal com esforço crônico para defecar e atividade física extenuante, também podem levar a condições como a IU, constipação terminal, IF, distopia genital, disfunção sexual e dor (MARKWELL e SAPSFORD, 1995; SAPSFORD, 2004; MARINHO et al., 2006; ELIASSON, EDNER e MATTSSON, 2008)

A IU piora a QV, afetando a saúde física e mental das mulheres (PADILHA et al., 2018). Prejudica a sexualidade feminina em diversos aspectos, principalmente psicossociais, que resulta com a piora na qualidade do ato sexual e menor frequência de relações sexuais nas mulheres afetadas (AUGE et al., 2010). A prevenção e o controle da IU podem ser realizados com orientações sobre o impacto das modificações no estilo de vida, melhor controle dos agravos de saúde e práticas de fortalecimento dos músculos do assoalho pélvico (SILVA et al., 2016).

Diversos autores relatam a prevalência de IU em jovens atletas, muitas vezes nulíparas (BO, 2004; NYGAARD, THOMPSON e SVENGALIS, 1994; CAETANO et al., 2007), sendo a maior ocorrência em atividades que envolvem longos saltos e impacto (CAYLET et al., 2006; ELIASSON, EDNER e MATTSSON, 2008) . Em um estudo avaliando mulheres praticantes de esportes intensivos (com treinamento de pelo menos oito horas semanais) e de não intensivos, verificou-se maior prevalência de sintomas de IU, IA e dispareunia nas praticantes de esportes intensivos (VITTON, 2011).

As dores no assoalho pélvico tem sua prevalência estimada em 3,8% em mulheres de 15 a 73 anos, (superior a enxaqueca, asma e dor nas costas), variando de 14 a 24% em mulheres na idade reprodutiva (MIRANDA; SCHOOR; GRÃO, 2009).

É considerada dor pélvica (DP), se persistir por 6 meses ou mais não associada exclusivamente a relação sexual. Algumas mulheres com dor no assoalho pélvico, ainda apresentam postura anormal, que pode vir de uma adaptação na tentativa de aliviar a dor, mas independente do motivo da dor, poderá levar a tensão crônica muscular, articular e ligamentar, a qual se transforma na fonte de dor em si. A DP pode ter etiologia ginecológica ou não ginecológica. Dentre as etiologias ginecológicas relevantes, destacam-se a endometriose, a adenomiose, os miomas uterinos, as varizes pélvicas e as aderências. Quanto as causas não ginecológicas, as mais prevalentes são a síndrome do cólon irritável, a constipação intestinal crônica, a cistite intersticial, as disordens psicológicas e as alterações musculoesqueléticas (MIRANDA; SCHOOR; GRÃO, 2009).

O envolvimento do sistema musculoesquelético na gênese e na perpetuação da DP vem sendo demonstrado de forma crescente. Muitos dos casos de DP têm nas disfunções musculoesqueléticas uma de suas causas básicas (NOGUEIRA; REIS; POLI NETO, 2006).

Admite-se que mais de 85% das pacientes com DP apresentam disfunções do sistema musculoesquelético, incluindo hiperlordose lombar, hiperextensão de joelhos e anteriorização pélvica, assim como espasmo do músculo levantador do ânus e síndrome do piriforme (NOGUEIRA; REIS; POLI NETO, 2006).

A prática de atividade física, principalmente intensa, tem sido considerada um potencial fator de risco para as disfunções do AP, entretanto outros fatores podem contribuir para a etiopatogenia destas disfunções, como a obesidade, idade avançada, número de partos vaginais, doenças neurológicas, diabetes, entre outros (MEMON e HANDA, 2013).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

O estudo consiste em um projeto de pesquisa comparativo, classificado em estudo transversal que utilizará amostras salivares, aplicação de questionários, tal como seus respectivos dados clínicos, pertencentes as populações de estudo.

3.2 Delineamento experimental

3.2.1 Etapas

Etapa I: Período de divulgação e contato com assessorias esportivas, divulgação de cartazes virtuais. Contato inicial, de forma virtual, com os atletas para entrevista e seleção dos sujeitos de pesquisa.

Etapa II: Reunião de forma online afim de esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e os protocolos de tratamento. Leitura completa do TCLE (APÊNDICE A) e assinatura do mesmo pelos interessados na participação da pesquisa. Os interessados em participar deverão digitalizar o TCLE assinado.

A aplicação da anamnese e questionários será feita de forma online, utilizando o formulário google docs.

Etapa III: Colheita salivar no pré treino mais longo da semana (ao acordar), pós treino às 17h e ao acordar no dia seguinte. Seguindo as orientações que estão descritas no APÊNDICE C, com autodeclaração contida no APÊNDICE D.

3.2.2 Intervenções

A intervenção consistirá na aplicação de questionários de forma online, através do google docs, e na coleta de saliva, a qual será entregue na residência dos indivíduos, seguindo todas as normas de segurança, e será retirada no mesmo local.

A saliva será coletada através de um dispositivo chamado salive-te, pré identificado para o momento específico da coleta.

3.3 Amostra do Estudo

Os participantes serão recrutados através de contato com assessorias esportivas, cartaz digital e carta à universidade. Será feita apresentação do projeto pelos pesquisadores, e os atletas maiores de 18 anos, assíduos aos treinamentos e que aceitarem fazer parte do estudo, deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE. Participarão todos aqueles que entregarem o TCLE e se enquadrarem nos critérios de inclusão. O calculo amostral foi realizado através do programa GPower versão 3.1.3; Franz Faul, Universitat Kiel, kiel, Germany. O tamanho da amostra com base em dados da análise do marcador inflamatório IgA e cortisol (MCDOWEL, 1992), tendo sido adotado um intervalo de confiança de 95%, erro padrão de 0,05% e um poder de 80%. Desta forma foi identificado um tamanho amostral de 86 participantes. Os participantes serão divididos em 6 grupos de 15 atletas cada.

3.3.1 Critérios de Inclusão:

- Ambos os sexos;
- Ter idade superior a 18 anos e inferior a 50 anos;
- Praticar exercício físico de forma contínua a mais de 6 meses;
- Praticar exercício físico pelo menos 150 minutos semanal;
- Concordar e assinar o TCLE.

3.3.2 Critérios de Exclusão:

- Ter realizado procedimento cirúrgico nos últimos seis meses;
- Ter menos de 18 anos;
- Ser atleta de elite em qualquer outra modalidade esportiva;
- Realizar tratamento com fisioterapia pélvica;
- Gravidez;
- Fumar;
- Doença inflamatória aguda e/ou presença de infecção;
- Doença gengival ou periodontal;

- Fazer uso de anti-inflamatório no momento do estudo;
- Ter tido qualquer tipo de lesão na última semana pré coleta.

	Corrida 10 Km	Corrida 21 Km	Corrida 42 Km	Triathlon sprint	Triathlon 70.3	Triathlon IM
Pré						
Pós imediato						
Pós tardio?						

3.4 Instrumentos De Pesquisa

3.4.1 Questionário de Anamnese e Volume do exercício físico

O questionário de anamnese é composto por questões de dados gerais do sujeito de pesquisa como nome, idade, endereço telefone, data de nascimento e data de avaliação; e questões referentes a sua condição atual de saúde como: prática de atividades físicas – modalidades e frequência semanal de treinos, patologias diagnosticadas, hipertensão, diabetes, dores osteomusculares, autorrelato de incontinência urinária, de estatura e massa (ANEXO 1).

3.4.2 Escala Visual Analógica da Dor – EVA

A escala pode ser descrita de seguinte forma:

“Consiste em uma reta de 10 cm de comprimento com números de zero a dez, na qual há apenas indicação no extremo esquerdo de “ausência de dor” e, no extremo direito, de “dor insuportável”. Quanto maior o escore, maior a intensidade da dor.” O uso dessa escala é comum em pesquisa, mas exige treinamento dos pacientes, o que limita a aplicação desse instrumento na rotina diária, (CARVALHO, et al, 2006; FONSECA, DEFÁVERI e ZENI, 2017) (ANEXO2).

3.4.3 Ficha de avaliação adaptada de Etienne e Waitman

Consiste em um questionário a ser aplicado pelos avaliadores, com questionamentos sobre a história ginecológica, obstétrica, medicamentosa e informações referentes ao assoalho pélvico. Não será realizado o exame funcional do assoalho pélvico (ANEXO 3).

3.4.4 Questionário *Female Sexual Function Index* (FSFI)

O FSFI é um questionário de avaliação da função sexual feminina, validado no Brasil, em 2008, por Thiel e colaboradores. É utilizado em pesquisas, inclusive com mulheres idosas, como fizeram Tonetto et al (2016). O instrumento é composto por 19 questões, que contemplam seis domínios da resposta sexual: desejo, excitação, lubrificação, orgasmo, satisfação e dispareunia/desconforto (THIEL et al., 2008; FERREIRA et al., 2013).

A pontuação de cada item é individual e varia de 0 a 5. Para se obter o valor total do domínio é necessária a soma de questões correspondentes a cada classe, multiplicadas pelo fator de correção. Resultados abaixo de 65% do escore máximo de cada categoria (menos de 3,9 pontos) representa disfunção sexual no domínio correspondente. Por meio da soma dos escores das categorias, obtém-se o escore total, que possui valores mínimos de 2 e máximo de 36, apresentando um ponto de corte de 26,55, sendo os valores maiores ou iguais a esta delimitação associados a uma melhor função sexual, enquanto os abaixo representam disfunção sexual (PECHORRO et al., 2009; FERREIRA et al., 2013) (ANEXO4).

Quadro 1 – Pontuações do FSFI

Domínio	Questão	Pontuação	Fator	Pontuação mínima	Pontuação máxima
Desejo	1,2	1-5	0.6	1.2	6.0
Excitação	3,4,5,6	0-5	0.3	0	6.0
Lubrificação	7,8,9,10	0-5	0.3	0	6.0
Orgasmo	11,12,13	0-5	0.4	0	6.0
Satisfação	14,15,16	0 ou 1-5	0.4	0.8	6.0
Dor	17,18,19	0-5	0.4	0	6.0
			Total	2.0	36.0

Fonte: próprio autor

3.4.5 Questionário de Desconforto no Assoalho Pélvico - Pelvic Floor Disability Index (PFDI-SF-20)

O PFDI-20 é composto por 20 questões divididas em três domínios (bexiga, intestino, pelve) em suas subescalas: Inventário de Distúrbio de Prolapso de Órgão

Pélvico (POPDI-6), Inventário de Distúrbio Colorretal-Anal (CRADI-8) e Inventário de Distúrbio Urinário (UDI-6). Começa-se perguntando ao paciente se tem o sintoma descrito em cada item. Se a resposta for sim, existe um escore de classificação em que o paciente pode escolher a resposta, com um escore de subescala de 0 a 100. Quanto maior a pontuação, maior é o impacto do desconforto na QV (AROUCA et al., 2016) (ANEXO5).

3.4.6 International Consultation On Incontinence Questionnaire - Short Form (ICIQ – SF)

O ICIQ-SF é um questionário curto, de 6 questões que visam obter informações sobre perdas urinárias e seu impacto nas atividades de vida diária, bem como na qualidade de vida dos indivíduos (ANEXO6).

3.4.7 Análise dos marcadores inflamatórios

Os níveis dos marcadores imunológicos como cortisol, PCR, IgA, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , imunoglobulinas COVID-19; dosagem dos hormônios melatonina e testosterona e de vitamina D, e serão analisados pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando amostras de saliva (ELISA Development Kit, 900-M21, Peprotech Inc, USA)

3.4.8 Qualidade de Vida - WHOQOL-BREF

O questionário WHOQOL-BREF é um instrumento curto, constituído de 26 perguntas (sendo a pergunta numero 1 e 2 sobre a qualidade de vida geral), as respostas seguem uma escala de Likert (de 1 a 5, quanto maior a pontuação melhor a qualidade de vida). Fora essas duas questões (1 e 2), o instrumento tem 24 facetas as quais compõem 4 domínios que são: FÍSICO, PSICOLÓGICO, RELAÇÕES SOCIAIS e MEIO AMBIENTE (FLECK, et al., 2000) (ANEXO7).

3.4.9 Avaliação do Perfil Nutricional

Formulário de marcadores do consumo alimentar (SISVAN, 2008). (ANEXO 8)

O consumo alimentar será analisado através do Formulário de Marcadores do Consumo Alimentar, desenvolvido pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. O formulário permite identificar com que frequência o entrevistado consumiu alguns alimentos ou bebidas nos últimos sete dias, que estão relacionados tanto a uma alimentação saudável (frutas e verduras) quanto a práticas pouco recomendadas que alterem marcadores inflamatórios (alimentos fritos e guloseimas) (SISVAN, 2008).

3.5 Análise Estatística

Os dados coletados serão posteriormente organizados, com a elaboração de um banco de dados para análise descritiva e tabulação manual dos mesmos. Para este estudo utilizaremos a estatística descritiva (média e desvio padrão).

A análise estatística será realizada com o programa SPSS 20.00 com o nível de significância de $p < 0,05$. Os dados serão testados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Teste KS) e serão apresentados através de média $\pm$ desvio padrão. Será utilizada ANOVA de três vias para comparação das diferentes variáveis. Correlações serão testadas através do coeficiente de correlação de Pearson.

3.6 Riscos E Benefícios

Os riscos da participação na pesquisa são considerados leves e referem-se à coleta de saliva, que pode resultar desconforto para colocar o algodão na boca, afim de encharcá-lo de saliva. Pode haver constrangimento para responder aos questionamentos e/ou o indivíduo pode se sentir cansado devido à extensão dos instrumentos.

Os resultados desta pesquisa irão trazer conhecimento aos atletas sobre seu sistema imunológico, funcionalidade do assoalho pélvico e os efeitos do exercício no sono e qualidade de vida. Bem como, poderão auxiliar na modulação do volume e intensidade dos treinos, de modo a minimizar os efeitos do recovery após treinos longos e intensos. Os voluntários serão informados a respeito de todas as avaliações e resultados obtidos no estudo.

3.7 Conduta Ética

- O projeto de pesquisa atende a Resolução 466/12, e estará sobre apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA);
- A participação no estudo é voluntária, podendo o indivíduo solicitar, a qualquer momento, sua retirada/saída do estudo;
- Nenhum indivíduo terá custos para participar, bem como não irá receber remuneração para tal;
- A identidade dos indivíduos não será divulgada, de forma alguma, havendo sigilo nas informações fornecidas conforme as normas de ética em pesquisa (APÊNDICE B).

3.8 Descarte de Resíduos

Os resíduos das amostras biológicas serão descartados conforme descrito na Resolução RDC nº 306 de 7 de dezembro de 2004, que descreve o Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.9 Cronograma

Ano/semestre Atividades	2020/1	2020/2	2021/1	2021/2	2022/1	2022/2	2023/1
	X	X					

Elaboração do projeto	X	X	X	X			
Encaminhamento para CEPE e Comitê de Ética			X				
Coleta dos dados				X	X	X	
Análise e interpretação dos dados					X	X	
Redação do relatório de pesquisa						X	X
Entrega e apresentação do Artigo						X	X

4- ORÇAMENTO

O orçamento da presente pesquisa será de responsabilidade dos pesquisadores e dos recursos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA. Sendo que parte do material para a realização da pesquisa, encontra-se armazenado no laboratório, sob responsabilidade da professora Alessandra Peres.

Identificação do Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Transporte dos pesquisadores	Custeio	500,00
PCR Cortisol Melatonina Testosterona Meios de cultura	Custeio	5.000,00
Kits de Elisa e reagentes para ELISA para dosagem de marcadores inflamatórios.	Custeio	8.000,00
Materiais diversos: tubos de coleta (salivete), saco hermético, lenço umedecido com álcool 70%, luvas	Custeio	2.500,00
Impressões	Custeio	100,00
Total		16.100,00

5- REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ANEXO 1 – FICHA DE ANAMNESE E DE VOLUME DE TREINO

Ficha de anamnese e volume de treino

Nome: _____

Idade: _____ Telefone: _____ Email: _____

Endereço: _____

Data de Nascimento: __/__/__;

Avaliação: __/__/2021

Sexo: () Masc () Fem

Etnia: (0) branca (1) preta (2) parda (3) amarela (4) indígena

Mantém atividade laboral atualmente: (0) sim (1) não. Qual: _____

Avaliação antropométrica

Altura estimada : _____ m Peso estimado: _____ Kg

Qual (is) modalidade(s) de exercício físico pratica? _____

Faz há quanto tempo? _____ Quantas vezes por semana? _____

Duração do treino _____

Faz acompanhamento com assessoria esportiva? (0) sim. (1) não Qual? _____

É atleta de elite em alguma modalidade? (0) sim. (1) não Qual? _____

Alguma dor? Aonde? _____

Apresenta lesão musculoesquelética?

() Não () Sim, há menos de 1 semana () Sim, há menos de 6 meses () Sim, há mais de 6 meses

Realiza atendimento com fisioterapia pélvica atualmente? (0) sim. (1) não Se sim, por qual motivo? _____

Faz acompanhamento nutricional com nutricionista? (0) sim. (1) não

Indicadores da condição de saúde

- Percepção da saúde: (1) muito boa (2) bom (3) regular (4) ruim (5) muito ruim
- Apresenta alguma doença inflamatória e/ou a presença de infecção nos últimos dias? (0) sim. (1) não.
- Fuma? (0) sim. (1) não
- Procura por atendimento médico nas duas últimas semanas: (1) procurou e foi atendido (2) procurou e não foi atendido (3) não procurou (4) sem informação
- Está fazendo uso de anti-inflamatório atualmente? (0) sim. (1) não.
- Você toma algum remédio diariamente? (0) sim. (1) não.
- Quantos medicamentos por dia? (0) nenhum (1) até 2 (2) 2–4 (3) 4–6 (4) mais de 6
- Quais: _____

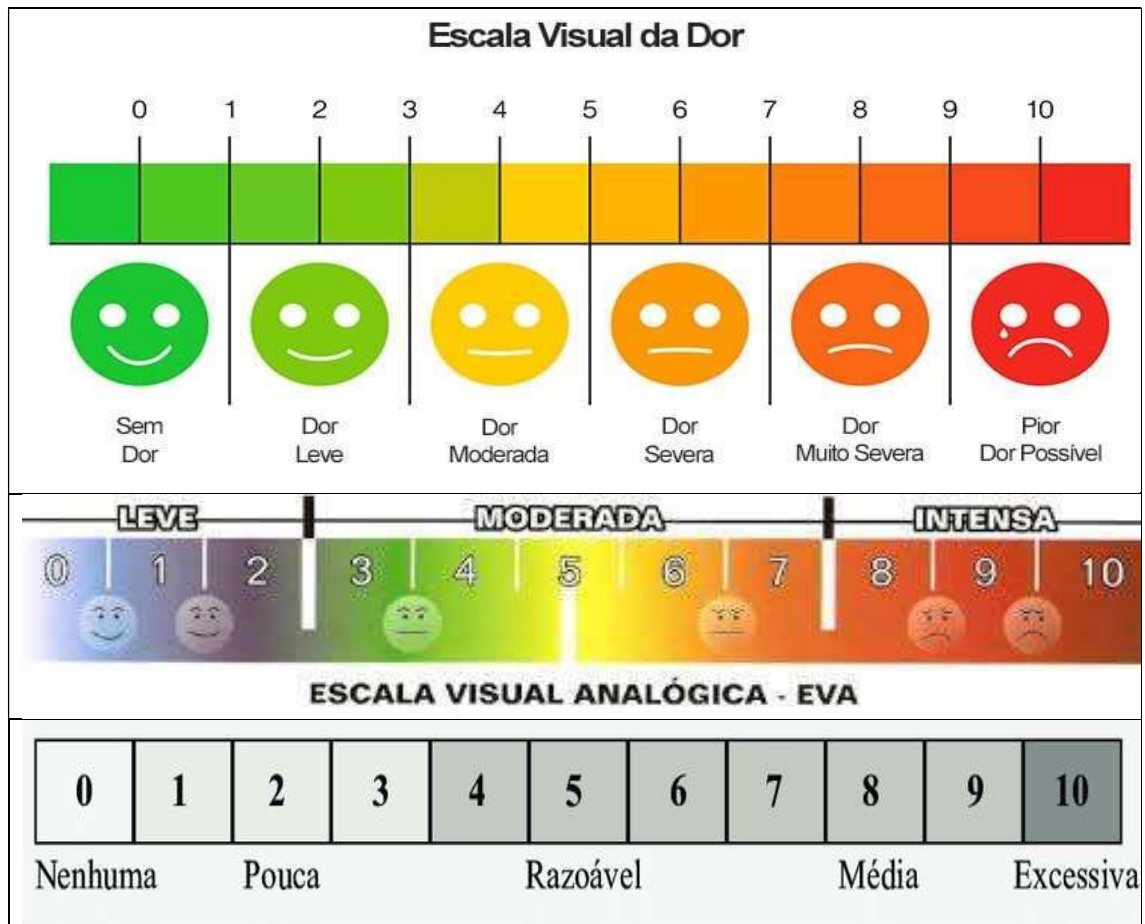
Perfil de patologias

Algum médico lhe diagnosticou ou lhe disse que você tem ou teve nos últimos 6 meses:

Diabetes	0. sim	1. não	Úlcera ou Gastrite	0. sim	1. não
Hipertensão	0. sim	1. não	Constipação (prisão de ventre)	0. sim	1. não
Neoplasia (câncer)	0. sim	1. não	Osteopenia	0. sim	1. não
Infarto Agudo do Miocárdio	0. sim	1. não	Fraturas	0. sim	1. não
Insuficiência Cardíaca	0. sim	1. não	Infecção urinária	0. sim	1. não
Acidente Vascular Encefálico	0. sim	1. não	Asma/Bronquite	0. sim	1. não
Depressão	0. sim	1. não	Teve gripe esse ano?	0. sim	1. não
Lombalgia	0. sim	1. não	Vacina para gripe esse ano?	0. sim	1. não
Cervicalgia	0. sim	1. não	Teve COVID-19?	0. sim	1. não
Queixas de tontura	0. sim	1. não	Foi vacinado para COVID-19?	0. sim	1. não
			Se sim, qual?		

Mais algo que julgue necessário que saibamos a seu respeito: _____

ANEXO 2 – ESCALA VISUAL ANALÓGICA (EVA)



Para utilizar a EVA o atendente deve questionar o paciente quanto ao seu grau de dor sendo que 0 significa ausência total de dor e 10 o nível de dor máxima suportável pelo paciente.

Dicas sobre como interrogar o paciente:

- Você tem dor?
- Como você classifica sua dor? (deixe ele falar livremente, faça observações na pasta sobre o que ele falar)

Questione-o:

- Se não tiver dor, a classificação é zero.
- Se a dor for moderada, seu nível de referência é cinco.
- Se for intensa, seu nível de referência é dez.

ANEXO 3 - FICHA DE AVALIAÇÃO ADAPTADA DE ETIENNE E WAITMANN

Data da avaliação: ____/____/____. Tel.: _____

Identificação: _____

DN: ____/____/____. Idade: _____

Situação afetiva/conjugal: _____

Ocupação: _____

Peso: _____ Altura: _____ Cor: _____

Fibromialgia: () SIM () NÃO

Antecedentes pessoais:

() Fumante	() Disfunções Pulmonares
() Diabetes	() Disfunções Reumatológicas
() Alergias	() Disfunções Cardíacas
() Disfunções circulatórias	() Disfunções Renais
() Disfunções Ginecológicas	() Hipertensão arterial sistêmica (HAS)
() Endometriose	() prolapso genital
() Incontinência urinária	
() Infecções urinárias recorrentes	
() Tratamento Fisioterapêutico para assoalho pélvico	
() Tratamento oncológico ginecológico	
() Vulvovaginites	

Antecedentes ginecológicos:

Clínico: _____

Menarca: _____ Menopausa: _____

Antecedentes obstétricos:

Nº de gestações: _____

Nº de partos _____ Normais: _____ Cesáreas: _____ Abortos: _____

Peso do maior e do menor recém-nascido: _____

Atividade sexual:

() exerce () não exerce

Tem dor ou desconforto na atividade sexual? () Sim () Não

Quanto a lubrificação: () Excelente () Boa () Ruim

Tem orgasmo? () Sim () Não

Tem dificuldade para atingir o orgasmo? () Sim () Não

Medicação em uso:

- () diuréticos () tranquilizantes () hormônios
() corticoides () anticolinérgicos () pomadas ginecológicas tópicas hormonais
() outros: _____

Pelve:

História de traumas físicos e/ou cirúrgicos:

Queda com o quadril no chão: () Sim () Não

Queda de escada: () Sim () Não

Acidente com fratura/ luxação de quadril, vértebras lombares e/ ou MMII:

() Sim () Não

Cirurgia abdominal, pélvica e/ou urogenital: () Sim () Não

Qual? _____

ANEXO 4 – FEMALE SEXUAL FUNCTION INDEX (FSFI)
(Índice de Função Sexual Feminina)

Instruções

Este questionário pergunta sobre sua vida sexual durante as últimas 4 semanas. Por favor, responda às questões de forma mais honesta e clara possível. Assinale apenas uma alternativa por pergunta.

Para responder às questões use as seguintes definições: atividade sexual pode incluir afagos, carícias preliminares, masturbação (“punheta”/“siririca”) e ato sexual; ato sexual é definido quando há penetração (entrada) do pênis na vagina; estímulo sexual inclui situações como carícias preliminares com um parceiro, masturbação ou fantasia sexual (pensamentos); desejo sexual ou interesse sexual é um sentimento que inclui querer ter atividade sexual, sentir-se receptiva a uma iniciativa sexual de um parceiro(a) e pensar ou fantasiar sobre sexo; excitação sexual é uma sensação que inclui aspectos físicos e mentais (pode incluir sensações como calor ou inchaço dos genitais, lubrificação – sentir-se molhada/“vagina molhada”/“tesão vaginal” –, ou contrações musculares).

1- Nas últimas 4 semanas com que frequência (quantas vezes) você sentiu desejo ou interesse sexual?

5 = Quase sempre ou sempre

4 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

2 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

1 = Quase nunca ou nunca

2- Nas últimas 4 semanas como você avalia o seu grau de desejo ou interesse sexual?

5 = Muito alto

4 = Alto

3 = Moderado

2 = Baixo

1 = Muito baixo ou absolutamente nenhum

3- Nas últimas 4 semanas, com que frequência (quantas vezes) você se sentiu sexualmente excitada durante a atividade sexual ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Quase sempre ou sempre

4 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

2 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

1 = Quase nunca ou nunca

4- Nas últimas 4 semanas, como você classificaria seu grau de excitação sexual durante a atividade ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Muito alto

4 = Alto

3 = Moderado

2 = Baixo

1 = Muito baixo ou absolutamente nenhum

5- Nas últimas 4 semanas, como você avalia o seu grau de segurança para ficar sexualmente excitada durante a atividade 5 = Segurança muito alta sexual ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

4 = Segurança alta

3 = Segurança moderada

2 = Segurança baixa

1 = Segurança muito baixa ou Sem segurança

6- Nas últimas 4 semanas, com que frequência (quantas vezes) você ficou satisfeita com sua excitação sexual durante a atividade sexual ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Quase sempre ou sempre

4 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

2 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

1 = Quase nunca ou nunca

7- Nas últimas 4 semanas, com que frequência (quantas vezes) você teve lubrificação vaginal (ficou com a “vagina molhada”) durante a atividade sexual ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Quase sempre ou sempre

4 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

2 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

1 = Quase nunca ou nunca

8- Nas últimas 4 semanas, como você avalia sua dificuldade em ter lubrificação vaginal (ficar com a “vagina molhada”) durante o ato sexual ou atividades sexuais?

0 = Sem atividade sexual

1 = Extremamente difícil ou impossível

2 = Muito difícil

3 = Difícil

4 = Ligeiramente difícil

5 = Nada difícil

9- Nas últimas 4 semanas, com que frequência (quantas vezes) você manteve a lubrificação vaginal (ficou com a “vagina molhada”) até o final da atividade ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Quase sempre ou sempre

4 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

2 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

1 = Quase nunca ou nunca

10- Nas últimas 4 semanas, qual foi sua dificuldade em manter a lubrificação vaginal (“vagina molhada”) até o final da atividade ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

1 = Extremamente difícil ou impossível

2 = Muito difícil

3 = Difícil

4 = Ligeiramente difícil

5 = Nada difícil

12 - Nas últimas 4 semanas, quando você teve estímulo sexual ou ato sexual, qual foi sua dificuldade em você atingir o orgasmo (“clímax/gozou”)?

0 = Sem atividade sexual

1 = Extremamente difícil ou impossível

2 = Muito difícil

3 = Difícil

4 = Ligeiramente difícil

5 = Nada difícil

13- Nas últimas 4 semanas, o quanto você ficou satisfeita com sua capacidade de atingir o orgasmo (“gozar”) durante atividade ou ato sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Muito satisfeita

4 = Moderadamente satisfeita

3 = Quase igualmente satisfeita e insatisfeita

2 = Moderadamente insatisfeita

1 = Muito insatisfeita

14- Nas últimas 4 semanas, o quanto você esteve satisfeita com a proximidade emocional entre você e seu parceiro(a) durante a atividade sexual?

0 = Sem atividade sexual

5 = Muito satisfeita

4 = Moderadamente satisfeita

3 = Quase igualmente satisfeita e insatisfeita

2 = Moderadamente insatisfeita

1 = Muito insatisfeita

15- Nas últimas 4 semanas, o quanto você esteve satisfeita com o relacionamento sexual entre você e seu parceiro(a)?

5 = Muito satisfeita

4 = Moderadamente satisfeita

3 = Quase igualmente satisfeita e insatisfeita

2 = Moderadamente insatisfeita

1 = Muito insatisfeita

16- Nas últimas 4 semanas, o quanto você esteve satisfeita com sua vida sexual de um modo geral?

5 = Muito satisfeita

4 = Moderadamente satisfeita

3 = Quase igualmente satisfeita e insatisfeita

2 = Moderadamente insatisfeita

1 = Muito insatisfeita

17- Nas últimas 4 semanas, com que frequência (quantas vezes) ter relação você sentiu desconforto ou dor durante a penetração vaginal?

0 = Não tentei

1 = Quase sempre ou sempre

2 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

4 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

5 = Quase nunca ou nunca

18- Nas últimas 4 semanas, com que frequência (quantas vezes) ter relação você sentiu desconforto ou dor após a penetração vaginal?

0 = Não tentei

1 = Quase sempre ou sempre

2 = A maioria das vezes (mais do que a metade do tempo)

3 = Algumas vezes (cerca de metade do tempo)

4 = Poucas vezes (menos da metade do tempo)

5 = Quase nunca ou nunca

19- Nas últimas 4 semanas, como você classificaria seu grau de ter relação desconforto ou dor durante ou após a penetração vaginal?

0 = Não tentei

1 = Muito alto

2 = Alto

3 = Moderado

4 = Baixo

5 = Muito baixo ou absolutamente nenhum

ANEXO 5 – QUESTIONÁRIO DE DESCONFORTO NO ASSOALHO PÉLVICO-
PELVIC FLOOR DISTRESS INVENTORY - PFDI-SF-20

Questões	Sim	Não	Nada	Um pouco	Moderadamente	Bastante
1. Você geralmente sente pressão na parte baixa do abdome/barriga?						
2. Você geralmente sente peso ou endurecimento/frouxidão na parte baixa do abdome/barriga?						
3. Você geralmente tem uma bola, ou algo saindo para fora que você pode ver ou sentir na área da vagina?						
4. Você geralmente tem que empurrar algo na vagina ou ao redor do ânus para ter evacuação/defecação completa?						
5. Você geralmente experimenta uma impressão de esvaziamento incompleto da bexiga?						
6. Você alguma vez teve que empurrar algo para cima com os dedos na área vaginal para começar ou completar a ação de urinar?						
7. Você sente que precisa fazer muita força para Evacuar/defecar?						
8. Você sente que não esvaziou completamente seu intestino ao final da evacuação/defecação?						
9. Você perde involuntariamente (além do seu controle) fezes bem sólidas?						
10. Você perde involuntariamente (além						

do seu controle) fezes líquidas?						
11. Você as vezes elimina flatos/gases intestinais, involuntariamente?						
12. Você as vezes sente dor durante a evacuação/defecação?						
13. Você já teve uma forte sensação de urgência que a fez correr ao banheiro para poder evacuar?						
14. Alguma vez você sentiu uma “bola” ou um abaulamento na região genital durante ou depois do ato de evacuar/defecar?						
15. Você tem aumento da frequência urinária?						
16. Você geralmente apresenta perda de urina durante sensação de urgência, que significa uma forte sensação de necessidade de ir ao banheiro?						
17. Você geralmente perde urina durante risadas, tosses ou espirros?						
18. Você geralmente perde urina em pequena quantidade (em gotas)?						
19. Você geralmente sente dificuldade em esvaziar a bexiga?						
20. Você geralmente sente dor ou desconforto na parte baixa do abdome/barriga ou região genital?						

ANEXO 6 - INTERNATIONAL CONSULTATION ON INCONTINENCE
QUESTIONNAIRE - SHORT FORM (ICIQ – SF)

Este questionário não vai mudar nossa forma de tratá-la e também não vai trazer qualquer privilégio como antecipação de marcação de exames ou de cirurgias. Entretanto se você o responder com honestidade e precisão vai ajudar muito no seu tratamento.

Muitas pessoas perdem urina alguma vez. Estamos tentando descobrir quantas pessoas perdem urina e o quanto isso as aborrece. Ficaríamos agradecidos se você pudesse nos responder às seguintes perguntas, pensando em como você tem passado, em média, nas ÚLTIMAS QUATRO SEMANAS (UM MÊS).

1 – Data de nascimento: ____/____/____

2 - Sexo: Feminino (☐) Masculino (☐)

3 – Com que frequência você perde urina? (Assinale uma resposta)

0 (☐) Nunca

1 (☐) Uma vez por semana ou menos

2 (☐) Duas ou três vezes por semana

3 (☐) Uma vez ao dia

4 (☐) Diversas vezes ao dia

5 (☐) O tempo todo

4 – Gostaríamos de saber a quantidade de urina que você pensa que perde. (Assinale uma resposta)

0 (☐) Nenhuma

2 (☐) Uma pequena quantidade

4 (☐) Uma moderada quantidade

6 (☐) Uma grande quantidade

5 – Em geral quanto que perder urina interfere em sua vida diária?

Por favor, circule um número entre 0 (não interfere) e 10 (interfere muito)

0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () 8 () 9 () 10 ()

Não Interfere

Interfere Muito

ICIQ-SF Score: soma dos resultados 3, 4 e 5= _____

6 – Quando você perde urina? (Por favor, assinale todas as alternativas que se aplicam a você)

1 () Nunca

2 () Perco antes de chegar ao banheiro

3 () Perco quando tusso ou espirro

4 () Perco quando estou dormindo

5 () Perco quando estou fazendo atividades físicas

6 () Perco quando eu terminei de urinar e estou me vestindo

7 () Perco quando sem razão óbvia

8 () Perco o tempo todo

ANEXO 7 – WHOQOL-BREF

Este questionário trata sobre como você se sente a respeito de sua qualidade de vida, saúde e outras áreas de sua vida.

Por favor, responda as próximas questões tomando como referência as duas últimas semanas.

Circule a alternativa que lhe parece mais apropriada e lembre-se, não há resposta certa ou errada, pois trata-se de sua percepção sobre aspectos da vida.

01. Como você avaliaria sua qualidade de vida?

1. Muito ruim 2. Ruim 3. Nem ruim, nem boa 4. Boa 5. Muito boa

02. Quão satisfeito(a) você está com a sua saúde?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

03. Em que medida você acha que sua dor (física) impede você de fazer o que você precisa?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

04. O quanto você precisa de algum tratamento médico para levar sua vida diária?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

05. O quanto você aproveita a vida?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

06. Em que medida você acha que a sua vida tem sentido?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

07. O quanto você consegue se concentrar?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

08. Quão seguro(a) você se sente em sua vida diária?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

09. Quão saudável é o seu ambiente físico (clima, barulho, poluição, atrativos)?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Mais ou menos 4. Bastante 5. Extremamente

10. Você tem energia suficiente para seu dia-a-dia?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Médio 4. Muito 5. Completamente

11. Você é capaz de aceitar sua aparência física?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Médio 4. Muito 5. Completamente

12. Você tem dinheiro suficiente para satisfazer suas necessidades?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Médio 4. Muito 5. Completamente

13. Quão disponíveis para você estão as informações que precisa no seu dia-a-dia?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Médio 4. Muito 5. Completamente

14. Em que medida você tem oportunidades de atividade de lazer?

1. Nada 2. Muito pouco 3. Médio 4. Muito 5. Completamente

15. Quão bem você é capaz de se locomover?

1. Muito ruim 2. Ruim 3. Nem ruim, nem bom 4. Bom 5. Muito bom

16. Quão satisfeito(a) você está com o seu sono?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

17. Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade de desempenhar as atividades do seu dia-a-dia?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

18. Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade para o trabalho?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

19. Quão satisfeito(a) você está consigo mesmo?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

20. Quão satisfeito(a) você está com suas relações pessoais (amigos, parentes, conhecidos, colegas)?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

21. Quão satisfeito(a) você está com sua vida sexual?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

22. Quão satisfeito(a) você está com o apoio que você recebe de seus amigos?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

23. Quão satisfeito(a) você está com as condições do local onde mora?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

24. Quão satisfeito(a) você está com o seu acesso aos serviços de saúde?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

25. Quão satisfeito(a) você está com o seu meio de transporte?

1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Nem satisfeito nem insatisfeito 4. Satisfeito
5. Muito satisfeito

26. Com que frequência você tem sentimentos negativos tais como mau humor, desespero, ansiedade, depressão?

1. Nunca 2. Algumas vezes 3. Frequentemente 4. Muito frequentemente 5. Sempre

INSTRUÇÕES PARA COMPUTAÇÃO DOS ESCORES DO WHOQOL-ABREVIADO

O instrumento WHOQOL-BREF produz um perfil de qualidade de vida em quatro domínios: físico, social, relações sociais e meio ambiente. Para cada domínio é possível obter um escore, além de um escore geral resultante de todos os domínios. Todos os escores seguem uma ordem crescente e positiva (escores mais altos denotam maior qualidade de vida). A pontuação dos escores deve ser realizada utilizando o programa estatístico SPSS, seguindo os passos e as sintaxes apresentadas a seguir (em itálico).

1º Passo: Verifique se todos os 26 itens do instrumento tem escala de resposta entre 1 e 5.

2º Passo: Recodifique as questões Q3, Q4 e Q26

RECODE q3, q4, q26 - (1=5), (2=4), (3=3), (4=2), (5=1).

3º Passo: Determine os escores parciais dos domínios (serão obtidos escores entre 4 e 20 pontos)

*Compute dom 1= (mean.6 (q3,q4,q10,q15, q16,q17,q18))*4.*

*Compute dom 2= (mean.5 (q5, q6,q7,q11,q19,q26))*4*

*Compute dom 3= (mean.2 (q20,q21,q22)) *4*

*Compute dom 4= (mean.6 (q8, q9, q12,q13, q14,q23,q24,q25))*4*

4º Passo: Corrija os valores parciais dos domínios para a escala de 0 a 100 pontos (escala sugerida para o WHOQOL-100)

Compute dom1= (dom 1 - 4)(100/16).*

Compute dom2= (dom2 - 4)(100/16).*

Compute dom3= (dom3 - 4)(100/16).*

Compute dom4= (dom4 - 4)(100/16).*

5º Passo: Exclua os casos com mais de 20% de “missing”

Count total = q1 a Q26 (1 a 5).

Select if (TOTAL >= 21).

EXECUTE.

6º Passo: Produza o escore total do WHOQOL-Abreviado com a soma dos quatro domínios *compute total = (dom1 + dom2 + dom3 + dom4)*

Alguém lhe ajudou a preencher este questionário?

Quanto tempo você levou para preencher este questionário?.....

Resultados em % de 0 a 100

Quanto maior a porcentagem (mais perto de 100%) melhor a qualidade de vida.

ANEXO 8– FICHA DE CONSUMO ALIMENTAR

FORMULÁRIO DE MARCADORES DO CONSUMO ALIMENTAR

Número do participante: _____ Estatura: _____ Massa

Corporal: _____ IMC: _____ Idade: _____

Nos últimos 7 dias, em quantos dias você comeu os seguintes alimentos ou bebidas?								
Alimento/Bebida	Não comi nos últimos sete dias	1 dia nos últimos sete dias	2 dias nos últimos sete dias	3 dias nos últimos sete dias	4 dias nos últimos sete dias	5 dias nos últimos sete dias	6 dias nos últimos sete dias	Todos os 7 dias
1. Salada crua (alface, tomate, cenoura, pepino, repolho, etc)								
2. Legumes e verduras cozidos (couve, abóbora, chuchu, brócolis, espinafre, etc) (não considerar batata e mandioca)								
3. Frutas frescas ou salada de frutas								
4. Feijão								
5. Leite ou iogurte								
6. Batata frita, batata de pacote e salgados fritos (coxinha, quibe, pastel, etc)								
7. Hambúrguer e embutidos (salsicha, mortadela, salame, presunto, lingüiça, etc)								
8. Bolachas/biscoitos salgados ou salgadinhos de pacote								
9. Bolachas/biscoitos doces ou recheados, doces, balas e chocolates (em barra ou bombom)								
10. Refrigerante (não considerar os diet ou light)								

Fonte: Ministério da Saúde, SISVAN.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do estudo: EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO, NA FUNCIONALIDADE DO ASSOALHO PÉLVICO E NA QUALIDADE DE VIDA DE ATLETAS

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dra. Alessandra Peres

Instituição: UFCSPA

Local da análise de dados: Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Telefone para contato: (51) 98125 1113

E-mail para contato: aleimuno@gmail.com

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado(a) a participar da coleta de dados desta pesquisa de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de você se decidir a participar.
- A participação neste estudo é voluntária e livre, podendo ser cancelada em qualquer fase do processo.
- Não haverá compensação financeira para os participantes relacionada à sua participação.
- Ao participar do estudo você receberá uma via deste termo.

Objetivo do estudo: Buscamos com este estudo compreender os efeitos do exercício físico, em diferentes intensidades, sobre o sistema imunológico, funcionalidade do assoalho pélvico e a qualidade de vida de atletas, verificando se há relação entre o volume de treino e os mesmos.

Procedimentos: A coleta de dados para este estudo constará em responder uma ficha de anamnese com informações gerais de saúde, um vídeo explicativo sobre a coleta salivar e questionários, de forma online, através de formulário no google docs. Essa etapa terá duração aproximada de, no máximo, 30 minutos.

Para a avaliação dos marcadores imunológicos, utilizaremos a saliva como material biológico, de modo a reduzir o contato físico com os voluntários, em virtude da situação atual de pandemia, pelo COVID-19. Será realizada coleta de saliva, pelo próprio voluntário em sua

residência. O material para a coleta, será entregue na residência do voluntário em dia e hora combinados previamente, contendo uma via do termo de orientações ao voluntário.

Benefícios: Os resultados desta pesquisa, nos fornecerá conhecimento que poderá auxiliar na melhor qualidade de treino e de saúde dos atletas. Tendo como benefício da participação na pesquisa, você será informado e orientado a respeito de todas as avaliações realizadas: funcionalidade do assoalho pélvico, qualidade de vida e perfil imunológico. Trazendo maior conhecimento sobre o tema abordado.

Risco: Considerando a natureza das técnicas a serem aplicadas, nas intervenções diagnósticas, os riscos são considerados leves. A coleta salivar, pode resultar desconforto para colocar o algodão na boca, afim de encharcá-lo de saliva. Pode haver constrangimento para responder aos questionamentos e/ou o indivíduo pode se sentir cansado devido à extensão dos instrumentos.

Em caso de eventual risco, este será tratado pelos pesquisadores e se necessário, a intervenção será suspensa. E em caso de qualquer efeito adverso, comprovadamente decorrente da presente pesquisa, você será indenizado.

Sigilo: Os dados levantados serão confidenciais, resguardando a identidade dos sujeitos, e poderão ser utilizados para estudos e publicações científicas, por 5 anos, ficando sob responsabilidade dos pesquisadores para futuros estudos, desde que seja respeitada totalmente sua privacidade e confidencialidade.

Assim, ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____, portador (a) da carteira de identidade número _____, afirmo que, após a leitura deste documento e de esclarecimentos dados pelos pesquisadores, concordo com a realização desta pesquisa e autorizo minha participação, como também autorizo a publicação em meio acadêmico dos dados, informações e outros procedimentos coletados nesta pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Considero-me igualmente informado: sobre os procedimentos nos quais estarei envolvido, dos riscos e benefícios esperados.

Assinatura: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 2021.

Caso você tenha dúvidas ou solicite esclarecimentos, entrar em contato com o pesquisador responsável professora Alessandra Peres email: peres@ufcspa.edu.br e telefone: (51)99619331, ou com Joane Severo Ribeiro email: joaneribeiro@gmail.com e telefone (51)981251113, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA pelo telefone (51)3303-8804.

Observação: O presente documento baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (resolução 466/12), será assinado em suas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do paciente ou de seu representante legal e outra com o pesquisador responsável.

APÊNDICE B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

Projeto de pesquisa: EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO, NA FUNCIONALIDADE DO ASSOALHO PÉLVICO E NA QUALIDADE DE VIDA DE ATLETAS

Pesquisador responsável: Prof.^a Dra. Alessandra Peres

Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos voluntários cujos dados serão coletados em ambiente virtual e domiciliar, e avaliados no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do presente projeto e publicação de artigos científicos. As informações somente serão divulgadas de forma anônima, sendo que serão mantidas sob responsabilidade da professora Alessandra Peres, com extrema confidencialidade na sala do Laboratório de Imunologia da UFCSPA em armários que permanecerão fechados com chave única sob responsabilidade dos pesquisadores, por um período de cinco anos. Após este período, os dados serão incinerados.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2021.

Prof.^a Dra. Alessandra Peres

APÊNDICE C – TERMO DE ORIENTAÇÕES AO VOLUNTÁRIO

Projeto de pesquisa: EFEITO DE DIFERENTES INTENSIDADES DE EXERCÍCIO FÍSICO NO SISTEMA IMUNOLÓGICO, NA FUNCIONALIDADE DO ASSOALHO PÉLVICO E NA QUALIDADE DE VIDA DE ATLETAS

Pesquisador responsável: Prof.^a Dra. Alessandra Peres

Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Através deste termo os pesquisadores do presente projeto fornecerão as informações e orientações necessárias para a coleta do material biológico. Ressaltando, que é de suma importância seguir as devidas orientações, a fim de garantir fidedignidade aos resultados das amostras analisadas.

1- Material para coleta:

- Será entregue na residência do voluntário, combinado dia e horário previamente.
- O material estará armazenado em saco plástico hermético, contendo externamente 2 lenços embebidos com álcool 70% embalados individualmente, afim de possibilitar a higienização do mesmo, seguindo as orientações de higiene da COVID-19. Internamente haverá um envelope de papel, no qual terá 1 vias do Termo de Orientações ao voluntário; haverá também XX salivetes, devidamente identificados com um número, pré estabelecido à cada voluntário, e o horário de coleta.
- O recolhimento será feito na residência do voluntário, combinado dia e horário previamente. O voluntário deverá entregar o saco plástico hermético contendo os salivetes.

2- Coleta

- Cuidar o horário da coleta marcado no salivete, a troca dos mesmos interferirá nos resultados do estudo.
- Anotar o horário em que foram realizadas as coletas salivares.
- Não ingerir alimentos, bebidas, mastigar chicletes ou balas nas duas horas que antecederem a coleta.
- Não escovar os dentes na hora que anteceder a coleta.
- Fazer um leve bochecho com água, 10 minutos antes da coleta.
- Abrir o salivete e colocar o rolo de algodão na boca, sem a utilização das mãos.
- Ficar em torno de 3 minutos com o rolo de algodão na boca, de modo que ele fique totalmente embebido em saliva.
- Colocar o rolo de algodão no tubo, sem a utilização das mãos.

3- Armazenamento do material biológico

- Após coletada a saliva, fechar o salivete e conferir se está bem vedado;
- Deverá ser armazenado em – 4°C em refrigerador, até o dia e horário previamente combinado para o pesquisador buscar.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2021.

Prof.^a Alessandra Peres

Voluntário(a)

APÊNDICE D – TERMO DE AUTODECLARAÇÃO DE DOENÇAS GENGIVAIS E PERIODONTAIS

Eu, _____, participante da pesquisa com CPF número _____, declaro que não possuo doenças gengivais e/ou periodontais. Estou ciente que essas doenças interferem nos resultados do projeto no qual eu participo, sendo necessária a notificação do pesquisador responsável caso eu apresente alguma manifestação gengival ou periodontal durante o período de coleta salivar, para exclusão da minha participação no estudo em questão.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

Projeto de Pesquisa

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOATIVAS DO CORANTE AZUL DE
GENIPINA E APLICAÇÃO EM ALIMENTOS**

Prof^a. Dr^a. Manuela Poletto Klein

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Departamento de Nutrição

Curso Superior de Tecnologia em Alimentos

PORTO ALEGRE

2021

I **RESUMO**

A conscientização dos indivíduos sobre os impactos da produção e consumo de alimentos sobre o meio-ambiente, a saúde e a relação com questões éticas têm motivado o desenvolvimento, por parte das indústrias, de alimentos e insumos alimentícios cada vez mais naturais e seguros. Aliado a isto, a grande biodiversidade brasileira é uma oportunidade para a geração de alimentos que atendam às novas necessidades dos indivíduos. Neste sentido, o jenipapo (*Genipa americana* L.), fruto do jenipapeiro, tem origem na Amazônia e é bastante abundante no Brasil. A partir do jenipapo, pode-se obter a genipina, um iridoide que se destaca na área biomédica como um agente reticulante natural capaz de associar-se covalentemente à diferentes materiais (quitosana, gelatina, colágeno, caseína) e aumentar a estabilidade química e física do material. Na área de alimentos, a genipina pode ser utilizada para a obtenção de corantes alimentícios, pois, na presença de oxigênio, ela reage com aminas e proteínas primárias produzindo pigmentos azuis. A extração da genipina a partir do jenipapo pode ser feita mediante utilização de enzimas e solventes considerados “verdes”, o que diminui o impacto ambiental para sua utilização. Diante deste contexto, o objetivo principal deste projeto de pesquisa é a obtenção de um corante azul a partir da genipina extraída do jenipapo para posterior aplicação em alimentos. A equipe executora deste projeto já tem expertise na área e vem trabalhando com outras aplicações da genipina há pelo menos 3 anos. Entretanto, a aprovação deste projeto possibilitará a ampliação dos estudos na área de alimentos, com a criação de uma nova linha de pesquisa visando o uso da genipina para o desenvolvimento de um corante natural a partir de insumos nativos na flora brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: genipina; jenipapo; corante azul; alimentos; bioatividade.

II DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

II.1. Executor do projeto

Prof^a. Dr^a. Manuela Poletto Klein

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Curso Superior de Tecnologia em Alimentos

II.2. Local de Execução

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre - CEP 90050-170 - RS – Brasil

II.3. Equipe de alunos e pesquisadores que participam do projeto

Alunos de Graduação em Iniciação Científica e trabalho de conclusão de curso:

Gustavo Padilha - Graduando do curso de Biomedicina da UFCSPA.

Ana Paula Bitencourt – Graduanda do curso de Tecnologia em Alimentos da UFCSPA.

Mestrandos:

Gabriela Kauffmann, graduação em Biomedicina (UNIVATES), mestrado em andamento no Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPGBio - UFCSPA).

Em caso de aprovação e recebimento de fomento financeiro, pretende-se selecionar dois alunos (as) de pós-graduação a nível de mestrado e/ou doutorado para atuação neste projeto de pesquisa.

Colaboradores e pesquisadores científicos:

Prof^a. Dr^a. Poliana Deyse Gurak, professora adjunta da UFCSPA.

Esse projeto também foi submetido a um edital da *Fundación Carolina* cujo objetivo é o a cooperação científica entre a Espanha e países da Comunidade Ibero-americana. Assim, em caso de aprovação, o grupo de pesquisa contará com uma bolsa de mobilidade acadêmica para realização de um estágio de pesquisa na Universidade de Sevilla (Espanha).

III CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

Nas últimas décadas, uma evolução progressiva da indústria de alimentos tem sido observada em relação ao desenvolvimento de produtos com corantes naturais (Martins *et al.*, 2016). A notoriedade que os corantes naturais vêm assumindo deve-se não só à tendência mundial de substituição dos corantes sintéticos pelos naturais, mas também às propriedades funcionais atribuídas a alguns desses pigmentos.

Nesse sentido, pigmentos alimentares naturais ou corantes, bem como outros aditivos naturais, são considerados não apenas como agentes de melhoria sensorial, mas também como melhoradores do valor nutritivo e promotores de saúde. Pode-se observar que várias matrizes vegetais têm sido usadas para obter uma variedade de corantes. O urucum (*Bixa orellana*), por exemplo, é usado para extrair cores que variam de amarelo a vermelho (Taham, Cabral and Barrozo, 2015). Os extratos de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) contêm antocianinas, que são compostos fenólicos que geram cores azul, roxa e vermelha (Wu, Long and Kennelly, 2013). No entanto, há dificuldade em obter uma cor azul estável a partir de matérias-primas vegetais, que para a indústria hoje, utiliza somente corantes azuis sintéticos em seus produtos, como o azul brilhante (E133) e o indigotina (E132).

Nessa perspectiva, o jenipapo (*Genipa americana* L.), que é uma fruta nativa do Brasil, é uma alternativa de renda para pequenos agricultores, pela venda de seus frutos, que podem representar uma fonte sustentável para intensificar o plantio comercial de uma árvore nativa da América e assim diminuir a extração comercial da madeira, e também como alternativa para obtenção de pigmento natural azul, oriundo da genipina extraída do jenipapo, o qual já demonstrou ter aplicações promissoras em alimentos e produtos não alimentares (Brauch *et al.*, 2016).

A genipina é um iridóide obtido a partir da hidrólise do geniposídeo, ambos encontrados em diversas espécies vegetais. As espécies mais conhecidas e utilizadas para a extração deste composto são a *Gardenia jasminoides* e a *Genipa americana* L., porém, outras são conhecidas, como a *Eucommia ulmoides* e a *Apodytes dimidiata*. A genipina, quando pura, é considerada um produto de alto valor agregado e com uma vasta gama de aplicações. Atualmente, além do seu emprego na área bioquímica como agente natural de reticulação para imobilização de enzimas, também é utilizada nas áreas biomédica, de curtume e de tingimento de tecidos, além de apresentar características promissoras para emprego na área alimentícia como corante azul. O corante é obtido a partir da genipina, apesar de ela ser incolor quando isolada, ao reagir com grupamentos amino de aminoácidos ou proteínas, se torna uma possível fonte de pigmento, que pode variar entre os tons violeta e o azul-escuro (Touyama, R. *et al.*, 1994). Entre os principais benefícios da genipina está a sua baixa citotoxicidade e alta reatividade com aminoácidos, proteínas e peptídeos (Ramos-de-la-Peña *et al.*, 2015).

A extração da genipina é efetuada há quase 60 anos (Djerassi, Gray and Kincl, 1960), porém, atualmente, com o intuito de reduzir o uso de substâncias tóxicas, novos

trabalhos têm mostrado diferentes técnicas de extração ambientalmente mais adequadas para obtenção da genipina a partir de fontes vegetais. O jenipapo representa uma excelente fonte vegetal para extração de genipina. É encontrado tanto na América Central como no norte da América do Sul e, em comparação com o fruto da gardênia, possui maior teor de genipina e de geniposídeo, precursor da genipina (Bentes and Mercadante, 2014).

A indústria de alimentos utiliza a coloração azul em vários produtos e para obter outras cores, como roxo e violeta. Um dos fatores que limitam o uso de corantes naturais é sua estabilidade e segurança. Em geral, os aditivos naturais são menos estáveis do que os sintéticos. Essa instabilidade incentiva pesquisadores de todo o mundo a procurar novas tecnologias aplicáveis ao mercado de alimentos e bebidas no setor de corantes alimentícios. Assim, o desenvolvimento de um pigmento azul natural para aplicação em alimento, a partir do jenipapo, aparece como alternativa tecnológica e inovadora de beneficiamento do fruto deste fruto. O desenvolvimento de corantes naturais alternativos e seguros do ponto de vista toxicológico, aliado ao conhecimento sobre suas propriedades bioativas e tecnológicas, é de interesse tanto para indústria de alimentos, como para oportunizar investimentos que valorizem o jenipapo, um fruto amplamente distribuído na região tropical brasileira, gerando inclusão social e econômica da população local e de pequenos agricultores que beneficiam o fruto.

À luz do nosso conhecimento, a literatura disponível conta com mais de 3.000 documentos relacionados ao tema genipina (*ScienceDirect* em 11/06/2021, “genipin”). Entretanto, quando é realizada uma busca de genipina e aplicação em alimentos como corante (*ScienceDirect*, “genipin AND food coloring”), aproximadamente 60 artigos foram encontrados. Assim é importante ressaltar que, até então, este tema carece de investigação científica. Portanto, o objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e a bioacessibilidade *in vitro* do corante azul de genipina extraído com tecnologia ambientalmente amigável, além de desenvolver uma metodologia de aplicação do corante obtido em balas e confeitos.

IV OBJETIVOS

O **objetivo geral** deste projeto é obter um corante azul a partir da genipina extraída do jenipapo, avaliar suas propriedades bioativas e aplicar o corante azul em alimentos.

IV.1. Objetivos específicos:

IV.1.1. Extração da genipina a partir do jenipapo

- Utilizar o jenipapo (*Genipa americana* L.) como fonte para a extração da genipina;
- Identificar, por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, os compostos oriundos da extração.

IV.1.2. Obtenção do corante azul de genipina

- Avaliação da ovoalbumina, proteína isolada do soro, proteína isolada de soja, gelatina para obtenção do corante azul de genipina;
- Avaliação de diferentes aminoácidos para obtenção do corante azul de genipina;
- Avaliação da temperatura, pH, tempo reação e concentração dos reagentes (genipina e proteína/aminoácidos) para obtenção do corante azul de genipina;
- Avaliação da cor e de sua estabilidade durante armazenamento do corante.

IV.1.3. Avaliação das propriedades bioativas do corante azul de genipina

- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do corante azul de genipina;
- Avaliação da atividade antimicrobiana do corante azul de genipina;
- Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* do corante azul de genipina.

IV.1.4. Aplicação do corante azul de genipina em alimentos

- Desenvolvimento de uma metodologia para aplicação do corante azul de genipina em balas e confeitos.

V METODOLOGIA

V.1.Extração de genipina a partir do jenipapo (*Genipa americana* L.)

A extração aquosa bifásica será realizada em frascos Erlenmeyer contendo 100 mg de jenipapo verde, previamente liofilizado e triturado, e 1,5 mL da solução tampão enzimática (Celluclast), e 1,5 mL de acetato de etila, conforme descrito por Bellé et al. (2018). Amostras serão coletadas em diferentes intervalos de tempo, centrifugadas e o sobrenadante será analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas para verificação do conteúdo de genipina e outros iridoides.

V.2. Identificar, por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, os compostos oriundos da extração

A identificação e quantificação da genipina extraída será realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um sistema Shimadzu conectado em série a um detector de arranjo de diodos e um espectrômetro de massas com analisador q-TOF e uma fonte de ionização por electrospray (Bruker Daltonics, model microTOF-QIII, Bremen, Germany). As amostras serão filtradas, injetadas no sistema cromatográfico e separadas utilizando uma coluna T3 Atlantis® column (150 mm × 6 mm, 5 µm), usando uma mistura de methanol:milliQ® water (45:55, v/v) como fase móvel a 0.9 mL min⁻¹ and 29 °C (Bellé *et al.*, 2018). A genipina será quantificada utilizando curvas de calibração elaboradas com padrões analíticos de genipina. A genipina será monitorada a 238 nm e os compostos serão identificados em uma faixa com razão massa: carga de m/z 100 to 800 (-/+), a 310 °C e nebulizador a 300 psi.

V.3. Avaliação de diferentes proteínas e aminoácidos para obtenção do corante azul de genipina em diferentes condições de reação

Para a formação do corante azul de genipina, esta (10 mg) será adicionada à 2 mL de soluções de proteínas em diferentes concentrações (ovoalbumina, proteína isolada do soro, proteína isolada de soja e gelatina) ou aminoácidos (glicina, lisina e fenilalanina) em diferentes pHs (6, 7, 8 e 9) e a mistura será mantida em diferentes temperaturas (60°C a 120°C) durante um tempo de até 8 h. A formação do corante azul de genipina será avaliada em espectrofotômetro a 548 nm.

V.4. Avaliação da cor e de sua estabilidade durante armazenamento do corante

A avaliação de cor será realizada em colorímetro Minolta e serão avaliados 3 parâmetros de cor: L*, a* e b*. O valor de a* caracteriza coloração na região do vermelho (+a*) ao verde (-a*), o valor b* indica coloração no intervalo do amarelo (+b*) ao azul (-b*). O valor L nos fornece a luminosidade, variando do branco (L=100) ao preto (L=0).

V.5. Avaliação da atividade antioxidante do corante azul de genipina

A capacidade antioxidante será avaliada pelos métodos DPPH, ABTS e ORAC. O poder de eliminar os radicais DPPH· e ABTS· serão determinados de acordo com o método descrito por Baenas et al. (2020). Resumidamente, 2 µL do corante azul de

genipina diluído serão adicionados à solução estoque dos reagentes DPPH[·] e ABTS[·] (250 µL) com absorvância ~ 1. Em seguida, a solução será agitada e deixada por 50 min a 37 °C. A variação da absorvância será medida em 515 ou 414 nm para o método de DPPH[·] ou ABTS[·], respectivamente. Em relação ao método ORAC, 25 µL do corante azul de genipina serão adicionados a 150 µL de fluoresceína (1 µM) e, após 30 min de incubação, será adicionado 25 µL do radical AAPH (2,20-azobis (2-metilpropionamidina) -di-hidrocloreto) (250 mM). Os resultados serão avaliados medindo a variação da fluorescência a cada 2 min durante 120 min de reação com o radical AAPH. Trolox será usado como padrão. Os resultados serão expressos como µmol Trolox equivalentes (TE) g⁻¹.

V.6.Avaliação da atividade antimicrobiana do corante azul de genipina

As cepas bacterianas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 serão utilizadas para a triagem da atividade antibacteriana. Os ensaios antibacterianos serão realizados pelo método descrito por Baenas et al. (2020). A inibição do crescimento microbiano pelo corante azul de genipina será determinada pelo método de diluição em microtitulação usando diluições duplas em série do agente antimicrobiano. O crescimento bacteriano será determinado pela leitura da absorvância a 620 nm. A atividade inibitória do crescimento será expressa como uma porcentagem média de inibição do crescimento em relação a um controle sem amostra antimicrobiana.

V.7.Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* do corante azul de genipina

Um procedimento de digestão gastrointestinal *in vitro* mimetizando a situação fisiológica no trânsito oro-gastrointestinal será utilizado de acordo com o método descrito por Baenas et al. (2020). Resumidamente, o corante azul de genipina liofilizado será dissolvido em 11 mL de etanol: água (6:94), ajustado para pH 7 com 3 mL de saliva artificial (0,22 g / L CaCl₂, 6,2 g / L NaCl, 2,2 g / L KCl, 1,2 g / L NaHCO₃), e agitada (150 rpm) por 2 min a 37 °C (fase oral). Em seguida, as amostras serão ajustadas para pH 2,0 com HCl 5 M e submetidas à incubação em banho-maria a 37 °C por 2 h sob agitação constante de 150 rpm na presença de 0,7 mL de solução estomacal (20 mg de pepsina suína e 0,7 mL de HCl 0,1 M) (fase gástrica). A digestão gástrica será mantida em gelo por 10 min para interromper a digestão da pepsina. Após isso, as amostras serão ajustadas para pH 6,0 com NaHCO₃ (20 g 100 mL⁻¹), e

V.8. Aplicação do corante azul de genipina em balas e confeitos

VI ETAPAS DE EXECUÇÃO E CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

[illegible]

Análise de genipina por CLAE e espectrometria de massas	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Avaliação de proteínas e aminoácidos para obtenção do corante azul de genipina em diferentes condições de reação		x	x	x								
Avaliação da cor obtida e de sua estabilidade durante armazenamento do corante			x	x	x	x	x	x	x			
Avaliação da atividade antioxidante do corante azul de genipina					x	x	x					
Avaliação da atividade antimicrobiana do corante azul de genipina							x	x				
Avaliação da bioacessibilidade <i>in vitro</i> do corante azul de genipina								x	x			
Aplicação do corante azul de genipina em balas e confeitos										x	x	
Produção de relatórios, publicação de trabalhos									x	x	x	x

VII PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DA EXECUÇÃO DO PROJETO

Com o desenvolvimento deste trabalho, a partir do jenipapo, pretende-se obter um corante azul pó, estável e com potencial bioativo para ser utilizado na indústria de alimentos - especialmente para colorir balas e confeitos que, até o momento, são utilizados majoritariamente corantes artificiais. Além disto, espera-se caracterizar o corante quanto à sua ação antioxidante, por meio de teste *in vitro*, e quanto ao seu

potencial antimicrobiano, característica importante na indústria de alimentos. A partir dos resultados obtidos, outras aplicações para o corante azul de genipina poderão ser estudadas neste projeto, como a aplicação em produtos lácteos, com o intuito de produzir alimentos industrializados que valorizem e explorem os corantes naturais presentes na biodiversidade brasileira.

VIII POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO E/OU DIFUSÃO

Com o desenvolvimento deste projeto de pesquisa espera-se fomentar alternativas viáveis e com segurança alimentar e nutricional para uma melhor valorização e aproveitamento de um fruto nativo e pouco explorado no Brasil, o jenipapo. Por meio da extração da genipina, substância com ação corante e bioativa, um novo insumo alimentício será desenvolvido, possibilitando a geração de produtos de alto valor agregado para o setor industrial.

Além disto, este projeto contribuirá para a criação de uma nova linha de pesquisa, consolidando o grupo de pesquisa já constituído na UFCSPA e que vem trabalhando, há mais de 3 anos, com genipina para diversas aplicações, como por exemplo, como agente reticulante na liberação controlada de fármacos e na imobilização de enzimas. A possível aprovação deste projeto de pesquisa também possibilitará a continuidade da formação acadêmica de alunos de iniciação científica e de mestrado dos mais diversos cursos de graduação da UFCSPA, como Biomedicina, Tecnologia em Alimentos, Química Medicinal e Nutrição.

Por fim, publicações geradas com essa pesquisa contribuirão para uma maior difusão de conhecimento sobre novas possibilidades de melhor exploração extrativista deste fruto que, apesar de sua importância na cultura indígena brasileira, é somente explorado regionalmente por pequenas agroindústrias que carecem de desenvolvimento científico e tecnológico e, ainda, sem um olhar sobre suas propriedades de saúde ao organismo humano.

IX REFERÊNCIAS

- Baenas, N. *et al.* (2020) ‘Characterization of andean blueberry in bioactive compounds, evaluation of biological properties, and in vitro bioaccessibility’, *Foods*, 9(10), pp. 1–16. doi: 10.3390/foods9101483.
- Bellé, A. S. *et al.* (2018) ‘Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from

genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels', *Food Chemistry*, 246(November 2017), pp. 266–274. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.028.

- Bentes, A. D. S. and Mercadante, A. Z. (2014) 'Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa Americana* l.)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), pp. 10800–10808. doi: 10.1021/jf503378k.
- Brauch, J. E. *et al.* (2016) 'Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants?', *Food Research International*, 89, pp. 391–398. doi: 10.1016/j.foodres.2016.08.029.
- Djerassi, C., Gray, J. D. and Kincl, F. A. (1960) 'Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX.1 Isolation and Characterization of Genipin²', *Journal of Organic Chemistry*, 25(12), pp. 2174–2177. doi: 10.1021/jo01082a022.
- Ellman, G. *et al.* (1961) 'A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY', *Biochemical Pharmacology*, 7, pp. 88–95.
- Martins, N. *et al.* (2016) 'Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices', *Trends in Food Science and Technology*, 52, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.tifs.2016.03.009.
- Ramos-de-la-Peña, A. M. *et al.* (2015) 'Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing', *Lwt*, 63(2), pp. 1347–1350. doi: 10.1016/j.lwt.2015.04.038.
- Taham, T., Cabral, F. A. and Barrozo, M. A. S. (2015) 'Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies', *Journal of Supercritical Fluids*, 100, pp. 175–183. doi: 10.1016/j.supflu.2015.02.006.
- Touyama, R. Takeda, Y. Inoue, K. Kawamura, I. Yatsuzuka, M. Ikumoto, T. Shingu, T. Yokoi, T. Inouye, H. (1994) 'NII-Electronic Library Service', *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 17(11), pp. 1460–1462. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb1993/17/11/17_11_1460/_pdf/-char/ja.
- Wu, S. B., Long, C. and Kennelly, E. J. (2013) 'Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil', *Food Research International*, 54(1), pp. 148–159. doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**APRENDIZADO MOTOR E TELEREABILITAÇÃO UTILIZANDO UMA
INTERVENÇÃO COM DANÇA EM PESSOAS COM DOENÇA DE PARKINSON**

CAMILA PINTO

Projeto de Tese de Doutorado -
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto
Alegre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Aline Pagnussat

Porto Alegre

2020

Resumo

O exercício físico tem sido fortemente recomendado para melhorar os sintomas de pessoas com Doença de Parkinson (DP), especialmente aqueles que envolvem a socialização. A dança é um método de exercício físico em grupo que traz benefícios físicos e cognitivos, além de reduzir os níveis de ansiedade e depressão. No entanto, ainda se faz necessário investigar a melhor instrução para ensinar uma nova habilidade motora para indivíduos sem experiência prévia com dança. Ademais, é necessário implementar o exercício aos pacientes sem acesso aos serviços, trazendo à tona a inclusão da telereabilitação. Dessa forma, o presente estudo será dividido em três etapas, cujos objetivos são: 1) verificar a efetividade, viabilidade e segurança de uma intervenção com dança orientada via telereabilitação (orientada à distância) em indivíduos com DP; 2) investigar os efeitos de uma intervenção com dança orientada via telereabilitação (à distância) comparada com a mesma intervenção de forma presencial em indivíduos com DP; 3) investigar dois métodos de instrução verbal para aprendizado motor utilizando uma intervenção com dança presencial em pessoas com DP. A intervenção com dança terá duração de 60 minutos e será realizada duas vezes por semana durante 8 semanas, para a etapa 1, e durante 12 semanas, para as etapas 2 e 3. Na primeira etapa, trata-se de um estudo clínico de viabilidade no qual indivíduos com DP e indivíduos controles saudáveis serão recrutados e ambos receberão uma intervenção com aulas de dança utilizando a plataforma *Zoom*. Desfechos como viabilidade, efetividade e segurança serão avaliados por meio de questionários, controle dos efeitos adversos e aderência ao programa após o término do protocolo. Na segunda etapa, um ensaio clínico randomizado será realizado e indivíduos com DP serão alocados em dois grupos: a) experimental: receberá intervenção com dança à distância (via telereabilitação) e b) controle: receberá intervenção com dança presencialmente. O desfecho principal será qualidade de vida (PDQ-8) e os desfechos secundários serão: resistência de membros inferiores (teste de senta e levanta de 30 segundos), confiança para realizar as atividades de vida diária (ABC) e sintomas não-motores relacionados às atividades diárias (UPDRS I). As avaliações irão acontecer em dois momentos distintos: PRÉ (antes da intervenção)

e PÓS (imediatamente após o término da intervenção). Além disso, após três meses do término da intervenção (FOLLOW UP) os indivíduos serão reavaliados para os desfechos qualidade de vida e confiança para realizar as atividades de vida diária. Na terceira etapa, um ensaio clínico randomizado será realizado. Os participantes com DP serão alocados em dois grupos (experimental e controle) e ambos receberão um protocolo de intervenção com dança presencial. No entanto, os grupos receberão instruções verbais distintas, sendo que o grupo experimental receberá instruções baseadas no foco externo, autonomia e aumento de expectativas e o grupo controle receberá instruções baseadas no foco interno. O desfecho principal será atividade e conectividade encefálica (avaliadas por meio de Ressonância Magnética Funcional). Os desfechos secundários serão aprendizado motor (análise de vídeo 2D), sintomas motores da doença (UPDRS III) e qualidade de vida (PDQ-8). As avaliações irão acontecer em dois momentos distintos: PRÉ (antes da intervenção) e PÓS (imediatamente após o término da intervenção). De forma geral, espera-se que a dança em grupo promova melhora significativa nos sintomas motores e não-motores da DP, além de ser uma atividade física segura para ser implementada via telereabilitação. Além disso, espera-se que a instrução de linguagem que reforce as expectativas, aumente a autonomia e direcione o foco externo para construir os movimentos seja mais efetiva para a aprendizagem motora de pessoas com DP sem experiência prévia com dança.

Introdução e Justificativa

A doença de Parkinson (DP) envolve degenerações proteicas e neuronais, especialmente a degradação da dopamina, proteína existente na substância negra. A morte dos neurônios dopaminérgicos, dentre outras conexões de neurônios, leva à uma desregulação do sistema cortical, acarretando ao indivíduo diversos prejuízos (I) motores e (II) não motores que, somados, acabam incapacitando progressivamente e diminuindo a qualidade de vida da população diagnosticada com DP. Dentre os sintomas mais prevalentes da DP, destacam-se: (I) dificuldades na caminhada, equilíbrio e rigidez; (II) ansiedade, depressão e distúrbios do sono. A dificuldade de manter-se em pé, de se locomover e o aparecimento de quedas da própria altura fazem com que o paciente permaneça mais em casa, diminuindo sua funcionalidade e aumentando seu risco de mortalidade¹. Existem terapias medicamentosas e cirurgias que, embora não sejam eficazes para reverter o quadro, podem auxiliar no controle dos sintomas motores²⁻⁴. No entanto, os efeitos adversos oriundos da terapia medicamentosa, como movimentos involuntários e psicose, exigem a constante investigação de outras formas de tratamento para diminuir os impactos da doença nos pacientes, cuidadores e familiares⁵.

O isolamento social decorrente dos sintomas da doença é outro fator importante que deve ser levado em consideração. Em idosos (população mais acometida pela PD), por exemplo, o risco de isolamento social acomete mais da metade dos indivíduos acima dos 60 anos e está fortemente relacionado com a diminuição da velocidade que a pessoa caminha e com o declínio cognitivo⁶. Dentre as doenças neurodegenerativas crônicas que envolvem especialmente pessoas idosas, a DP prevalece em segundo lugar e permanece crescendo ao longo dos anos, podendo chegar a cerca de 13 milhões de acometidos no mundo em 2040⁷. Sabe-se que a qualidade das relações sociais que um indivíduo possui em sua vida não está somente associada com a manutenção da saúde mental; os índices de morbidade e mortalidade também estão relacionados. Em um estudo com mais de 300 mil pessoas constatou-se um aumento de 50% na probabilidade de sobrevivência dos participantes que mantinham relações sociais⁸. Portanto, uma

forma de reduzir o isolamento social pode partir da convivência e interação em grupo dentro de uma comunidade. A construção de uma comunidade dentro de uma atividade física, por exemplo, poderia reduzir o isolamento social.

Estudos experimentais concluíram que os ganhos neuronais são mais pronunciados quando o exercício físico e a interação social são combinados em uma mesma atividade. A atividade física por si só gera um aumento da neurogênese e dos níveis dos fatores de crescimento neurotróficos, melhorando, portanto, a performance cognitiva como um todo. Além disso, o peso cerebral parece aumentar quando há interação social. Assim, a combinação de fatores sociais, físicos e cognitivos podem trazer benefícios extras⁹. Frequentar regularmente exercícios em grupos pode ser uma solução para melhorar o bem estar emocional e reduzir os níveis de stress¹⁰ que estão aumentados em pessoas com DP¹¹. Ademais, o exercício físico, particularmente, é capaz de gerar diversas mudanças na atividade funcional do córtex, aumentando o suporte sanguíneo cerebral e aumentando o volume de regiões cerebrais relacionadas com a memória¹². Exercitar-se com música, por exemplo, pode trazer benefícios extras recrutando regiões relacionadas com o processamento sensoriomotor, cognição e emoções, de acordo com estudos prévios com neuroimagem¹².

Existem diversas modalidades de exercício em grupo recomendadas para pessoas com DP^{13,14}. Dentre elas, a dança é um tipo de exercício físico, normalmente realizado em grupo, que é capaz de trazer benefícios físicos e cognitivos, melhorando a mobilidade funcional, equilíbrio e status motor quando comparada com outras modalidades de reabilitação^{15,16}. Quando comparada somente com a medicação, mostra-se eficaz na melhora dos sintomas relacionados à caminhada, como congelamento da marcha e velocidade¹⁷, na melhora dos status motor¹⁶ e melhora em testes que avaliam a mobilidade funcional de forma simples¹⁷ e em dupla-tarefa.¹⁸ Além dos sintomas motores, a dança mostra-se eficaz nos sintomas não motores como depressão e ansiedade, aumentando a qualidade de vida.¹⁹ Em diversas pessoas com distúrbios neurológicos crônicos, a dança tem sido uma abordagem terapêutica que motiva e engaja o paciente.²⁰ Dentre muitas

terapias existentes, um dos principais desafios do profissional da reabilitação é engajar o paciente ao tratamento. O nível de adesão às sessões de fisioterapia pode ser muito baixo e isso interfere diretamente na busca do resultado esperado e consequente sucesso do tratamento. Dessa forma, engajar o paciente com algo que seja motivador pode ser uma boa estratégia para melhorar seus resultados.

A maioria dos estudos com dança utiliza um método específico para pessoas com DP, desenvolvido nos Estados Unidos, chamado *Dance for PD*.^{19,21} Este método de dança foi criado em conjunto com indivíduos com DP e adaptado de acordo com a sintomatologia prevalente, incluindo a população em sua maioria. O método conta com o somatório de diferentes estilos de dança, como balé clássico, tango, contemporâneo e sapateado, sendo amplamente aceito na maioria dos países do mundo. A dança engloba diferentes estratégias que, isoladas, fornecem benefícios para indivíduos com DP. Dentro do contexto de intervenção para pessoas com DP, as ferramentas mais utilizadas dentro da prática são: observação e ação, música e dupla tarefa – três estratégias que vem sendo aplicadas separadamente em diversos estudos em pessoas com DP²²⁻²⁶. O treinamento de observação e ação é baseado no sistema de neurônios espelho em que uma pessoa imita a ação de outra. Estudos mostram que a estratégia de observar e imitar ações motoras específicas é capaz de reter o aprendizado motor, reduzindo o número de congelamento da marcha à longo prazo quando comparado com a fisioterapia tradicional²⁶. A música, além de ser usada como ferramenta na prática da dança, também é utilizada como pista auditiva através de batidas constantes por meio de um metrônomo no treinamento da marcha. Concluem-se efeitos positivos como aumento da velocidade e comprimento do passo da caminhada e melhora na mobilidade funcional²²⁻²⁵. Caminhar escutando uma música também pode ser considerada uma tarefa dupla, já que duas atividades requerem atenção ao mesmo tempo²⁵. No entanto, a dupla tarefa é desafiadora para pessoas com DP. Em decorrência da desregulação nos gânglios da base no cérebro²⁷, outras áreas corticais passam a ser demandadas duplamente para a execução de uma simples caminhada falando ao telefone, por exemplo, tornando o sistema sobrecarregado. Dessa forma, treinos que englobem atividades de dupla-tarefa são extremamente

necessários já que são atividades recorrentes nas atividades de vida diária²⁸. Fica evidente que a dança lança mão de diversas ferramentas que, juntas, garantem benefícios importantes ao paciente com DP.

Apesar da ampla literatura orientando a dança como uma estratégia eficaz para gerenciar os sintomas da DP, ainda não foi investigada a melhor abordagem de instrução para facilitar o aprendizado motor para aqueles pacientes sem experiência prévia em dança. O aprendizado motor é um processo importante que permite o resgate e a memória de movimentos rápidos e precisos. Estudos anteriores propuseram instruções otimizadas para o aprendizado motor nas quais incluem três pilares: foco externo (utilização da imaginação para facilitar os movimentos), aumento das expectativas (uso de feedback positivo para aumentar a confiança e motivar) e suporte à autonomia (instruções que dão um senso de escolha)²⁹⁻³¹. Por exemplo, o foco externo da atenção (ou seja, o efeito do movimento) é mais eficaz para o aprendizado motor quando comparado ao foco interno (ou seja, nos próprios movimentos do corpo)³⁰. Indivíduos com DP mantêm uma capacidade suficiente de aprendizado motor, embora o desempenho e a retenção sejam reduzidos em comparação com pessoas sem DP¹⁴. Nesse sentido, ainda é necessário inspecionar a melhor maneira de orientar os novos praticantes a fim de garantir o melhor aprendizado de novas habilidades motoras e facilitar o movimento.

Embora o exercício físico e a reabilitação sejam cruciais para a qualidade de vida de pessoas com DP, nem todas têm acesso aos serviços devido a inúmeras barreiras. Isso pode se enquadrar tanto nas grandes cidades, para aquelas pessoas que são orientadas a ficar em casa devido ao elevado risco de quedas, tanto para as pequenas cidades, nas quais poucas atividades físicas são oferecidas para a comunidade. Como uma solução, a telereabilitação vem sendo estudada como forma de acessibilidade para todos os pacientes^{32,33}. Estudos com alto rigor metodológico têm mostrado que a telereabilitação é segura e apresenta benefícios similares à terapia convencional em pessoas com DP^{34,35}. Em um ensaio clínico³⁴ foi avaliado os efeitos da dança em grupo em pessoas com DP, sendo que as aulas

foram ministradas em dois formatos diferentes: um grupo recebeu aula com o professor conectado por videoconferência e outro com o professor presencialmente. Todos os participantes de ambos os grupos estiveram em contato entre si. Desfechos relacionados à caminhada e ao equilíbrio melhoraram em ambos os grupos ao longo do tempo, sem diferença entre eles. Em um estudo clínico multicêntrico³⁵ foi comparado os benefícios de um atendimento individual via videoconferência com um atendimento individual em clínica em pessoas com DP. Ambos os grupos apresentaram melhoras no equilíbrio postural e não houve diferenças nos níveis de satisfação após as intervenções. O custo total das terapias também foi avaliado para ambos os grupos; aqueles que realizaram a telereabilitação em casa reduziram os custos quase pela metade quando comparado ao atendimento individual em clínica. Cerca de 79,9% da população brasileira possui acesso à internet fixa ou móvel em domicílio, segundo a última pesquisa feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Fica evidente que a internet pode ser útil para romper barreiras físicas na população. Considerando que as pesquisas nas universidades brasileiras acontecem, em sua maioria, em capitais estaduais, muito pacientes deixam de participar de experimentos e receber benefícios devido à distância; esse fato pode ser considerado viés de seleção importante já que não garante a diversidade e abrangência da população estudada. Uma forma de viabilizar a participação da população nas pesquisas clínicas é disponibilizar os serviços online, investigando sua eficácia e suas barreiras.

Utilizando uma intervenção com dança em pessoas com DP, o experimento será dividido em três etapas a fim de responder as problemáticas referentes à viabilidade e segurança da telereabilitação; a eficácia nos sintomas não motores quando comparadas às modalidades telereabilitação e presencial e, por fim, a melhor instrução verbal da prática para aprendizado motor. Levando em consideração a população com DP, esse projeto visa: (1) Investigar a viabilidade e segurança de uma intervenção com dança remota (telereabilitação); (2) Comparar os efeitos da intervenção com dança remota (telereabilitação) versus intervenção presencial na melhora na qualidade de vida e nos sintomas não motores da DP; (3)

Objetivos e Hipóteses

Comparar os efeitos de duas estratégias de instrução de linguagem verbal (foco externo, aumento das expectativas e autonomia versus foco interno) na atividade e conectividade encefálica e no aprendizado motor em uma intervenção com dança na modalidade presencial. Uma das hipóteses desta pesquisa é que a telereabilitação com dança seja viável e segura (etapa 1) e que ambos os grupos de dança, via telereabilitação e presencial, apresentem melhora dos sintomas não-motores da DP e qualidade de vida, sem diferenças entre os grupos (etapa 2). Por fim, espera-se que a linguagem de instrução que leve em consideração os três pilares (foco externo, aumento das expectativas e autonomia) melhore o aprendizado motor e aumente a atividade e conectividade encefálica quando comparada com a instrução de foco interno (etapa 3).

Objetivos

Objetivo Geral: Verificar a viabilidade de uma intervenção com dança remota (telereabilitação) em pessoas com DP, comparando com indivíduos controles saudáveis.

Objetivos Específicos:

- Verificar a aderência e segurança da telereabilitação;
- Verificar a efetividade da telereabilitação avaliando se há modificação na confiança em realizar atividades cotidianas de vida diária que requerem controle postural, na qualidade de vida e na percepção de melhora.

Hipóteses

Espera-se que a telereabilitação com dança seja segura, viável e efetiva na melhora da qualidade de vida e na confiança ao realizar as atividades de vida diária em indivíduos com DP.

Desfechos**Desfecho Principal:**

- Viabilidade da telereabilitação com dança (Questionário de Percepção Individual e controle de aderência ao programa).

Desfechos Secundários:

- Segurança e aderência à telereabilitação (por meio do controle e registro de efeitos adversos durante as intervenções)
- Efetividade da telereabilitação na qualidade de vida, confiança ao realizar as atividades de vida diária e sintomas não motores da DP (PDQ-8; ABC; UPDRS I)

Delineamento

Trata-se de um estudo clínico de viabilidade.

População e Amostra

O recrutamento dar-se-á pela divulgação de cartazes eletrônicos em sites de hospitais/instituições/comunidades; páginas sociais da mídia, como *Facebook*, *Instagram* e *LinkedIn*; e e-mail ou mensagem de texto para participantes que já participaram de pesquisas anteriores do grupo. A arte divulgada na mídia irá conter o título do projeto, o resumo da pesquisa, os critérios de seleção dos participantes e o contato de telefone e e-mail do pesquisador responsável. Os indivíduos serão convidados a participar do estudo por meio de ligação telefônica ou e-mail. A amostra, acrescida de 20% para eventuais perdas, será composta por 12 sujeitos em cada grupo, estimando-se encontrar um tamanho de efeito grande (d Cohen = 1.23) quanto à melhora clinicamente relevante (MCR) no desfecho confiança para realizar as atividades de vida diária (MDR = 11.12 pontos), assumindo um erro de 5% e poder de 90%. No total, serão necessários 24 sujeitos para compor a amostra. A população será composta de sujeitos com diagnóstico de DP (grupo experimental) e sujeitos saudáveis (grupo controle).

Critérios de Inclusão

Para os indivíduos com DP, os critérios de inclusão são: diagnóstico de DP idiopática baseada em critérios clínicos³⁶ de acordo com London Brain Bank Criteria (2006); idade entre 40-85 anos; terapia medicamentosa estável por pelo menos 6 semanas antes do início do estudo; capaz de se manter em pé por mais de dez minutos com ou sem dispositivo de auxílio; pontuação ≥ 21 no Montreal Cognitive Assessment (MoCA)³⁷; aceitar a participação a partir do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, os sujeitos contatados nessa etapa deverão ter acesso à internet, um dispositivo para acessar as aulas online e um familiar e/ou cuidador em casa para o acompanhar durante todo o período do experimento, incluindo as avaliações e tratamento (para aqueles pacientes que tiverem score menor que 2 pontos na escala de severidade da doença (H&Y) indicando leve

comprometimento, independentes nas suas atividades e sem risco de quedas, essa condição sobre ter supervisão em domicílio poderá ser reanalisada pelos pesquisadores).

Para os indivíduos saudáveis, os critérios de inclusão são: idade entre 40-85 anos; capaz de se manter em pé por mais de dez minutos com ou sem dispositivo de auxílio; pontuação ≥ 21 no Montreal Cognitive Assessment (MoCA)³⁷; aceitar a participação a partir do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Além disso, os sujeitos contatados nessa etapa deverão ter acesso à internet, um dispositivo para acessar as aulas online e, se necessário, um familiar e/ou cuidador em casa para o acompanhar durante todo o período do experimento, incluindo as avaliações e tratamento.

Critérios de Exclusão

Para os indivíduos com DP, os critérios de exclusão são: disfunções visuais e auditivas graves, de acordo com avaliação da história médica; outras doenças neurológicas (que não a DP) ou lesão musculoesquelética grave que restrinja a prática das atividades propostas.

Para os indivíduos saudáveis, os critérios de exclusão são: disfunções visuais e auditivas graves, de acordo com avaliação da história médica; doenças neurológicas ou lesão musculoesquelética grave que restrinja a prática das atividades propostas.

Intervenção

Ambos os grupos receberão um protocolo de intervenção com aulas de dança em grupo ministradas por uma fisioterapeuta e professora de dança certificada no método *Dance for PD (EUA)*.^{19,21} A aula é baseada em um aquecimento progressivo (sentado na cadeira – em pé com suporte da cadeira – em pé) e os movimentos são conectados entre si desde o mais básico até o mais complexo, respeitando a capacidade motora de cada indivíduo. Durante a prática, os dançarinos iniciam sentados na cadeira e executam movimentos lentos e rápidos de membros superiores, mobilizações de cabeça e tronco nos três planos de

movimento. Na sequência, os indivíduos são convidados a ficar em pé, contando com o suporte da cadeira, e executam flexões e extensões de membros inferiores, principalmente de joelhos, tornozelos e pés. A terceira parte consiste em treinamentos de locomoção e equilíbrio. Todos os movimentos executados são construídos de acordo com o ritmo e a batida de diferentes estilos musicais, ou seja, a música pode ser lenta (para construir movimentos lentos) ou rápida (para construir movimentos com maior velocidade). A maioria dos movimentos realizados compõe uma coreografia, na qual é ampliada e desafiada no decorrer da evolução das aulas. Os participantes serão estimulados a criar interpretações teatrais e improvisos, a fim de estimular expressões faciais e vocalização. Dependendo da capacidade de cada participante em manter-se em pé, a aula pode ser adaptada para ser realizada somente sentado na cadeira. Será salientado constantemente pela instrutora que os participantes executem suas performances respeitando seus limites e priorizando sua segurança, além de contar com supervisão de um familiar ou cuidador durante todas as intervenções. Dessa forma, os participantes do grupo experimental serão orientados a serem acompanhados por familiar ou cuidador durante todas as intervenções e avaliações remotas. Além disso, as aulas serão supervisionadas por voluntários da área da saúde para monitorar e auxiliar os participantes durante as intervenções.

A instrutora irá conduzir a intervenção remotamente via plataforma *Zoom* e os participantes realizarão as aulas em seus domicílios. Previamente, os sujeitos receberão instruções (via chamada de vídeo ou áudio) sobre como funciona a plataforma *Zoom*, na escolha do dispositivo para assistir as aulas (computador, notebook, tablet ou mobile), na preparação do local domiciliar e na escolha da cadeira para realizar as aulas. Antes do início de cada intervenção, os indivíduos receberão uma notificação (via mensagem telefônica) lembrando da aula. Após a primeira semana de avaliação, a intervenção, para cada grupo, iniciará e será realizada duas vezes por semana (60 minutos cada sessão), durante 8 semanas. Os participantes e/ou familiares e cuidadores receberão um link (via e-mail e mensagem telefônica) previamente ao início do período de tratamento. O link será o mesmo durante todo o período do experimento.

Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados

As avaliações dar-se-ão em dois momentos distintos de forma remota: PRÉ (até duas semanas antes do início da intervenção) e PÓS (até uma semana após o término da intervenção). Todas as avaliações serão realizadas na fase ON da medicação dopaminérgica (até 2 horas após a administração do medicamento). Um pesquisador cegado quanto à intervenção será responsável por conduzir as avaliações.

O cuidador e/ou familiar deve estar presente durante a execução de todas as avaliações via videoconferência e preenchimento de questionários online. Inicialmente, será realizada uma entrevista por meio de ligação de vídeo chamada na qual os participantes serão convidados a participar do estudo e a responder o Protocolo de Avaliação Inicial (ANEXO A); Montreal Cognitive Assessment (MoCA)³⁷ (ANEXO B); New Freezing of Gait Questionnaire (N-FOGQ*)³⁸; Estadiamento da Doença de Hoehn & Yahr (H&Y*)³⁹ (ANEXO D) a fim de caracterizar a amostra. O Questionário MoCA avalia o status cognitivo do indivíduo e o classifica com ou sem declínio cognitivo se pontuação acima ou igual à 21 pontos (pontuação máxima de 30). O Questionário N-FOG avalia o congelamento da marcha - um sintoma motor caracterizado pelo travamento dos membros inferiores durante a caminhada – sendo que a pontuação varia de 0 (sem sintomas) à 28 (sintomas severos); *este questionário só será realizado nos sujeitos com DP. A Escala H&Y classifica o nível de incapacidade motora da DP, variando de 0 (sem sinal da doença) à 5 (grave comprometimento da doença); *este questionário só será realizado nos sujeitos com DP. Nesse mesmo momento, os sujeitos receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) e o Termo de Uso de Imagem (Apêndice 2) via *Google Forms* para ser acordado e enviado ao avaliador em até 48 horas. Na sequência, os participantes receberão os questionários disponibilizados via *Google Forms* (para serem preenchidos pelo computador, notebook, tablet ou mobile). Para todos os questionários, o participante receberá um vídeo do avaliador explicando como preencher as avaliações, além de

instruções digitadas nos próprios documentos a serem enviados. A realização dos testes poderá ser dividida em dois ou mais dias, dependendo de cada participante.

Ao longo das aulas de dança via telereabilitação, o instrutor irá registrar efeitos adversos e as barreiras encontradas pelos participantes em cada aula, a fim de verificar a segurança do protocolo.

Os questionários enviados via *Google Forms* antes (PRÉ) e após (PÓS) o protocolo de intervenção incluem: Seção I da Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS*)⁴⁰ (ANEXO E), Escala Activities-specific Balance Confidence (ABC) (ANEXO F)⁴¹ e Questionário da Doença de Parkinson na versão reduzida (PDQ-8*) (ANEXO G)⁴². A seção I-UPDRS avalia o impacto dos aspectos não motores da DP nas experiências de vida diária dos pacientes; *este questionário só será realizado nos sujeitos com DP. A Escala ABC quantifica o nível de confiança auto percebido para realizar atividades específicas sem perder o equilíbrio ou instabilidade (a pontuação varia de 0 a 100%); será realizada em ambos os grupos. Já o PDQ-8 na versão reduzida contém 8 itens que avaliam de forma direta a qualidade de vida relacionada à saúde de pessoas com DP (a pontuação varia de 0 a 32); *este questionário só será realizado nos sujeitos com DP. A partir desses desfechos será possível analisar a efetividade da intervenção dentro dos desfechos mencionados.

Adicionalmente, após o término do tratamento (PÓS), os pacientes receberão questionários extras a serem preenchidos a fim de verificar a viabilidade da telereabilitação por meio do Questionário de Percepção Individual (ANEXO J)^{43,44} no qual visa analisar o nível de percepção de melhora após o tratamento, além da segurança e viabilidade do protocolo.

Objetivos

Objetivo Geral: Comparar uma intervenção presencial com a intervenção remota (via telereabilitação) utilizando a dança em pessoas com DP.

Objetivos Específicos:

- Comparar a modificação na qualidade de vida entre os grupos;
- Avaliar possíveis modificações na resistência muscular de membros inferiores;
- Verificar a modificação na confiança em realizar as atividades de vida diária, assim como acompanhar o nível de atividade durante o experimento;
- Investigar os efeitos do tratamento nos sintomas não motores da DP, como depressão e ansiedade, além da autopercepção de melhora após a intervenção.

Hipóteses

Espera-se que ambos os grupos apresentem melhora na qualidade de vida, bem como aumento da resistência muscular de membros inferiores, melhora dos sintomas não-motores da DP e da confiança ao realizar as atividades de vida diária.

Desfechos

Desfecho Principal:

- Qualidade de vida (PDQ-8).

Desfechos Secundários:

- Resistência muscular de membros inferiores (SL-30s);
- Confiança nas atividades de vida diária (ABC);

- Sintomas não motores relacionados as atividades de vida diária (UPDRS I);
- Percepção de melhora (Questionário de Percepção Individual);
- Nível de atividade e quedas (Diário).

Delineamento

Trata-se de um ensaio clínico randomizado.

População e Amostra

O recrutamento dar-se-á pela divulgação de cartazes eletrônicos em sites de hospitais/instituições/comunidades; páginas sociais da mídia, como *Facebook*, *Instagram* e *LinkedIn*; e e-mail ou mensagem de texto para participantes que já participaram de pesquisas anteriores do grupo. A arte divulgada na mídia irá conter o título do projeto, o resumo da pesquisa, os critérios de seleção dos participantes e o contato de telefone e e-mail do pesquisador responsável. Os indivíduos serão convidados a participar do estudo por meio de ligação telefônica ou e-mail. A amostra, acrescida de 20% para eventuais perdas, será composta por 14 sujeitos em cada grupo, estimando-se encontrar um tamanho de efeito grande (d Cohen = 1.08) quanto à melhora clinicamente relevante (MCR) no desfecho qualidade de vida (MDR = 5.43 pontos), assumindo um erro de 5% e poder de 90%. No total, serão necessários 28 sujeitos para compor a amostra. Um pesquisador cegado quanto ao processo de avaliação e intervenção fará a randomização estratificada com base na idade, no sexo e na gravidade da doença (avaliado pela escala de Hoehn e Yahr), realizada por meio da ferramenta disponível no site <https://www.random.org/>.

Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão serão os mesmos da Etapa 1.

Intervenção

O protocolo de intervenção com dança será o mesmo descrito na Etapa 1 e iniciará após uma semana da avaliação inicial. O tratamento será realizado duas vezes por semana (60 minutos cada sessão), durante 12 semanas, totalizando 24 sessões. No entanto, os dois grupos receberão as aulas de dança em locais diferentes. Para o grupo experimental a intervenção será realizada de forma remota (em domicílio via telereabilitação utilizando a plataforma *Zoom*) e para o grupo controle a intervenção será presencial. A atividade do grupo controle será realizada no Laboratório de Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. O protocolo, incluindo a progressão dos exercícios e a instrução verbal, será o mesmo para ambos os grupos.

Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados

As avaliações dar-se-ão em três momentos distintos de forma remota: PRÉ (até duas semanas antes do início da intervenção), PÓS (até uma semana após o término da intervenção) e FOLLOW-UP (após três meses do término da intervenção). Todas as avaliações (para ambos os grupos) serão realizadas na fase ON da medicação dopaminérgica (até 2 horas após a administração do medicamento). Um pesquisador cegado quanto à alocação dos participantes nos grupos será responsável por conduzir as avaliações.

Será realizada uma entrevista por meio de ligação de vídeo chamada na qual os participantes serão convidados a participar do estudo e a responder o Protocolo de Avaliação Inicial (ANEXO A); Montreal Cognitive Assessment (MoCA)³⁷ (ANEXO B); New Freezing of Gait Questionnaire (N-FOGQ)³⁸; Estadiamento da Doença de Hoehn & Yahr (H&Y)³⁹ (ANEXO D) a fim de caracterizar a amostra. Nesse mesmo momento, os sujeitos receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 2) e o Termo de Uso de Imagem (Apêndice 4) via *Google Forms* para ser acordado e enviado ao avaliador em até 48 horas. Na sequência, os participantes receberão os questionários disponibilizados via *Google Forms* (para serem preenchidos pelo computador, notebook, tablet ou mobile). Os questionários incluem a seção I da Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)⁴⁰ (ANEXO E), Escala Activities-specific Balance Confidence (ABC) (ANEXO F)⁴¹ e

Questionário da Doença de Parkinson na versão reduzida (PDQ-8) (ANEXO G)⁴². Para todos os questionários, o participante receberá um vídeo do avaliador explicando como preencher as avaliações, além de instruções digitadas nos próprios documentos a serem enviados. Excepcionalmente, o teste senta e levanta em 30 segundos (SL-30s) (Figura 1) será realizado ao vivo via chamada de vídeo e gravado pelo avaliador. Neste momento, os participantes também receberão instruções quanto à utilização do Diário (ANEXO H) cujo objetivo é verificar o nível de atividade, controlar o risco de quedas, as modificações nos sintomas prevalentes da DP - como fadiga, sono, tremor - e controlar o consumo de medicações relacionadas com a DP durante a intervenção. Os participantes iniciarão o preenchimento do diário uma semana antes da intervenção até o término da mesma. Será salientada a importância do cuidador e/ou familiar estar presente durante a execução de todas as avaliações. A realização dos testes poderá ser dividida em dois ou mais dias, dependendo de cada participante.

O *Teste de Senta e Levanta de 30 segundos (SL-30s)* (Figura 3) é validado para a população idosa, podendo ser realizado individualmente com ou sem assistência^{45,46}. A partir do 30sCS é possível avaliar a resistência e força muscular de membros inferiores. Para realiza-lo, é necessária uma cadeira com apoio nas costas, mas sem apoio de braços, posicionada contra uma parede para não mover, e um cronômetro para contar o número de vezes que o sujeito levantou durante 30 segundos. Neste caso, o teste será realizado com a supervisão de um familiar ou cuidador enquanto o participante recebe as instruções do avaliador via videoconferência.

Instruções do Teste:

- 1. Sente na metade para frente da cadeira;*
- 2. Posicione suas mãos nos ombros, cruzando os braços;*
- 3. Posicione toda a planta dos pés no chão;*
- 4. Mantenha suas costas eretas, sem apoio, e os braços cruzados no peito;*
- 5. Quando ouvir “Vá”, levante da cadeira até uma posição em pé completa e sente novamente;*

6. Repita isso quantas vezes puder durante 30 segundos.



Figura 1. Teste de Senta e Levanta de 30 segundos (SL-30s).

Os questionários enviados via *Google Forms* deverão ser preenchidos pelos participantes antes (PRÉ) e após (PÓS) o protocolo de intervenção, bem como a realização do teste SL-30s.

Adicionalmente ao momento PÓS, os participantes deverão preencher outros questionários (enviados via *GoogleForm*) e incluem: *The Friendship Scale* (ANEXO I)⁴⁷ no qual avalia o quanto o indivíduo se sentiu incluído dentro do grupo e o Questionário de Percepção Individual (ANEXO J)^{43,44} no qual visa verificar o nível de percepção de melhora após o tratamento, além da segurança e motivação durante o período de intervenção.

Após três meses do protocolo (FOLLOW-UP), os indivíduos serão contatados novamente para preencher os questionários PDQ-8 e ABC (via *GoogleForm*), relacionados com a qualidade de vida e confiança para realizar as atividades de vida diária, respectivamente.

Objetivos

Objetivo Geral: Investigar se a instrução verbal de uma intervenção com dança baseada nos três pilares foco externo (utilização da imaginação para facilitar os movimentos), aumento das expectativas (uso de feedback positivo para aumentar a confiança e motivar) e suporte à autonomia (instruções que dão um senso de escolha) é superior à linguagem verbal baseada apenas no foco interno (foco nas partes anatômicas para construir os movimentos).

Objetivos Específicos:

- Analisar o aprendizado motor dentro das diferentes instruções;
- Verificar os efeitos da intervenção na atividade e na conectividade encefálica;
- Verificar se há modificação nos parâmetros motores da doença, na percepção de melhora e qualidade de vida.

Hipóteses

Espera-se que ambos os grupos aumentem a atividade cerebral, especialmente em áreas pré-frontais e no córtex auditivo. No entanto, hipotetizamos que aqueles participantes que receberam a instrução baseada nos três pilares melhorem o aprendizado motor, aumentem a conectividade nas áreas mesolímbicas (relacionadas com o reforço do aprendizado e motivação) e áreas relacionadas à memória episódica e declarativa, como o hipocampo, quando comparados com o grupo que recebeu somente uma instrução (grupo controle). Em uma perspectiva à longo prazo, aqueles que receberam instruções de linguagem baseada nos três pilares poderiam empregar menos ativação neuronal, caracterizando uma habilidade especializada.

Desfechos

Desfecho Primário:

- Aprendizado motor (Análise de movimento 2D – *OpenPose*);

Desfechos Secundários:

- Atividade e conectividade cerebral (fMRI *resting state* e teste funcional, respectivamente).
- Gravidade dos sintomas motores (UPDRS III);
- Percepção de melhora (Questionário de Percepção Individual);
- Qualidade de Vida (PDQ-8).

Delineamento

Trata-se de um ensaio clínico randomizado.

População e Amostra

O recrutamento dar-se-á pela divulgação de cartazes eletrônicos em sites de hospitais/instituições/comunidades; páginas sociais da mídia, como *Facebook*, *Instagram* e *LinkedIn*; e e-mail ou mensagem de texto para participantes que já participaram de pesquisas anteriores do grupo. A arte divulgada na mídia irá conter o título do projeto, o resumo da pesquisa, os critérios de seleção dos participantes e o contato de telefone e e-mail do pesquisador responsável. Os indivíduos serão convidados a participar do estudo por meio de ligação telefônica ou e-mail. A amostra, acrescida de 20% para eventuais perdas, será composta por 14 sujeitos em cada grupo, estimando-se encontrar um tamanho de efeito grande (d Cohen = 1.08) quanto à melhora clinicamente relevante (MCR) no desfecho qualidade de vida (MDR = 5.43 pontos), assumindo um erro de 5% e poder de 90%. No total, serão necessários 28 sujeitos para compor a amostra. Um pesquisador cegado quanto ao processo de avaliação e intervenção fará a randomização estratificada com base na idade, no sexo e na gravidade da doença (avaliado pela escala de Hoehn e Yahr), realizada por meio da ferramenta disponível no site <https://www.random.org/>.

Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão são: diagnóstico de DP idiopática baseada em critérios clínicos³⁶ de acordo com London Brain Bank Criteria (2006); idade entre 40-85 anos; terapia medicamentosa estável por pelo menos 6 semanas antes do início do estudo; não ter experiência prévia com dança; capaz de se manter em pé por mais de dez minutos com ou sem dispositivo de auxílio; pontuação ≥ 21 no Montreal Cognitive Assessment (MoCA)³⁷; aceitar a participação no estudo e conceder a assinatura do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Além disso, o critério de inclusão para realizar o exame de Ressonância Magnética Funcional é ter dominância do lado direito do membro superior.

Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão são: disfunções visuais e auditivas graves de acordo com avaliação da história médica; outras patologias neurológicas (que não a DP) ou lesão musculoesquelética grave.

Além disso, os critérios de exclusão para o exame de Ressonância Magnética Funcional são: claustrofobia, uso de marca passo cardíaco, válvula cardíaca com prótese metálica, cliques de aneurisma ou neuro estimulador e maquiagem definitiva ou tatuagem recente nos últimos três meses.

Intervenções

Após a primeira semana de avaliação PRÉ, os participantes serão alocados em dois grupos de dança (protocolo descrito na etapa 1), nos quais receberão os mesmos exercícios, com mesma intensidade, progressão e volume de treino. No entanto, a diferença entre os grupos dar-se-á pela forma como a instrução será dada pela professora, ou seja, a linguagem verbal utilizada para ensinar as novas habilidades motoras da dança. Especificadamente, o grupo experimental receberá instrução verbal baseada em três pilares. O primeiro deles baseia-se no foco externo, ou seja, as instruções serão dadas com o objetivo de usar a imaginação baseada em diferentes sensações, experiências e ambientes a fim de construir os movimentos como, por exemplo, “imagine que você está nadando no mar”. O

segundo pilar envolve o aumento das expectativas dos praticantes, portanto, receberão feedback positivo da instrutora para aumentar a confiança e motivação pessoal. Já o terceiro envolve o suporte à autonomia que permite ao praticante ter um senso de escolha (criar movimentos) em determinados momentos da aula. Diferentemente, o grupo controle não receberá a instrução verbal baseada nos três pilares descritos anteriormente, mas sim, instruções de linguagem baseadas no foco interno. Nesse sentido, as instruções serão explanadas a partir de locais anatômicos do corpo para gerar os movimentos como, por exemplo, “abra e feche os braços pela lateral”. As intervenções estão esquematizadas na Figura 1.

A atividade para ambos os grupos será realizada presencialmente no Laboratório de Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, duas vezes por semana (60 minutos cada sessão) com duração de 12 semanas no total. Ainda, a instrutora convidará a participação de voluntários, familiares e cuidadores dos praticantes com o objetivo de tornar o ambiente seguro, acessível e inclusivo.



Figura 2. Descrição das Intervenções.

Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados

As avaliações dar-se-ão em dois momentos distintos: PRÉ (até duas semanas antes do início da intervenção) e PÓS (até uma semana após o término da intervenção). Todas as avaliações serão realizadas na fase ON da medicação dopaminérgica (até 2 horas após a administração do medicamento). Um pesquisador cego quanto à alocação dos participantes nos grupos será responsável por conduzir as avaliações.

Será realizada uma entrevista presencial (em domicílio ou no Laboratório de Reabilitação da UFCSPA) na qual os participantes serão convidados a participar do estudo e a preencher o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 3), o Termo de Uso de Imagem (Apêndice 4) e o Protocolo de Avaliação Inicial (ANEXO A). Na sequência, os participantes serão avaliados utilizando as seguintes escalas e questionários: Montreal Cognitive Assessment (MoCA)³⁷ (ANEXO B); New Freezing of Gait Questionnaire (N-FOGQ)³⁸; Estadiamento da Doença de Hoehn & Yahr (H&Y)³⁹ (ANEXO D) e a sessão III da Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)⁴⁰ (ANEXO E) que avalia a gravidade dos sintomas motores. Neste momento, os participantes também preencherão o questionário de qualidade de vida (PDQ-8) e receberão instruções quanto à utilização do Diário (ANEXO H) cujo objetivo é verificar o nível de atividade, as modificações nos sintomas prevalentes da DP - como fadiga, sono, tremor - e controlar o consumo de medicações relacionadas com a DP durante a intervenção. Os participantes iniciarão o preenchimento do diário uma semana antes da intervenção até o término da mesma.

Após o término do tratamento (PÓS) os participantes serão avaliados quando à sessão III da UPDRS e preencherão as seguintes ferramentas: *The Friendship Scale* (ANEXO I)⁴⁷ no qual avalia o quanto o indivíduo se sentiu incluso dentro do grupo e o Questionário de Percepção Individual (ANEXO J)^{43,44} no qual visa verificar o nível de percepção de melhora após o tratamento, além da segurança e motivação durante o período de intervenção.

Todas as avaliações (PRÉ e PÓS) descritas acima serão realizadas presencialmente (em domicílio ou no Laboratório de Reabilitação da UFCSPA).

Ademais, os indivíduos serão convidados a realizar dois exames de ressonância magnética funcional (fMRI) fim de detectar as alterações cerebrais ao longo do tratamento (atividade e conectividade cortical). No entanto, nem todos os sujeitos participarão desta fase de avaliação do experimento, já que o exame possui critérios de inclusão e exclusão adicionais descritos anteriormente. Realizarão os exames de fMRI somente aqueles participantes que aceitarem participar e não apresentarem qualquer contraindicação absoluta para a realização o exame. Aqueles que aceitarem e entrarem nos critérios de elegibilidade receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – ADENDO versão Ressonância Magnética (Apêndice 1). O exame será realizado em serviço especializado que possua o equipamento de Ressonância Magnética Ingenya de 1,5 tesla.

Ressonância Magnética Funcional (fMRI)

O primeiro exame será realizado antes de iniciar a intervenção (até 48 horas antes) e o segundo exame será realizado após o término da intervenção (até 48 horas após). Os exames serão realizados na fase ON da medicação (até 2h após a administração) no final do dia, entre 17h e 20h. No total, cada paciente realizará o exame em três momentos distintos. O indivíduo receberá todas as instruções necessárias para realizar o exame, e, poderá ser excluído se apresentar qualquer contraindicação para a realização do mesmo. O participante será assessorado por um pesquisador, um técnico, um enfermeiro e um médico neurologista experientes. Inicialmente, o paciente será conduzido por um pesquisador até uma sala, onde receberá todas as informações sobre os procedimentos a serem realizados. Este momento terá uma duração de 10 minutos. Em seguida, o paciente será encaminhado para uma sala para realizar o exame de fMRI. Durante o exame, o paciente realizará um teste funcional que consiste em um protocolo de exercícios de membros inferiores (tornozelos e pés) baseado em um estudo prévio realizado pelo grupo⁴⁸. Este comando será dado por um pesquisador e, ao mesmo tempo, será visualizado, pelo paciente, em uma tela conectada ao aparelho de fMRI, que

ficará posicionada na frente do paciente. Esta tela mostrará imagens com os comandos para a execução do teste funcional, a cada dois segundos um novo comando é mostrado. Esta etapa do exame tem uma duração aproximada de 20 minutos. Assim, o exame de ressonância magnética funcional cerebral terá uma duração total de 30 minutos.

Aprendizado Motor

Durante as sessões de tratamento com dança, os vinte minutos iniciais das sessões serão filmados a partir de duas câmeras posicionadas em 3 tripés a fim de enquadrar todos os participantes. A filmagem será realizada por um discente voluntário na primeira aula das semanas 1, 6, 9, 12 e 14. Ainda, os indivíduos serão convidados a realizar mais uma única sessão de dança após três meses, com filmagem, a fim de investigar o aprendizado motor e memória motora em cada grupo de forma qualitativa. Os vídeos serão analisados posteriormente por meio de um software chamado *OpenPose* (Análise de Movimento 2D)⁴⁹ no qual estima, quantitativamente, a amplitude articular de movimento de cada participante. Dessa forma, será possível verificar a mobilidade articular de membros superiores, inferiores e tronco durante os movimentos realizados ao longo das sessões. Considerando a amplitude de movimento recrutada e o tempo despendido para realizar os gestos motores, será possível detectar o aprendizado motor ao longo das intervenções.

Análise Estatística

Os dados serão analisados pelo programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS), versão 21.0. O nível de significância será de 5% ($p < 0,05$). A normalidade dos dados será verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Para a etapa 1, será realizada um teste t ou teste de Wilcoxon para verificar o efeito do tempo, respectivamente. Nas etapas 2 e 3 da pesquisa, será utilizada a análise por Generalized Linear Models (GEE) para investigar efeitos do tempo, grupo e interação tempoXgrupo, seguido pelo post-hoc de Bonferroni, quando apropriado. Correlações de Pearson e Spearman serão aplicadas aos dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente.

Exequibilidade

Este projeto de pesquisa visa a integração entre ensino e pesquisa, no qual contará com a participação de alunos de pós-graduação (doutorado e mestrado) e graduação. Os resultados dessa pesquisa serão apresentados para banca examinadora e publicados como forma de artigo(s) científico(s) em revista(s) indexada(s).

O estudo será realizado em parceria com a University of York (Toronto – Canadá), por meio de acordo de cooperação firmado entre os pesquisadores. Poderão ser advindos recursos para pesquisa de edital aprovado pela Universidade Canadense para o custo dos exames de Ressonância Magnética Funcional. Para a realização do estudo, será utilizado o Laboratório de Análise de Movimento e Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Demais materiais necessários para as avaliações clínicas e ainda não disponíveis serão fornecidos pelos pesquisadores. O deslocamento até o local dos experimentos ficará por conta dos sujeitos da pesquisa, mas caso não haja condições, será providenciado uma forma de transporte ou será ressarcido o valor gasto pelo sujeito (de responsabilidade dos pesquisadores).

Considerações Éticas

O documento terá atenção às Diretrizes e Normas para a Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 466/2012) e no que diz respeito ao armazenamento, à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa (Resolução CNS no 196/96 e resolução CNS 441/2011) e a Portaria do Ministério da Saúde (nº 2.201/2011), vigentes no Brasil, às Diretrizes Internacionais do CIOMS e às Diretrizes Consensuais Tripartites para a Boa Prática Clínica (OMS, 1993; ICH, 1996). Além disso, contemplará a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Os sujeitos receberão o convite para a participação voluntária, bem como explicação sobre o objetivo inteiramente científico do estudo, critérios de inclusão e exclusão, conforme exige a Resolução CNS 466/2012. Quando houver concordância em participar da pesquisa, o indivíduo receberá o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1), o qual será lido e explicado pelos pesquisadores. Após a assinatura do termo de consentimento, este será incluído no estudo. A utilização de qualquer tipo de imagem não deverá permitir a identificação do participante e somente será utilizada mediante consentimento por escrito dos participantes.

A pesquisa apresenta riscos mínimos aos participantes que podem ocorrer durante a intervenção com dança, como dor muscular, e/ou durante o preenchimento dos questionários, como desconforto em responder algumas perguntas. O participante terá autonomia para recusar o preenchimento de questionários específicos ou para não realizar movimentos que lhe gerem desconforto durante as intervenções. Em caso de danos diretamente causados por procedimentos desta pesquisa, os participantes receberão uma consulta remota ou em domicílio do profissional de saúde específico para o caso, garantindo tratamento médico com as medicações necessárias ou tratamento fisioterapêutico, se necessário.

Cronograma

ETAPA	Abr – Jun 2020	Jul – Dez 2020	Jan – Mar 2021	Mar – Dez 2021	Jan – Mar 2022	Mar - Dez 2022	Jan – Mar 2023
Elaboração do Projeto	X						
Submissão à Plataforma Brasil	X						
Recrutamento, Projeto piloto, Coleta de Dados e <i>Follow-up</i>		X		X		X	
Análises Estatísticas			X		X		X
Discussão dos Resultados			X		X		X
Redação dos Artigos Científicos			X		X		X

Orçamento

Equipamento Permanente e Materiais de Consumo:

As despesas de custeio de materiais de consumo serão de financiados pelos pesquisadores, com exceção dos exames de ressonância magnética nos quais serão custeados pela York University – Canadá.

Especificação	Quantidade	Valor (R\$)
Exames de Ressonância Magnética	20	20.000,00
Gastos com deslocamento (fase 2 e 3) (se necessário)	908 tickets	4.268,00
Assistência Médica/Fisioterapêutica (se necessário)	20% da amostra (16 participantes)	3.200,00
<i>Material Permanente</i>		
Caixa de som	1	300,00
Ipad	1	3.000,00
<i>Materiais de Consumo</i>		
Papel – Folhas A4	900 folhas	100,00
Cartucho para impressora – PB	10 unidades	450,00
Material de escritório (diversos)	Diversos	200,00
Sub-total		31.518,00
Total geral		31.518,00

Referências

1. Bloem BR, van Vugt JP, Beckley DJ. Postural instability and falls in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 2001;87:209-223.
2. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. Feb 11 2020;323(6):548-560.
3. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. Mar 23 2017;3:17013.
4. Darweesh SKL, Raphael KG, Brundin P, et al. Parkinson Matters. *J Parkinsons Dis*. 2018;8(4):495-498.
5. Ceravolo R, Rossi C, Del Prete E, Bonuccelli U. A review of adverse events linked to dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(2):181-198.
6. Merchant RA, Liu SG, Lim JY, Fu X, Chan YH. Factors associated with social isolation in community-dwelling older adults: a cross-sectional study. *Qual Life Res*. Apr 6 2020.
7. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol*. Jan 1 2018;75(1):9-10.
8. Holt-Lunstad J, Smith TB, Layton JB. Social relationships and mortality risk: a meta-analytic review. *PLoS Med*. Jul 27 2010;7(7):e1000316.
9. Alwis DS, Rajan R. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:156.
10. Yorks DM, Frothingham CA, Schuenke MD. Effects of Group Fitness Classes on Stress and Quality of Life of Medical Students. *J Am Osteopath Assoc*. Nov 1 2017;117(11):e17-e25.
11. Soares NM, Pereira GM, Altmann V, de Almeida RMM, Rieder CRM. Cortisol levels, motor, cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease: a systematic review. *J Neural Transm (Vienna)*. Mar 2019;126(3):219-232.
12. Dhami P, Moreno S, DeSouza JF. New framework for rehabilitation - fusion of cognitive and physical rehabilitation: the hope for dancing. *Front Psychol*. 2014;5:1478.
13. Keus SH, Bloem BR, Hendriks EJ, Bredero-Cohen AB, Munneke M. Evidence-based analysis of physical therapy in Parkinson's disease with recommendations for practice and research. *Mov Disord*. Mar 15 2007;22(4):451-460; quiz 600.
14. Abbruzzese G, Marchese R, Avanzino L, Pelosin E. Rehabilitation for Parkinson's disease: Current outlook and future challenges. *Parkinsonism Relat Disord*. Jan 2016;22 Suppl 1:S60-64.
15. Hidalgo-Agudo RD, Lucena-Anton D, Luque-Moreno C, Heredia-Rizo AM, Moral-Munoz JA. Additional Physical Interventions to Conventional Physical Therapy in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Clin Med*. Apr 7 2020;9(4).
16. Dos Santos Delabary M, Komeroski IG, Monteiro EP, Costa RR, Haas AN. Effects of dance practice on functional mobility, motor symptoms and quality of life in people with Parkinson's disease: a systematic review with meta-analysis. *Aging Clin Exp Res*. Jul 2018;30(7):727-735.
17. de Natale ER, Paulus KS, Aiello E, et al. Dance therapy improves motor and cognitive functions in patients with Parkinson's disease. *NeuroRehabilitation*. 2017;40(1):141-144.

18. Kalyani HHN, Sullivan K, Moyle G, et al. Effects of Dance on Gait, Cognition, and Dual-Tasking in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Parkinsons Dis.* 2019;9(2):335-349.
19. Kalyani HHN, Sullivan KA, Moyle G, Brauer S, Jeffrey ER, Kerr GK. Impacts of dance on cognition, psychological symptoms and quality of life in Parkinson's disease. *NeuroRehabilitation.* 2019;45(2):273-283.
20. Mandelbaum R, Triche EW, Fasoli SE, Lo AC. A Pilot Study: examining the effects and tolerability of structured dance intervention for individuals with multiple sclerosis. *Disabil Rehabil.* 2016;38(3):218-222.
21. Group DPMM. Dance for PD® Training Modules. *Retrieved form.* 2015.
22. Bella SD, Benoit CE, Farrugia N, et al. Gait improvement via rhythmic stimulation in Parkinson's disease is linked to rhythmic skills. *Sci Rep.* Feb 24 2017;7:42005.
23. Ashoori A, Eagleman DM, Jankovic J. Effects of Auditory Rhythm and Music on Gait Disturbances in Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 2015;6:234.
24. Arias P, Cudeiro J. Effect of rhythmic auditory stimulation on gait in Parkinsonian patients with and without freezing of gait. *PLoS One.* Mar 22 2010;5(3):e9675.
25. de Bruin N, Doan JB, Turnbull G, et al. Walking with music is a safe and viable tool for gait training in Parkinson's disease: the effect of a 13-week feasibility study on single and dual task walking. *Parkinsons Dis.* Jul 13 2010;2010:483530.
26. Pelosin E, Barella R, Bet C, et al. Effect of Group-Based Rehabilitation Combining Action Observation with Physiotherapy on Freezing of Gait in Parkinson's Disease. *Neural Plast.* 2018;2018:4897276.
27. Titova N, Padmakumar C, Lewis SJG, Chaudhuri KR. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? *J Neural Transm (Vienna).* Aug 2017;124(8):907-914.
28. Geroi C, Nonnekes J, de Vries NM, et al. Does dual-task training improve spatiotemporal gait parameters in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord.* Oct 2018;55:86-91.
29. Lewthwaite R, Wulf G. Optimizing motivation and attention for motor performance and learning. *Curr Opin Psychol.* Aug 2017;16:38-42.
30. Wulf G, Lewthwaite R. Optimizing performance through intrinsic motivation and attention for learning: The OPTIMAL theory of motor learning. *Psychon Bull Rev.* Oct 2016;23(5):1382-1414.
31. Wulf G, Lewthwaite R, Cardozo P, Chiviawsky S. Triple play: Additive contributions of enhanced expectancies, autonomy support, and external attentional focus to motor learning. *Q J Exp Psychol (Hove).* Apr 2018;71(4):824-831.
32. Ramey L, Osborne C, Kasitinon D, Juengst S. Apps and Mobile Health Technology in Rehabilitation: The Good, the Bad, and the Unknown. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* May 2019;30(2):485-497.
33. Peretti A, Amenta F, Tayebati SK, Nittari G, Mahdi SS. Telerehabilitation: Review of the State-of-the-Art and Areas of Application. *JMIR Rehabil Assist Technol.* Jul 21 2017;4(2):e7.
34. Seidler KJ, Duncan RP, McNeely ME, Hackney ME, Earhart GM. Feasibility and preliminary efficacy of a telerehabilitation approach to group adapted tango instruction for people with Parkinson disease. *J Telemed Telecare.* Sep 2017;23(8):740-746.
35. Gandolfi M, Geroi C, Dimitrova E, et al. Virtual Reality Telerehabilitation for Postural Instability in Parkinson's Disease: A Multicenter, Single-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7962826.
36. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Apr 2008;79(4):368-376.

37. Sobreira E, Pena-Pereira MA, Eckeli AL, et al. Screening of cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnostic validity of the Brazilian versions of the Montreal Cognitive Assessment and the Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised. *Arq Neuropsiquiatr*. Nov 2015;73(11):929-933.
38. Nieuwboer A, Rochester L, Herman T, et al. Reliability of the new freezing of gait questionnaire: agreement between patients with Parkinson's disease and their carers. *Gait Posture*. Nov 2009;30(4):459-463.
39. Goetz CG, Poewe W, Rascol O, et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord*. Sep 2004;19(9):1020-1028.
40. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations. *Mov Disord*. Jul 2003;18(7):738-750.
41. Marques AP, Mendes YC, Taddei U, Pereira CA, Assumpcao A. Brazilian-Portuguese translation and cross cultural adaptation of the activities-specific balance confidence (ABC) scale. *Braz J Phys Ther*. Mar-Apr 2013;17(2):170-178.
42. Jenkinson C, Fitzpatrick R. Cross-cultural evaluation of the short form 8-item Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-8): results from America, Canada, Japan, Italy and Spain. *Parkinsonism Relat Disord*. Feb 2007;13(1):22-28.
43. Landers MR, Navalta JW, Murtishaw AS, Kinney JW, Pirio Richardson S. A High-Intensity Exercise Boot Camp for Persons With Parkinson Disease: A Phase II, Pragmatic, Randomized Clinical Trial of Feasibility, Safety, Signal of Efficacy, and Disease Mechanisms. *J Neurol Phys Ther*. Jan 2019;43(1):12-25.
44. Shanahan J, Morris ME, Bhriain ON, Volpe D, Lynch T, Clifford AM. Dancing for Parkinson Disease: A Randomized Trial of Irish Set Dancing Compared With Usual Care. *Arch Phys Med Rehabil*. Sep 2017;98(9):1744-1751.
45. Gouveia ER, Maia JA, Beunen GP, Blimkie CJ, Fena EM, Freitas DL. Functional fitness and physical activity of Portuguese community-residing older adults. *J Aging Phys Act*. Jan 2013;21(1):1-19.
46. Cobo A, Villalba-Mora E, Hayn D, et al. Portable Ultrasound-Based Device for Detecting Older Adults' Sit-to-Stand Transitions in Unsupervised 30-Second Chair-Stand Tests. *Sensors (Basel)*. Apr 1 2020;20(7).
47. Hawthorne G. Measuring Social Isolation in Older Adults: Development and Initial Validation of the Friendship Scale. *Social Indicators Research*. 2006/07/01 2006;77(3):521-548.
48. Pagnussat AS, Salazar AP, Pinto C, et al. Plantar stimulation alters brain connectivity in idiopathic Parkinson's Disease. *Acta Neurol Scand*. Apr 16 2020.
49. Zago M, Luzzago M, Marangoni T, De Cecco M, Tarabini M, Galli M. 3D Tracking of Human Motion Using Visual Skeletonization and Stereoscopic Vision. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:181.

(ANEXO A) Protocolo de Avaliação Inicial – Ficha de Identificação do Paciente

Data: __/__/____

Nome: _____

Data de nascimento: __/__/____ Idade: _____ Sexo: () F () M Telefone: _____

Peso: _____ Altura: _____ E-mail: _____

Endereço: _____ () Rural () Urbana – Escolaridade: _____

Trabalho: () sim () não/aposentado(a) Diagnóstico de Doença de Parkinson: () sim () não

Início dos Sintomas: __/__/____ Data do Diagnóstico: __/__/____ DBS: () sim () não

Doenças Associadas: () diabetes () pressão arterial () cardiovascular () vertigem () distúrbio do sono
() gastrointestinal () ansiedade () depressão () pulmonar - Cirurgia prévia, se sim, qual? _____

Lesões (dores) musculoesqueléticas atuais, se sim, em qual(is) local(is)? _____

Cirurgia prévia, se sim, qual? _____

Dispositivo para caminhar: () não () raramente () frequentemente () sempre - Se sim, qual? _____

Nível de Atividade Física (considerar uma semana usual/habitual baseada nos últimos 3 meses)

Pratica atividade/exercício físico? () sim () não

Se sim, qual? _____ () vigorosa¹ () moderada² Vezes na semana: _____ Duração: ____ min

Se sim, qual? _____ () vigorosa¹ () moderada² Vezes na semana: _____ Duração: ____ min

Se sim, qual? _____ () vigorosa¹ () moderada² Vezes na semana: _____ Duração: ____ min

Pratica caminhada (pelo menos 10 min contínuos)? () não () sim, em casa () sim, como forma de
transporte () sim, por lazer/exercício Vezes na semana: _____ Duração: ____ min

Experiência Prévia com Dança

Praticante de Dança: () sim () não

Se sim: ____ vezes na semana; ____ número de estilos de dança praticados, quais? _____

Experiência prévia com Dança: () sim () não

Se sim: ____ anos de experiência; ____ número de estilos de dança praticados, quais? _____

Medicações (Antiparkinsonianas)

Nome: _____ Dose: _____ Comprimido: () 1 () ½ () ¼ Número de vezes ao dia: _____

Nome: _____ Dose: _____ Comprimido: () 1 () ½ () ¼ Número de vezes ao dia: _____

Nome: _____ Dose: _____ Comprimido: () 1 () ½ () ¼ Número de vezes ao dia: _____

Nome: _____ Dose: _____ Comprimido: () 1 () ½ () ¼ Número de vezes ao dia: _____

Observações: _____

¹ IPAQ: como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar bola, pedalar rápido na bicicleta, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que faça você suar BASTANTE ou aumentem MUITO sua respiração ou batimentos do coração.

² IPAQ: como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar bola recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que faça você suar leve ou aumente moderadamente sua respiração ou batimentos do coração – não incluir caminhada

(ANEXO B) Montreal Cognitive Assessment (MoCA)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)
Versão Experimental Brasileira

Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
 Escolaridade: _____ Data de avaliação: ____/____/____
 Sexo: _____ Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		Copiar o cubo		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos																		
				[] [] [] Contorno Números Ponteiros		5																		
NOMEAÇÃO																								
						3																		
MEMÓRIA		Leia a lista de palavras. O sujeito deve repeti-las, faça duas tentativas. Evocar após 5 minutos.		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Rosto</th> <th>Veludo</th> <th>Igreja</th> <th>Margarida</th> <th>Vermelho</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1ª tentativa</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2ª tentativa</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	1ª tentativa						2ª tentativa						Sem Pontuação
	Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho																			
1ª tentativa																								
2ª tentativa																								
ATENÇÃO		Leia a sequência de números (1 número por segundo).		O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta [] 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta [] 7 4 2		2																		
Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros.		[] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				1																		
Subtração de 7 começando pelo 100		[] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65		4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto		3																		
LINGUAGEM		Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. []		O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala. []		2																		
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto).		[] _____ (N ≥ 11 palavras)				1																		
ABSTRAÇÃO		Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [] trem - bicicleta [] relógio - régua				2																		
EVOCAÇÃO TARDIA		Deve recordar as palavras SEM PISTAS		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Rosto</th> <th>Veludo</th> <th>Igreja</th> <th>Margarida</th> <th>Vermelho</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>[]</td> <td>[]</td> <td>[]</td> <td>[]</td> <td>[]</td> </tr> </tbody> </table>			Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho		[]	[]	[]	[]	[]	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS						
	Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho																			
	[]	[]	[]	[]	[]																			
OPCIONAL		Pista de categoria [] Pista de múltipla escolha []																						
ORIENTAÇÃO		[] Dia do mês [] Mês [] Ano [] Dia da semana [] Lugar [] Cidade				6																		
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman (UNIFESP-SP 2007)		TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade		_____/30																				

(ANEXO C) New Freezing of Gait Questionnaire (N-FOGQ)

Questionário de Congelamento da Marcha

Parte I – Distinção entre freezer e não freezer (no mês passado)

1. Você experienciou “episódios de congelamento” no último mês?

Sem vídeo: Congelamento é a sensação em que os seus pés estão temporariamente colados no chão enquanto você tenta iniciar uma caminhada, fazer uma curva ou ao caminhar através de espaços estreitos ou lugares lotados. Às vezes pode ser acompanhado de tremores nas pernas ou passos arrastados. Instruções adicionais com vídeo: Assistiremos juntos um vídeo breve para visualizar as muitas maneiras nas quais um congelamento pode ocorrer. Além disso, observe atentamente por quanto tempo esses episódios duram pois você terá algumas perguntas sobre isso ao longo do questionário. (o avaliador aponta o relógio no vídeo)

0. Eu não experienciei esse congelamento ou episódio no mês passado.

1. Eu experienciei esse congelamento ou episódio no mês passado.

**Se a resposta for 1 (o paciente é um freezer), complete as partes II e III. A soma das partes II e III é a pontuação final do NFOG.*

Parte II – Severidade do Congelamento

2. Com que frequência você experencia episódios de congelamento?

0. Menos de uma vez por semana

1. Não frequente, cerca de uma vez por semana

2. Frequentemente, cerca de uma vez ao dia

3. Muito frequente, mais de uma vez ao dia

3. Com que frequência você experencia episódios de congelamento enquanto vira/gira?

0. Nunca

1. Raramente, cerca de uma vez por mês

2. Não frequente, cerca de uma vez por semana

3. Frequentemente, cerca de uma vez ao dia

4. Muito frequente, mais de uma vez ao dia

**Se a resposta for 1 ou mais, vá para a pergunta 4. Se a resposta for 0, vá diretamente para o 5.*

4. Quanto tempo dura seu maior episódio de congelamento enquanto vira/gira?

1. 1 segundo

2. 2 a 5 segundos

3. 5 a 30 segundos

4. Incapaz de andar por mais de 30 segundos

5. Com que frequencia você experiencia episódios de congelamento ao começar a andar (dar o primeiro passo)?

0. Nunca

1. Raramente, cerca de uma vez por mês

2. Não frequente, cerca de uma vez por semana

3. Frequentemente, cerca de uma vez ao dia

4. Muito frequente, mais de uma vez ao dia

**Se a resposta for 1 ou mais, vá para a pergunta 6. Se a resposta for 0, vá diretamente para o nº 7.*

6. Quanto tempo dura seu maior episódio para começar a andar (dar o primeiro passo)?

1. 1 segundo

2. 2 a 5 segundos

3. 5 a 30 segundos

4. Incapaz de andar por mais de 30 segundos

Parte III – Impacto do Congelamento na Vida Diária

7. O quanto os episódios de congelamento atrapalham sua caminhada diária?

0. Nem um pouco

1. Um pouco

2. Moderadamente

3. Significativamente

8. Os episódios de congelamento causam sentimentos de insegurança ou medo de cair?

0. Nem um pouco

1. Um pouco

2. Moderadamente

3. Significativamente

9. Os episódios de congelamento estão afetando suas atividades de vida diária?

(Avalie o impacto do congelamento apenas nas atividades diárias, não o impacto da doença no geral)

0. Nem um pouco, eu continuo fazendo as atividades normalmente

1. Levemente, eu evito apenas algumas atividades diárias

2. Moderadamente, eu evito uma quantidade significativa (mais da metade) de atividades diárias

3. Significativamente, eu fico muito restrito na realização da maioria das atividades diárias

(ANEXO D) Escala de estadiamento da doença de Hoehn & Yahr

ESTÁGIO 0 Nenhum sinal da doença

ESTÁGIO 1 Doença unilateral

ESTÁGIO 1.5 Envolvimento unilateral e axial

ESTÁGIO 2 Doença bilateral sem déficit de equilíbrio

ESTÁGIO 2.5 Doença bilateral leve, com recuperação no “teste do empurrão”

ESTÁGIO 3 Doença bilateral leve a moderada; alguma instabilidade postural;
capacidade para viver independente

ESTÁGIO 4 Incapacidade grave, ainda capaz de caminhar ou permanecer de pé
sem ajuda

ESTÁGIO 5 Confinado à cama ou cadeira de rodas a não ser que receba ajuda

(ANEXO E) MDS UPDRS

Parte I: Aspectos Não Motores das Experiências da Vida Diária (nM-EVD)

1.1 Disfunção cognitiva

Durante a última semana, teve dificuldade em lembrar-se de coisas, acompanhar conversas, prestar atenção, pensar claramente ou em orientar-se em casa ou na cidade?

0: Normal: Sem disfunção cognitiva.

1: Discreto: Disfunção cognitiva identificada pelo paciente ou cuidador, sem interferência concreta na capacidade do paciente desempenhar as suas atividades e interações sociais normais.

2: Ligeiro: Disfunção cognitiva clinicamente evidente, mas apenas com interferência mínima na capacidade do paciente desempenhar as suas atividades e interações sociais normais.

3: Moderado: As disfunções cognitivas interferem, mas não impedem, que o paciente desempenhe as suas atividades e interações sociais normais.

4: Grave: A disfunção cognitiva impede que o paciente desempenhe as suas atividades e interações sociais normais.

1.2 Alucinações e Psicose

Durante a última semana, viu, ouviu, cheirou ou sentiu coisas que não estavam realmente lá?

0: Normal: Sem alucinações ou comportamento psicótico.

1: Discreto: Ilusões ou alucinações não formadas, mas o paciente reconhece-as sem perda de noção da realidade.

2: Ligeiro: Alucinações formadas, independentes de estímulos ambientais. Sem perda de noção da realidade.

3: Moderado: Alucinações formadas com perda de noção da realidade.

4: Grave: O paciente tem delírios ou paranóia.

1.3. Humor depressivo

Durante a última semana, sentiu-se mal, triste, desesperado ou incapaz de apreciar coisas? Se sim, esse sentimento durou mais de um dia de cada vez? Este sentimento trouxe-lhe dificuldades em desempenhar as suas atividades habituais ou em estar com outras pessoas?

0: Normal: Sem humor depressivo.

1: Discreto: Episódios de humor depressivo que não se prolongam por mais de um dia de cada vez. Sem interferência na capacidade do paciente desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

2: Ligeiro: Humor depressivo mantido por vários dias, mas sem interferência na capacidade do paciente desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

3: Moderado: Humor depressivo que interfere mas não impede o paciente de desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

4: Grave: Humor depressivo que impede o paciente de desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

1.4 Ansiedade

Durante a última semana, sentiu-se nervoso, preocupado ou tenso? Se sim, este sentimento durou mais de um dia de cada vez? Isto fez com que tivesse dificuldade em realizar as suas atividades habituais ou em estar com outras pessoas?

0: Normal: Sem ansiedade.

1: Discreto: Sentimento de ansiedade presente mas não mantido por mais de um dia de cada vez. Sem interferência na capacidade do paciente desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

2: Ligeiro: Sentimento de ansiedade presente e mantido por mais de um dia de cada vez. Sem interferências na capacidade do paciente desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

3: Moderado: O sentimento de ansiedade interfere mas não impede o paciente de desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

4: Grave: O sentimento de ansiedade impede o paciente de desempenhar as suas atividades e interações sociais habituais.

1.5 Apatia

Durante a última semana, sentiu-se sem interesse em realizar atividades ou estar com pessoas?

0: Normal: Sem apatia.

1: Discreto: Apatia referida pelo paciente e/ou cuidador, mas sem interferência na realização das suas atividades e interações sociais habituais.

2: Ligeiro: Apatia que interfere com atividades e interações sociais esporádicas.

3: Moderado: Apatia que interfere com a maioria das atividades e interações sociais.

4: Grave: Passivo e com completa perda de iniciativa.

1.6 Aspectos da síndrome de desregulação dopaminérgica

Durante a última semana, teve algum desejo extremamente forte e difícil de controlar? Sentiu-se tentado a fazer ou pensar algo e depois teve dificuldade em parar essa atividade?

0: Normal: Ausência de problemas.

1: Discreto: Os problemas estão presentes mas geralmente não causam dificuldades ao paciente ou família/cuidador.

2: Ligeiro: Os problemas estão presentes e geralmente causam algumas dificuldades na vida pessoal e familiar do paciente.

3: Moderado: Os problemas estão presentes e geralmente causam muitas dificuldades na vida pessoal e familiar do paciente.

4: Grave: Os problemas estão presentes e impedem o paciente de desempenhar as atividades habituais e interações sociais ou impedem a manutenção dos padrões anteriores na vida pessoal e familiar.

1.7 Problemas no sono

Durante a última semana, você teve algum problema para adormecer à noite ou em permanecer dormindo durante a noite? Considere o quanto descansado se sentiu ao acordar de manhã.

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Os problemas do sono existem, mas habitualmente não impedem que tenha uma noite de sono completa.

2: Ligeiro: Os problemas do sono causam habitualmente alguma dificuldade em ter uma noite de sono completa.

3: Moderado: Os problemas do sono causam muitas dificuldades em ter uma noite de sono completa, mas habitualmente ainda durmo mais de metade da noite.

4: Grave: Habitualmente não consigo dormir durante a maior parte da noite.

1.8 Sonolência diurna

Durante a última semana, teve dificuldade em manter-se acordado durante o dia?

0: Normal: Sem sonolência durante o dia.

1: Discreto: Tenho sonolência durante o dia, mas consigo resistir e permaneço acordado.

2: Ligeiro: Por vezes adormeço quando estou sozinho e relaxado. Por exemplo, enquanto leio ou vejo televisão.

3: Moderado: Por vezes adormeço quando não deveria. Por exemplo, enquanto como ou falo com outras pessoas.

4: Grave: Adormeço frequentemente quando não deveria. Por exemplo, enquanto como ou falo com outras pessoas.

1.9 Dor e outras sensações

Durante a última semana, teve sensações desconfortáveis no seu corpo tais como dor, sensação de ardor, formigamento ou câimbras?

0: Normal: Não tenho estas sensações desconfortáveis.

1: Discreto: Tenho estas sensações desconfortáveis. No entanto, consigo fazer coisas e estar com outras pessoas sem dificuldade.

2: Ligeiro: Estas sensações causam alguns problemas quando faço coisas ou estou com outras pessoas.

3: Moderado: Estas sensações causam muitos problemas, mas não me impedem de fazer coisas ou de estar com outras pessoas.

4: Grave: Estas sensações impedem-me de fazer coisas ou de estar com outras pessoas.

1.10 Problemas urinários

Durante a última semana, teve problemas em reter a urina? Por exemplo, necessidade urgente em urinar, necessidade de urinar vezes de mais, ou perder controlo da urina?

0: Normal: Sem problemas em reter a urina.

1: Discreto: Preciso de urinar frequentemente ou tenho urgência em urinar. No entanto, estes problemas não me causam dificuldades nas atividades diárias.

2: Ligeiro: Os problemas com a urina causam-me algumas dificuldades nas atividades diárias. No entanto, não tenho perdas acidentais de urina.

3: Moderado: Os problemas com a urina causam-me muitas dificuldades nas atividades diárias, incluindo perdas acidentais de urina.

4: Grave: Não consigo reter a minha urina e uso uma fralda ou tenho sonda urinária.

1.11 Problemas de obstipação intestinal (prisão de ventre)

Durante a última semana, teve problemas de obstipação intestinal (prisão de ventre) que lhe tenham causado dificuldade em evacuar?

0: Normal: Sem obstipação (prisão de ventre).

1: Discreto: Tive obstipação (prisão de ventre). Faço um esforço extra para evacuar. No entanto, este problema não perturba as minhas atividades ou o meu conforto.

2: Ligeiro: A obstipação (prisão de ventre) causa-me alguma dificuldade em fazer coisas ou em estar confortável.

3: Moderado: A obstipação (prisão de ventre) causa-me muita dificuldade em fazer coisas ou em estar confortável. No entanto, não me impede de fazer o que quer que seja.

4: Grave: Habitualmente preciso da ajuda física de outra pessoa para evacuar.

1.12 Tonturas ao se levantar

Durante a última semana, sentiu que iria desmaiar, ficou tonto ou com sensação de cabeça vazia quando se levantou, após ter estado sentado ou deitado?

0: Normal: Não tenho a sensação de cabeça vazia ou tonturas. 1: Discreto: Tenho a sensação de cabeça vazia ou de tonturas, mas não me causam dificuldade em fazer coisas.

2: Ligeiro: A sensação de cabeça vazia ou de tonturas fazem com que tenha de me segurar a alguma coisa, mas não preciso de me sentar ou deitar.

3: Moderado: A sensação de cabeça vazia ou de tonturas fazem com que tenha de me sentar ou deitar para evitar desmaiar ou cair.

4: Grave: A sensação de cabeça vazia ou de tonturas fazem com que caia ou desmaie.

1.13 Fadiga

Durante a última semana, sentiu-se habitualmente fatigado? Esta sensação não é por estar com sono ou triste.

0: Normal: Sem fadiga.

1: Discreto: Sinto fadiga. No entanto, não me causa dificuldade em fazer coisas ou em estar com pessoas.

2: Ligeiro: A fadiga causa-me alguma dificuldade em fazer coisas ou em estar com pessoas.

3: Moderado: A fadiga causa-me muita dificuldade em fazer coisas ou em estar com pessoas. No entanto, não me impede de fazer nada.

4: Grave: A fadiga impede-me de fazer coisas ou de estar com pessoas.

Parte III: Avaliação Motora

3.1 Fala

0: Normal: Sem problemas de fala.

1: Discreto: Perda de modulação, dicção ou volume, mas todas as palavras são facilmente compreensíveis.

2: Ligeiro: Perda de modulação, dicção ou volume, com algumas palavras não claras, mas a frase como um todo é fácil de compreender.

3: Moderado: A fala é difícil de compreender ao ponto de algumas, mas não a maioria das frases, serem difíceis de compreender.

4: Grave: A maioria da fala é difícil de compreender ou ininteligível.

3.2 Expressão facial

0: Normal: Expressão facial normal.

1: Discreto: Mínima fâcies inexpressiva manifestada apenas pela diminuição na frequência do piscar de olhos.

2: Ligeiro: Além da diminuição da frequência do piscar de olhos, presença de fâcies inexpressiva na parte inferior da face, particularmente nos movimentos da boca, tal como menos sorriso espontâneo, mas sem afastamento dos lábios.

3: Moderado: Fâcies inexpressiva com afastamento dos lábios por algum tempo quando a boca está em repouso.

4: Grave: Fâcies inexpressiva com afastamento dos lábios na maior parte do tempo quando a boca está em repouso.

3.3 Rigidez

0: Normal: Sem rigidez.

1: Discreto: Rigidez apenas detectada com uma manobra de ativação.

2: Ligeiro: Rigidez detectada sem a manobra de ativação, mas a amplitude total de movimento é facilmente alcançada.

3: Moderado: Rigidez detectada sem a manobra de ativação; amplitude total alcançada com esforço.

4: Grave: Rigidez detectada sem a manobra de ativação e amplitude total de movimento não alcançada.

3.4 Bater dos dedos da mão (pinça)

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Qualquer dos seguintes: a) o ritmo regular é interrompido com uma ou duas interrupções ou hesitações nos movimentos; b) lentidão mínima; c) a amplitude diminui perto do fim das 10 repetições.

2: Ligeiro: Qualquer um dos seguintes: a) 3 a 5 interrupções durante os movimentos; b) lentidão ligeira; c) a amplitude diminui no meio da sequência das 10 repetições.

3: Moderado: Qualquer um dos seguintes: a) mais de 5 interrupções durante os movimentos ou pelo menos uma pausa mais longa (bloqueio); b) lentidão moderada; c) a amplitude diminui após o primeiro movimento.

4: Grave: Não consegue ou quase não consegue executar a tarefa devido à lentidão, interrupções ou decrementos.

3.5 Movimentos das mãos

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Qualquer dos seguintes: a) o ritmo regular é interrompido com uma ou duas interrupções ou hesitações dos movimentos; b) lentidão mínima; c) a amplitude diminui perto do fim da tarefa.

2: Ligeiro: Qualquer dos seguintes: a) 3 a 5 interrupções durante o movimento; b) lentidão ligeira; c) a amplitude diminui no meio da tarefa.

3: Moderado: Qualquer dos seguintes: a) mais de 5 interrupções durante o movimento ou pelo menos uma pausa mais prolongada (bloqueio); b) lentidão moderada; c) a amplitude diminui após a primeira sequência de abrir e fechar.

4: Grave: Não consegue ou quase não consegue executar a tarefa devido à lentidão, interrupções ou decrementos.

3.6 Movimentos de pronação-supinação das mãos

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Qualquer dos seguintes: a) o ritmo regular é interrompido com uma ou duas interrupções ou hesitações dos movimentos; b) lentidão mínima; c) a amplitude diminui perto do fim da sequência.

2: Ligeiro: Qualquer dos seguintes: a) 3 a 5 interrupções durante o movimento; b) lentidão ligeira; c) a amplitude diminui no meio da sequência.

3: Moderado: Qualquer dos seguintes: a) mais de 5 interrupções durante o movimento ou pelo menos uma pausa mais prolongada (bloqueio); b) lentidão moderada; c) a amplitude diminui após a primeira sequência de pronação-supinação.

4: Grave: Não consegue ou quase não consegue executar a tarefa devido à lentidão, interrupções ou decrementos.

3.7 Bater dos dedos dos pés

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Qualquer dos seguintes: a) o ritmo regular é interrompido com uma ou duas interrupções ou hesitações dos movimentos; b) lentidão mínima; c) a amplitude diminui perto do fim das 10 repetições.

2: Ligeiro: Qualquer dos seguintes: a) 3 a 5 interrupções durante o movimento; b) lentidão ligeira; c) a amplitude diminui a meio da tarefa.

3: Moderado: Qualquer dos seguintes: a) mais de 5 interrupções durante a sequência ou pelo menos uma pausa mais prolongada (bloqueio); b) lentidão moderada; c) a amplitude diminui após a primeira repetição.

4: Grave: Não consegue ou quase não consegue executar a tarefa devido à lentidão, interrupções ou decrementos.

3.8 Agilidade das pernas

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Qualquer dos seguintes: a) o ritmo regular é interrompido com uma ou duas interrupções ou hesitações dos movimentos; b) lentidão discreta; c) a amplitude diminui perto do fim da tarefa.

2: Ligeiro: Qualquer dos seguintes: a) 3 a 5 interrupções durante os movimentos; b) lentidão ligeira; c) a amplitude diminui no meio da tarefa.

3: Moderado: Qualquer dos seguintes: a) mais de 5 interrupções durante a sequência ou pelo menos uma pausa mais prolongada (bloqueio); b) lentidão moderada; c) a amplitude diminui após o primeiro movimento.

4: Grave: Não consegue ou quase não consegue executar a tarefa devido à lentidão, interrupções ou decrementos.

3.9 Levantar-se da cadeira

0: Normal: Sem problemas. Capaz de se levantar rapidamente sem hesitações.

1: Discreto: O levantar é mais lento que o normal; ou pode ser necessária mais que uma tentativa; ou pode ser necessário mover-se à frente na cadeira para se levantar. Sem necessidade de usar os braços da cadeira.

2: Ligeiro: Empurra-se para cima usando os braços da cadeira sem dificuldade.

3: Moderado: Necessita de se empurrar, mas tende a cair para trás; ou pode ter de tentar mais do que uma vez utilizando os braços da cadeira, mas consegue levantar-se sem ajuda.

4: Grave: Incapaz de se levantar sem ajuda

3.10 Marcha

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Marcha independente com mínima alteração.

2: Ligeiro: Marcha independente, mas com alteração substancial.

3: Moderado: Precisa de um auxílio de marcha (bengala, muleta, andador) para andar em segurança, mas não de outra pessoa.

4: Grave: Incapaz de caminhar ou consegue apenas com ajuda de outra pessoa.

3.11 Bloqueio na marcha (freezing)

0: Normal: Sem bloqueio na marcha (freezing).

1: Discreto: Bloqueio ao iniciar a marcha, ao se virar ou ao atravessar portas com apenas uma interrupção durante qualquer um destes eventos, mas depois continua sem bloqueios durante a marcha em linha reta.

2: Ligeiro: Bloqueio no início, nas voltas ou ao atravessar portas com mais de uma interrupção durante qualquer uma destas atividades, mas depois continua sem bloqueios durante a marcha em linha reta.

3: Moderado: Bloqueia uma vez durante a marcha em linha reta.

4: Grave: Bloqueia várias vezes durante a marcha em linha reta.

3.12 Estabilidade postural

0: Normal: Sem problemas. Recupera com um ou dois passos.

1: Discreto: 3 a 5 passos, mas o paciente recupera sem ajuda.

2: Ligeiro: Mais de 5 passos, mas o paciente recupera sem ajuda.

3: Moderado: Mantém-se de pé em segurança, mas com ausência de resposta postural; cai se não for aparado pelo avaliador.

4: Grave: Muito instável, tende a perder o equilíbrio espontaneamente ou com um ligeiro puxão nos ombros.

3.13 Postura

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: O paciente não está completamente ereto, mas a postura pode ser normal para uma pessoa mais idosa.

2: Ligeiro: Evidente flexão, escoliose ou inclinação lateral, mas o paciente consegue corrigir e adotar uma postura normal quando solicitado.

3: Moderado: Postura encurvada, escoliose ou inclinação lateral, que não pode ser voluntariamente corrigida pelo paciente até uma postura normal.

4: Grave: Flexão, escoliose ou inclinação com postura extremamente anormal.

3.14: Espontaneidade global de movimento (bradicinesia corporal)

0: Normal: Sem problemas.

1: Discreto: Lentidão global e pobreza de movimentos espontâneos discreta.

2: Ligeiro: Lentidão global e pobreza de movimentos espontâneos ligeira.

3: Moderado: Lentidão global e pobreza de movimentos espontâneos moderada.

4: Grave: Lentidão global e pobreza de movimentos espontâneos grave.

3.15 Tremor postural das mãos

0: Normal: Sem tremor.

1: Discreto: O tremor está presente, mas tem menos de 1 cm de amplitude.

2: Ligeiro: O tremor tem pelo menos 1 cm, mas menos de 3 cm de amplitude.

3: Moderado: O tremor tem pelo menos 3 cm, mas menos de 10 cm de amplitude.

4: Grave: O tremor tem pelo menos 10 cm de amplitude.

3.16 Tremor cinético das mãos

0: Normal: Sem tremor.

1: Discreto: O tremor está presente, mas tem menos de 1 cm de amplitude.

- 2: Ligeiro: O tremor tem pelo menos 1 cm, mas menos de 3 cm de amplitude.
- 3: Moderado: O tremor tem pelo menos 3 cm, mas menos de 10 cm de amplitude.
- 4: Grave: O tremor tem pelo menos 10 cm de amplitude.

3.17 Amplitude do tremor de repouso

Extremidades

- 0: Normal: Sem tremor.
- 1: Discreto.: ≤ 1 cm de amplitude máxima.
- 2: Ligeiro: > 1 cm mas < 3 cm de amplitude máxima.
- 3: Moderado: 3 - 10 cm de amplitude máxima.
- 4: Grave: > 10 cm de amplitude máxima.

Lábio/ Mandíbula

- 0: Normal: Sem tremor.
- 1: Discreto: ≤ 1 cm de amplitude máxima.
- 2: Ligeiro: > 1 cm mas ≤ 2 cm de amplitude máxima.
- 3: Moderado: > 2 cm mas ≤ 3 cm de amplitude máxima. Líbio/ Mandíbula
- 4: Grave: > 3 cm de amplitude máxima.

3.18 Persistência do tremor de repouso

- 0: Normal: Sem tremor.
- 1: Discreto: Tremor de repouso presente durante $\leq 25\%$ do tempo de avaliação.
- 2: Ligeiro: Tremor de repouso presente durante 26-50% do tempo de avaliação.
- 3: Moderado: Tremor de repouso presente durante 51-75% do tempo de avaliação.
- 4: Grave: Tremor de repouso presente durante $> 75\%$ do tempo de avaliação.

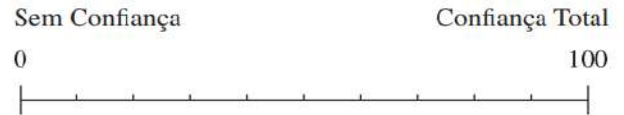
Impacto das discinesias nas pontuações da parte III

- A. Estiveram presentes discinesias (coreia ou distonia) durante a avaliação? () Não () Sim
- B. Se sim, estes movimentos interferiram com as suas pontuações? () Não () Sim

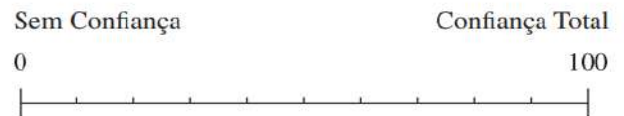
(ANEXO F) The Activities-specific Balance Confidence (ABC) Scale

Cada item abaixo possui uma linha com valores que variam de 0 a 100%. Por favor, verifique seu nível de confiança, lembrando que 0% indica sem confiança e 100% indica confiança total.

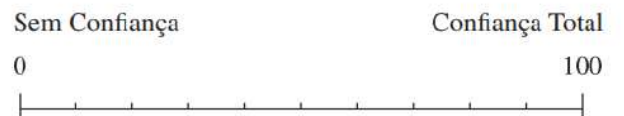
1) Andar pela casa



2) Subir ou descer uma escada



3) Abaixar-se para pegar um objeto no chão



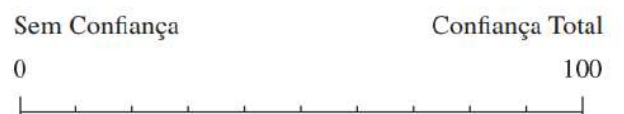
4) Pegar uma latinha numa prateleira na altura dos olhos



5) Ficar na pontas dos pés para pegar algum objeto acima da cabeça



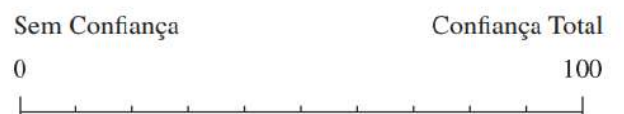
6) Subir em uma cadeira para pegar algo



7) Varrer o chão



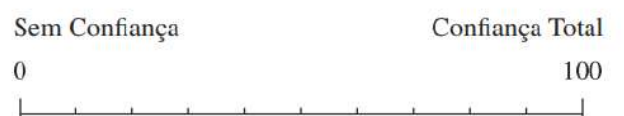
8) Sair de casa e andar até um carro ou ônibus parado em frente



9) Entrar ou sair de um carro



10) Atravessar um estacionamento de supermercado ou shopping



11) Subir ou descer uma rampa



12) Andar em um lugar movimentado onde as pessoas passam rápido por você



13) Esbarrarem em você em um lugar movimentado



14) Subir ou descer de uma escada rolante pegando no corrimão



15) Pegar ou sair de uma escada rolante carregando pacotes e sacolas que o(a) impedem de segurar o corrimão



16) Andar em calçada molhada ou escorregadia



(ANEXO G) Questionário da Doença de Parkinson Reduzida (PDQ-8)

*Devido a ter a doença de Parkinson,
durante o último mês com que
frequência...*

Por favor assinale uma caixa para cada questão

	Nunca	Ocasionalmente	Às Vezes	Frequentemente	Sempre ou não posso de todo fazer
teve dificuldades em movimentar-se em locais públicos?	☐	☐	☐	☐	☐
teve dificuldades em vestir-se?	☐	☐	☐	☐	☐
se sentiu deprimido?	☐	☐	☐	☐	☐
teve problemas de relacionamento com as pessoas mais chegadas?	☐	☐	☐	☐	☐
teve problemas de concentração, p. ex. ao ler ou ao ver televisão?	☐	☐	☐	☐	☐
se sentiu incapaz de comunicar devidamente com pessoas?	☐	☐	☐	☐	☐
teve câibras ou espasmos musculares dolorosos?	☐	☐	☐	☐	☐
se sentiu embaraçado em público devido a ter a doença de Parkinson?	☐	☐	☐	☐	☐

(ANEXO H) Diário

Nome: _____ Aula de Dança: () segundas e quartas-feiras às ____ h ____ min

Observação: deixe o diário ao lado de sua cama e preencha-o todos os dias antes de dormir. Para os itens 1 e 2, responda somente nos domingos.

Semana 1 – Dias ____ - ____							
	2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira	Sábado	Domingo
Escreva o número de MEDICAMENTOS do Parkinson que você tomou hoje.							
Quanto tempo (em horas) você ficou SENTADA(O) hoje.							
Quanto tempo (em horas) você CAMINHOU hoje?							
Quanto tempo (em horas) você ADORMECEU SEM INTENÇÃO durante o dia hoje?							
A FADIGA (cansaço) ou PERDA DE ENERGIA (não lentidão) limitaram as suas atividades do dia de hoje? Responda sim ou não .							
Você teve CONGELAMENTO ou ficou TRAVADA(O) hoje? Escreva o número de vezes e quantos segundos durou.							
Como você se SENTE (humor) hoje? Escreva uma das opções: n=nervosa(o), p=preocupada(o), a=animada(o), c=calma(o)							
Escreva o tempo (em horas) que você DORMIU na noite anterior . Escreva também ao lado quantas vezes você acordou noite.							
De zero à três , escreva o quanto o seu TREMOR o atrapalhou nas suas atividades hoje. (0=nada,1=pouco,2=moderado,3=muito)							
Além das aulas de dança, fiz outras atividades (como exercício, caminhadas longas) durante esta semana : () SIM () NÃO Se sim, descreva a atividade: _____ quanto tempo durou essa atividade (minutos)? _____ quantas vezes você a fez na semana? _____							
Tive dores no corpo sem causa conhecida: () SIM () NÃO Se sim, onde? _____ quantas vezes? _____							
Tive queda da própria altura esta semana : () SIM () NÃO Se sim, quantas vezes? _____ Escreva aqui como ocorreu o(s) episódio(s): _____							

Nota: o quadro acima será repetido durante 13 semanas (uma semana antes do início do tratamento e durante a intervenção).

(ANEXO I) The Friendship Scale

Nas últimas quatro semanas:

* 1 Tem sido fácil me relacionar com as outras pessoas:

- ☐ Quase sempre
- ☐ Na maioria das vezes
- ☐ Cerca da metade do tempo
- ☐ Ocasionalmente
- ☐ Nem um pouco

2. Eu me senti isolado das outras pessoas:

- ☐ Quase sempre
- ☐ Na maioria das vezes
- ☐ Cerca da metade do tempo
- ☐ Ocasionalmente
- ☐ Nem um pouco

* 3 Eu tive alguém para compartilhar meus sentimentos:

- ☐ Quase sempre
- ☐ Na maioria das vezes
- ☐ Cerca da metade do tempo
- ☐ Ocasionalmente
- ☐ Nem um pouco

* 4 Achei fácil entrar em contato com as outras pessoas quando eu precisei:

- ☐ Quase sempre
- ☐ Na maioria das vezes
- ☐ Cerca da metade do tempo
- ☐ Ocasionalmente
- ☐ Nem um pouco

5. Quando eu estava com outras pessoas, eu me senti separado deles:

- ☐ Quase sempre
- ☐ Na maioria das vezes
- ☐ Cerca da metade do tempo
- ☐ Ocasionalmente
- ☐ Nem um pouco

6. Eu me senti sozinho e sem amigos:

- ☐ Quase sempre
- ☐ Na maioria das vezes
- ☐ Cerca da metade do tempo
- ☐ Ocasionalmente
- ☐ Nem um pouco

* Esses itens foram revertidos antes da pontuação.

(ANEXO J) Questionário de Percepção Individual – Adaptado

Sobre as atividades com aulas de dança, responda os itens abaixo:

	1	2	3	4	5
	CONCORDO FORTEMENTE	CONCORDO EM PARTE	NÃO CONCORDO E NEM DISCORDO	DISCORDO EM PARTE	DISCORDO FORTEMENTE
1. Eu gostei muito de participar dessa atividade					
2. Esta atividade foi divertida de fazer					
3. Eu achei essa atividade entediante					
4. Essa atividade não prendeu minha atenção					
5. Eu acho que me saí muito bem nessa atividade					
6. Depois de treinar por um tempo, me senti bastante competente nessa atividade					
7. Estou satisfeito com meu desempenho nessa atividade					
8. Não consegui fazer muito bem essa atividade					
9. Era importante para mim me sair bem nessa atividade.					
10. Eu coloquei muito esforço para realiza-la.					
11. Eu não me esforcei muito para me sair bem nessa atividade.					
12. Não me senti nervoso(a) ao fazer essa atividade.					
13. Eu estava ansioso(a) enquanto realizava a atividade.					
14. Eu acho que essa atividade é importante.					
15. Eu acho que essa atividade teve benefícios para mim.					
16. Consigo me movimentar com mais facilidade					
17. Meu equilíbrio melhorou					
18. Minha caminhada melhorou					
19. Meu humor melhorou					
20. No geral, os sintomas da doença melhoraram.*					
21. No geral, não percebi diferença nos sintomas da doença.*					

22. Eu continuaria nessa atividade se fossem oferecidas novamente.

23. Eu usei as ideias e habilidades aprendidas em aula durante minhas atividades de vida diária

24. Eu me senti seguro(a) fazendo essas atividades à distância com a plataforma online

25. Eu achei que a instrutora forneceu instruções adequadas durante as atividades

26. Eu me sinto confortável para fazer os movimentos por conta própria agora.

27. Estou motivado(a) para continuar fazendo essa atividade.

28. Os exercícios dessa atividade foram intensos.

29. Eu acho que é possível realizar essa atividade à distância

30. Eu tive problemas para acessar e participar das aulas

Nas suas palavras, escreva como você se sentiu com as aulas de dança? _____

Circule a figura que melhor descreve sua relação com o grupo de dança:



Onde "E" = eu e "G" = grupo

* itens específicos para os participantes com Doença de Parkinson.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Fernanda Tereza Bovi Frozza

**Resposta Específica de Memória em
Pacientes Pediátricos de COVID-19**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre,
2021**

Fernanda Tereza Bovi Frozza

Resposta Específica de Memória em Pacientes Pediátricos de COVID-19

Projeto de Pesquisa submetido ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Ciências da Saúde de
Porto Alegre para apreciação do
comitê.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Bonorino

**Porto Alegre,
2021**

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 JUSTIFICATIVA.....	4
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1 PACIENTES.....	5
3.2 SARS-CoV-2 RT-q-PCR	5
3.3 ISOLAMENTO DE PBMCS.....	6
3.4 ESTÍMULO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS T.....	6
3.5 TETRÂMERO DA PROTEÍNA SPIKE.....	6
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO	7
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	7
4. RESULTADOS ESPERADOS E PRODUTOS	8
5. CRONOGRAMA.....	8
6. ORÇAMENTO	8
7. ASPECTOS ÉTICOS	9
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
ANEXOS	14
ANEXO 1 — Parecer consubstanciado do CEP (HNV).....	14
ANEXO 2 — Parecer consubstanciado do CEP (UFCSPA)	23
ANEXO 3 — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	30
ANEXO 4 — Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE).....	37

RESUMO

A pandemia SARS-CoV-2 resultou em mais de 3 milhões de mortes em todo o mundo. O aumento global de casos destaca o COVID-19 como uma emergência de saúde pública de interesse internacional. Apesar de amplamente estudada, a patogênese viral e as interações vírus-hospedeiro não foram completamente elucidadas em pacientes pediátricos, que geralmente apresentam sintomas leves da doença. Recentemente, descrevemos as respostas imunes em uma coorte pediátrica de pacientes com COVID-19 de Porto Alegre. As crianças apresentaram uma resposta humoral e celular robusta ao vírus, com respostas de células T citotóxicas focadas em peptídeos das proteínas estruturais M e N. Neste projeto, iremos analisar as respostas imunes de memória na mesma coorte, perguntando quais respostas de células T e B específicas irão persistir até oito meses após a infecção. PBMCs dos pacientes serão estimulados *in vitro* com peptídeos SARS-COV-2 para avaliar a produção de CD4+ e CD8+ de IFN γ , TNFa e IL-17. Esses resultados são relevantes para a compreensão das respostas imunes diferenciais feitas por crianças contra o SARS-CoV-2 e possivelmente contribuirão para terapias e desenho de vacinas no futuro.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 pandemic has resulted in over 3 million deaths globally. The worldwide rise in cases underscores COVID-19 as a public health emergency of international concern. Despite being widely studied, viral pathogenesis and virus-host interactions have not been completely elucidated in pediatric patients, which generally present mild symptoms of the disease. We have recently described immune responses in a pediatric cohort of COVID-19 patients from Porto Alegre. Children presented a robust humoral and cellular response to the virus, with cytotoxic T cell responses focused on peptides from the M and N structural proteins. In this project, we will analyze memory immune responses in the same cohort, asking which specific T and B cell responses will persist up to eight months after infection. Patients' PBMCs will be stimulated *in vitro* with SARS-CoV-2 peptides to assess CD4+ and CD8+ production of IFN γ , TNFa and IL-17. These results are relevant for the understanding of the differential immune responses made by children against SARS-CoV-2 and will possibly inform therapy and vaccine design.

1. INTRODUÇÃO

A pandemia pelo novo Coronavírus, ou COVID-19, datada inicialmente em novembro de 2019, já conta com mais de 165 milhões de casos confirmados globalmente (WHO, 2021), e o número crescente de mortes apenas destaca essa doença como uma questão emergencial de saúde pública. O SARS-CoV-2, vírus zoonótico responsável pela COVID-19, é altamente transmissível e o contágio ocorre principalmente pela rota respiratória (TAY et al., 2020).

O início dos sintomas geralmente ocorre após um período de incubação do vírus no hospedeiro, que varia de 4 a 5 dias. Enquanto grande parte dos indivíduos acometidos pelo SARS-CoV-2 apresentam sintomas de tosse seca, febre, dor de cabeça, fadiga, dentre outros efeitos brandos, aproximadamente uma a cada seis pessoas evolui para uma forma mais severa da doença (OPAS, 2021), com eventos potencialmente letais incluindo a síndrome respiratória aguda grave (GABRIELLA; ANNALISA, 2020). Quadros clínicos graves são associados principalmente à idade avançada e presença de comorbidades como doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer (SALIMI; HAMLYN, 2020).

Estudos recentes têm demonstrado que os mecanismos de patogênese do vírus inicialmente envolvem a ligação do *Receptor Binding Domain* (RBD) com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) (FU et al., 2020; ZOU et al., 2020), com posterior infiltração em células do trato respiratório (MASON, 2020). A evolução da doença para um pior prognóstico envolve eventos de linfopenia, resposta celular T enfraquecida e produção intensa de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1a e TNFa, responsáveis por dano tecidual e eventos de falha respiratória (GABRIELLA; ANNALISA, 2020; ZHENG et al., 2020).

Apesar da série de pesquisas recentes detalhando os nuances da infecção por SARS-CoV-2 em adultos (CHAN et al., 2020; FAQIHI et al., 2020; MORRIS et al., 2020; PATEL et al., 2020; YAO et al., 2020), poucos são os relatos em relação aos acometimentos do vírus em crianças (GÖTZINGER et al., 2020; PIERCE et al., 2020; XU et al., 2020).

Representando apenas 2,46% das hospitalizações por COVID-19 no Brasil e 0,62% das mortes pela doença, a população pediátrica (0 a 19 anos) conta com evidências epidemiológicas de mortalidade reduzida em comparação com outros grupos etários, além de quadros clínicos que vão de leve a moderado e com menor probabilidade de hospitalização (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2021). Excepcionalmente, sob algumas circunstâncias associadas a comorbidades, crianças podem desenvolver uma síndrome inflamatória multissistêmica (MIS-C) com implicações mais sérias (CHEUNG et al., 2020).

A razão pela qual a infecção por SARS-CoV-2 em crianças e adolescentes costuma ter bom prognóstico ainda não é clara. Nesses indivíduos, o perfil imunológico avaliado durante a infecção sugere uma produção robusta de citocinas pró-inflamatórias incluindo IFN γ e IL-17A (PIERCE et al., 2020), em contraste com uma menor proporção de células CD4 $^{+}$ efectoras e redução da atividade monocitária em relação a adultos infectados (COHEN et al., 2021).

Nosso grupo demonstrou previamente que pacientes pediátricos infectados por SARS-CoV-2, no momento inicial da doença, contam com uma alta frequência de células T CD8 $^{+}$ TNF α^{+} específicas ao nucleocapsídeo (N) e proteína de membrana viral (M), além de células dendríticas (DCs) com forte expressão de HLA-DR e baixos níveis de CX3CR1, geração de resposta humoral específica pelos altos níveis de IgG anti-N, e uma alta parcela de células T e B naïves (FAZOLO et al., 2021).

A interpretação conjunta desses dados sugere que pacientes pediátricos com COVID-19 são capazes de gerar um vasto repertório de resposta humoral e celular específica, sobretudo contra as proteínas M e N do SARS-CoV-2, e que a produção de TNF α específica pode ser associada à proteção contra o vírus. Além disso, o fato de possuírem um *pool* considerável de células naïve também pode contribuir para respostas imunes mais rápidas e eficientes.

Com os resultados preliminares da infecção por SARS-CoV-2 pediátrica já estabelecidos, futuras análises para avaliação da memória imunológica desses pacientes se faz de extrema importância, dada a atual escassez de dados acerca da resposta imune contra o COVID-19 a longo prazo em crianças. Este trabalho pretende investigar quais respostas T e B de memória serão produzidas e/ou persistirão em pacientes pediátricos com COVID-19 até oito meses após a infecção.

1.1 JUSTIFICATIVA

A ascensão contínua de casos de COVID-19 no Brasil e no mundo traz consigo a necessidade de compreensão dos mecanismos de patogênese do SARS-CoV-2 e identificação de perfis imunológicos associados a melhores prognósticos da doença. Apesar de amplamente estudados no momento, tais parâmetros raramente têm sido avaliados em crianças por uma série de fatores que envolvem questões éticas e legais. O presente trabalho se faz relevante e necessário em razão das perspectivas de identificação da resposta imunológica de memória contra o SARS-CoV-2 em crianças, o que poderá contribuir e acrescentar ao que já se sabe sobre a formação de memória imunológica e proteção contra o vírus.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar o perfil imune de memória de pacientes pediátricos com COVID-19 através da análise da resposta celular T e B SARS-CoV-2 específica 8 meses após a infecção;
- Verificar a frequência de células T CD4+ e CD8+ pela produção de IFN γ , IL-17 e TNF α após estímulo *in vitro* com os peptídeos M, N e S;
- Verificar o repertório de células B de memória e plasmócitos de longa duração Spike-específicos oito meses após a infecção por SARS-CoV-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo de coorte prospectivo de pacientes com COVID-19, incluindo crianças (n= 17), adultos com quadro leve (n= 30) e severo (n= 23) da doença, que visa avaliar o perfil imune de memória contra o SARS-CoV-2.

Por ser uma pesquisa derivada do projeto em andamento COVIDA, parte da metodologia proposta já foi realizada, incluindo o recrutamento dos pacientes, confirmação do diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR e isolamento e

congelamento das PBMCs do sangue coletado. Dando seguimento ao projeto, este trabalho tem o intuito de avaliar a resposta T e B de memória contra o SARS-CoV-2 oito meses após infecção, com enfoque nas crianças do estudo.

3.1 PACIENTES

As amostras utilizadas são provenientes de pacientes do Hospital Moinhos de Vento e Hospital da Restinga Extremo Sul, situados em Porto Alegre, RS. Indivíduos incluídos no estudo foram selecionados de Junho a Dezembro de 2020, com idades superiores a dois meses, podendo estar hospitalizados, em salas de emergência ou fora de unidades de saúde. O recrutamento ocorreu em indivíduos que apresentassem tosse e/ou temperatura axilar superior a 37,8°C e/ou dor de garganta.

No momento do recrutamento, amostras de sangue e swabs da nasofaringe foram coletados com posterior RT-PCR para diagnóstico de COVID-19, critério este de inclusão para seleção para o estudo. Conjuntamente, dados clínicos e demográficos de cada indivíduo foram coletados, e a classificação do quadro clínico de COVID-19 foi definida de acordo com dados da OMS (WHO, 2020).

3.2 SARS-CoV-2 RT-q-PCR

O ensaio de RT-PCR para SARS-CoV-2 foi realizado para todos os participantes. Amostras da nasofaringe e orofaringe foram coletadas com swab e transportadas em meio com solução salina e RNAlater® (AM7021, Invitrogen™). O kit de isolamento de ácido Nucleico viral MagMax™ (Applied Biosystems) foi utilizado para extrair o RNA viral na plataforma automatizada Duo Prime da KingFisher (ThermoFisher, USA).

Para o ensaio de RT-PCR, foi utilizado o Path™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (A15299, AppliedBiosystems) e o kit de ensaio v1 TaqMan™ 2019-nCoV (A47532, AppliedBiosystems), que contém alvos específicos do SARS-CoV-2 (ORF1ab, gene S e gene N). Como controle foi utilizado 5uL do kit de controle v1 TaqMan™ 2019-nCoV (A47533, AppliedBiosystems). O QuantStudio 5

(ThermoFisher Scientific, USA) foi o equipamento utilizado para realização do ensaio de RT-PCR.

3.3 ISOLAMENTO DE PBMCS

Amostras de sangue foram coletadas em tubos EDTA e armazenadas em temperatura ambiente. PBMCs foram isoladas por gradiente de densidade através de centrifugação, com utilização de Ficoll™ PLUS (GE Healthcare®). Quando não analisadas no momento do procedimento, foram ressuspensas em Soro Fetal Bovino (SFB) com 5% de DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento de uso.

3.4 ESTÍMULO *IN VITRO* DE CÉLULAS T

Posteriormente ao descongelamento das células que foram separadas e criopreservadas após os pontos de coleta do estudo, será realizada a contagem e avaliação da viabilidade celular das PBMCs com consequente plaqueamento em placas de 96 poços com cerca de 3×10^5 PBMCs por poço em 100uL de meio RPMI1640 suplementado com soro fetal bovino 10% e antibióticos (100IU de penicilina/mL, 100µg de estreptomicina/mL e 2mM L-glutamina (Lonza, Belgium)).

As células plaqueadas serão então estimuladas com sinais co estimulatórios anti-CD3 e anti-CD28 juntamente com 1µg/mL dos peptídeos específicos do SARS-COV-2: PepTivator SARS-CoV-2 Prot S, M e N (130-126-700 - Miltenyi Biotec, Germany). Depois de tratadas, as placas ficarão por 24h em estufa a 37°C/ CO2 5%. Três horas antes da colheita das células, será adicionado 1µg/mL de Golgi Plug (BD Biosciences, USA) em cada poço. As células serão marcadas e analisadas por citometria de fluxo de acordo com os fenótipos estabelecidos.

3.5 TETRÂMERO DA PROTEÍNA SPIKE

A proteína Spike na sua forma trimérica será biotinilada (Thermo Scientific EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit) e tetramerizada com estreptavidina-PE

com posterior armazenamento em glicerol 50% em temperatura de -20°C, conforme descrito em outros protocolos (RODDA et al., 2020).

Com a finalidade de detectar populações celulares mais raras, as PBMCs serão coradas com a Spike tetramerizada (10nM), marcadas de acordo com a imunofenotipagem definida no item abaixo, e analisadas por citometria.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Após o estímulo *in vitro*, as células T serão analisadas por citometria de fluxo para avaliação de imunofenotipagem. Para isso, células serão marcadas com BD Horizon™ Fixable *Viability Stain* 510 juntamente com os anticorpos marcadores de superfície: anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T4), anti-CD8-APCH7 (clone HIT8a), anti-CD45RA-PE-Cy7 (clone L48), anti-CCR7-BV421 (clone 2-L1-A), anti-IFN γ -FITC (clone 4S.B3), anti-TNF-APC (clone MAb11) e anti-IL-17-PE (clone SCPL1362).

Células B serão avaliadas com os seguintes marcadores: anti-CD19-APC (clone HIB19), anti-CD27-PerCP-Cy5.5 (clone M T271), anti-CD38-PE (clone HIT2), anti-IgG-FITC (clone G18-145), anti-IgM-BV421 (clone G20-127).

Depois de corados com o tetrâmero da proteína Spike, PBMCs serão marcados com: anti-CD19-APC (clone HIB19), anti-CD27-PerCP-Cy5.5 (clone M- T271), anti-CD38-PE (clone HIT2) e anti-CD24-APC-H7 (clone ML5).

As amostras serão analisadas através do BD Biosciences - FACSCanto II e pelo software FlowJo 10.7.1..

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística será realizada através do *GraphPad Prism* (Versão 9), com os testes não paramétricos de *Mann Whitney* para comparações entre dois grupos e *Kruskal-Wallis* para múltiplas comparações. Para avaliação de correlação entre variáveis, será utilizado o teste de Spearman. Análises serão consideradas significativas quando o valor de p for inferior a 0,05.

4. RESULTADOS ESPERADOS E PRODUTOS

Este trabalho pretende identificar quais respostas imunes de memória serão formadas contra o SARS-CoV-2 através da análise do repertório de células T e B de pacientes pediátricos 8 meses após a infecção. Os resultados obtidos serão pertinentes para compreensão dos mecanismos imunológicos que mediam a proteção a longo prazo do organismo contra o vírus.

5. CRONOGRAMA

Tabela 1.

	Revisão de Literatura	Padronização dos Protocolos Experimentais	Experimentos	Análise e interpretação	Produção científica	Créditos para o Mestrado
Ago/Out 2021	X	X				
Nov/ Jan 2022	X	X		X	X	X
Fev/ Abr 2022	X		X	X	X	X
Mai/ Jul 2022	X		X	X	X	X
Ago/Out 2022	X			X	X	X
Nov/ Jan 2023	X			X	X	X
Fev/ Abr 2023	X			X	X	X
Mai/ Ago 2023	X			X	X	X

Tabela 1. Cronograma proposto para execução do mestrado. FONTE: do Autor, 2021.

6. ORÇAMENTO

Os equipamentos, materiais e insumos a serem utilizados nesta pesquisa já foram adquiridos por parte do projeto COVIDA, com financiamento PROADI do Ministério da Saúde em parceria com o Hospital Moinhos de Vento.

7. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto do qual este trabalho é derivado conta com parecer por parte do Hospital Moinhos de Vento (IRB 30749720.4.1001.5330) e pelo Comitê de Ética da UFCSPA (CAAE 30749720.4.3001.5345). O consentimento legal foi obtido de todos os participantes ou guardiões legais através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Anexos 1, 2, 3 e 4, respectivamente).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAN, Paul K. S. et al. Serologic Responses in Healthy Adult with SARS-CoV-2 Reinfection, Hong Kong, August 2020. **Emerging infectious diseases**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 3076–3078, 2020. DOI: 10.3201/eid2612.203833.

CHEUNG, Eva W.; ZACHARIAH, Philip; GORELIK, Mark; BONEPARTH, Alexis; KERNIE, Steven G.; ORANGE, Jordan S.; MILNER, Joshua D. Multisystem Inflammatory Syndrome Related to COVID-19 in Previously Healthy Children and Adolescents in New York City. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 324, n. 3, p. 294–296, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.10374.

COHEN, Carolyn A. et al. SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection. **medRxiv : the preprint server for health sciences**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1101/2021.02.02.21250988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33564773><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7872365>.

FAQIHI, Fahad; ALHARTHY, Abdulrahman; ALODAT, Mohammed; KUTSOGIANNIS, Demetrios J.; BRINDLEY, Peter G.; KARAKITSOS, Dimitrios. Therapeutic plasma exchange in adult critically ill patients with life-threatening SARS-CoV-2 disease: A pilot study. **Journal of Critical Care**, [S. l.], v. 60, p. 328–333, 2020. DOI: 10.1016/j.jcrc.2020.07.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.07.001>.

FAZOLO, Tiago; LIMA, Karina; FONTOURA, Julia C.; SOUZA, Priscila Oliveira De; NETO, Castilhos Ferreira; HAUBERT, Alisson F.; GAMBIN, Izza; OLIVEIRA, Aline C.; RAISSA, S. Strong anti-viral responses in pediatric COVID-19 patients in South Brazil. **Preprint**, [S. l.], p. 1–37, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.04.13.21255139>.

FU, Jiewen; ZHOU, Baixu; ZHANG, Lianmei; BALAJI, Kyathgowdanadoddi

Srinivasa; WEI, Chunli; LIU, Xiaoyan; CHEN, Hanchun; PENG, Jiangzhou; FU, Junjiang. Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 4383–4392, 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05478-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05478-4>.

GABRIELLA, Mauro; ANNALISA, Capuano. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 84, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106519>.

GÖTZINGER, Florian et al. COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. **The Lancet Child and Adolescent Health**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 653–661, 2020. DOI: 10.1016/S2352-4642(20)30177-2.

MASON, Robert J. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. **Eur Respir J**, [S. l.], v. 55, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.00607-2020>.

MORRIS, Sapna Bamrah et al. Case Series of Multisystem Inflammatory Syndrome in Adults Associated with SARS-CoV-2 Infection — United Kingdom and United States, March–August 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [S. l.], v. 69, n. 40, p. 1450–1456, 2020. DOI: 10.15585/mmwr.mm6940e1.

OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde. **Folha informativa sobre COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde** Paho.Org, 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19>.

PATEL, A.; CHARANI, E.; ARIYANAYAGAM, D.; ABDULAAL, A.; DENNY, S. J.; MUGHAL, N.; MOORE, L. S. P. New-onset anosmia and ageusia in adult patients diagnosed with SARS-CoV-2 infection. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 1236–1241, 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.05.026. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.026>.

PIERCE, Carl A. et al. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 564, 2020. DOI: 10.1126/scitranslmed.abe8120.

RODDA, Lauren B.; NETLAND, Jason; SHEHATA, Laila; PRUNER, Kurt B.; MORAWSKI, Peter A.; THOUVENEL, Chris. Functional SARS-CoV-2-specific immune memory persists after mild COVID-19. **medRxiv**, [S. l.], n. 165, p. 1–13, 2020.

SALIMI, Shabnam; HAMLYN, John M. COVID-19 and Crosstalk With the Hallmarks of Aging. **The Journals of Gerontology: Series A**, [S. l.], v. XX, n. Xx, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1093/gerona/glaa149.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Dados Epidemiológicos da COVID-19 em Pediatria**. 2021.

TAY, Matthew Zirui; POH, Chek Meng; RÉNIA, Laurent; MACARY, Paul A.; NG, Lisa F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020. DOI: 10.1038/s41577-020-0311-8.

WHO. WHO-2019-nCoV-Surveillance_Case_Definition-2020.2-eng. [S. l.], n. December, p. 2020, 2020.

WHO. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data**Who, 2021. Disponível em: <https://covid19.who.int/>.

XU, Yi et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 502–505, 2020. DOI: 10.1038/s41591-020-0817-4.

YAO, Qingchun et al. A retrospective study of risk factors for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infections in hospitalized adult patients. **Polish Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. 130, n. 5, p. 390–399, 2020. DOI: 10.20452/pamw.15312.

ZHENG, Meijuan; GAO, Yong; WANG, Gang; SONG, Guobin; LIU, Siyu; SUN, Dandan; XU, Yuanhong; TIAN, Zhigang. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular and Molecular Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 533–535, 2020. DOI: 10.1038/s41423-020-0402-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>.

ZOU, Xin; CHEN, Ke; ZOU, Jiawei; HAN, Peiyi; HAO, Jie; HAN, Zeguang. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers of Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 185–192, 2020. DOI: 10.1007/s11684-020-0754-0.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROJETO DE DOUTORADO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA *OUTDOOR* E *INDOOR* E
DO EXERCÍCIO FÍSICO NA SAÚDE DE ADULTOS SAUDÁVEIS**

Bruna Marmett

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Ramos Rhoden

Coorientador: Prof. Dr. Ramiro Barcos Nunes

Junho, 2018

Resumo

A poluição atmosférica é considerada o maior dos riscos ambientais para a saúde, estima-se que 7 milhões de mortes precoces por ano estejam associadas a poluição do ar. Da mesma forma, a inatividade física é um dos principais problemas de saúde pública do século 21. A prática de exercício representa uma melhora na saúde e na qualidade de vida, entretanto a sua realização em ambientes poluídos pode representar uma maior exposição aos contaminantes atmosféricos em função do aumento da taxa ventilatória. Por conseguinte, a realização de exercício em ambientes poluídos tornou-se um tópico divergente, havendo um questionamento se a realização de exercício em ambientes *outdoor* e *indoor* é capaz de causar efeitos benéficos que se sobrepõem aos danos causados pela poluição e pelo estilo de vida sedentário. Os estudos abordando esse tema obtêm resultados controversos. O objetivo deste estudo é investigar os efeitos à saúde causados pela exposição à poluição atmosférica durante a realização de exercício em ambientes *outdoor* e *indoor*. Para tal fim será realizado um estudo prospectivo transversal com 150 participantes para compor os seguintes grupos: grupo exercício *outdoor*, grupo exercício *indoor*, grupo controle. Os participantes responderão questionários de perfil sociodemográfico, de sintomas respiratórios e de consumo de álcool. Será realizada: anamnese para verificar o histórico de saúde; avaliação nutricional; mensuração do nível de atividade física; aferição de variáveis hemodinâmicas; avaliação de função pulmonar; exposição ao fumo; glicemia e perfil lipídico; marcadores de estresse oxidativo; perfil inflamatório; toxicidade pulmonar; determinação de metais; dano genotóxico; além de análises ambientais como concentração de dióxido de nitrogênio, ozônio e material particulado fino (MP_{2,5}).

Palavras-chave: Poluição do Ar; Monitoramento do ar; Exercício; Estresse Oxidativo; Toxicidade.

1. Introdução

A poluição atmosférica é considerada o maior dos riscos ambientais para a saúde, sendo um significativo fator causador de diferentes doenças. Segundo dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde, uma a cada 8 mortes por ano no mundo está associada a poluição do ar (Lelieveld *et al.*, 2015; WHO, 2016). Os atuais níveis de emissão de poluentes são responsáveis por aumentar o risco de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doenças respiratórias agudas e crônicas, câncer, doenças metabólicas e infertilidade (Kampa e Castanas, 2008; Burnett *et al.*, 2014; Checa Vizcaíno *et al.*, 2016; Pope *et al.*, 2016). A contaminação do ar por poluentes em ambientes abertos corresponde a poluição *outdoor*, enquanto a concentração de poluentes nos ambientes fechados representa a poluição *indoor*, ambas apresentam diferença na sua composição e são igualmente prejudiciais à saúde. Estima-se que, em 2015, a mortalidade decorrente da poluição *outdoor* foi de 4,2 milhões e da poluição *indoor* 2,8 milhões, totalizando 6,4 milhões de mortes no mundo (WHO, 2010b; Challoner *et al.*, 2015; Prüss-Üstun *et al.*, 2016).

Os efeitos prejudiciais causados pela exposição a poluição na saúde são decorrentes da capacidade que estes poluentes apresentam de desencadear estresse oxidativo e ativar a resposta inflamatória (Aguilera *et al.*, 2016; Fraunberger *et al.*, 2016; Pope *et al.*, 2016). A inalação destas partículas aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), a produção excessiva destas pode levar a sobreposição de moléculas oxidantes sobre as defesas antioxidantes do nosso organismo causando estresse oxidativo. Neste contexto, pode ocorrer oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios e dano ao DNA contribuindo para o desenvolvimento e progressão de inúmeras doenças (Fraunberger *et al.*, 2016; Pope *et al.*, 2016).

A inatividade física é um dos principais problemas de saúde pública do século 21, sendo estimado que 3,2 milhões de mortes por ano estejam associadas aos efeitos decorrentes do estilo de vida sedentário (Blair, 2009). Sendo esta condição considerada um fator de risco modificável e passível de gerenciamento (WHO, 2010a; Kohl *et al.*, 2012). A prática de exercício físico está associada a redução da incidência de diversas doenças, melhora na qualidade de vida e benefícios à saúde (Finucane *et al.*, 2011; Lauzé *et al.*, 2016; Stubbs *et al.*, 2016). A realização do exercício induz formação de ERO que atuam como mediadores da sinalização fisiológica e adaptação celular, regulação da defesa antioxidante e reparo de dano oxidativo (Giles e Koehle, 2014; Lovinsky-Desir *et al.*, 2016; Matt *et al.*, 2016).

No entanto, durante o exercício ocorre o aumento da taxa ventilatória e broncodilatação tornando o volume de ar inalado maior do que em situações de repouso, sendo assim, a realização de exercício em ambientes poluídos tem como consequência uma maior inalação de poluentes. Estudos mostram que após a realização de exercício em ambientes abertos há o aumento de 4,5 vezes da fração depositada de poluentes no sistema respiratório, os quais atingem a região alveolar (Daigle *et al.*, 2003; Rundell, 2012; Lovinsky-Desir *et al.*, 2016; Wang, 2016; Amato-Lourenco *et al.*, 2017). Contudo, outros estudos observaram que o exercício reduz o impacto imediato das altas concentrações de poluentes sobre as vias respiratórias (Giles e Koehle, 2014; Matt *et al.*, 2016; Wang, 2016). Portanto, mesmo sendo realizado em ambientes poluídos a prática de exercício poderia ser capaz de causar benefícios, estes muitas vezes sobrepondo-se aos malefícios induzidos pela exposição excessiva aos poluentes decorrentes da realização do exercício nestes ambientes (Giles & Koehle, 2014; Matt *et al.*, 2016; Wang, 2016).

O interesse sobre o tópico ‘poluição e exercício’ está crescendo, segundo uma análise bibliométrica de Andrade e colaboradores (2017) o tema poluição *indoor* e exercício é considerado inovador e os autores evidenciam a ausência de estudos investigando esse assunto (Andrade *et al.*, 2017). Contribuindo para este dado, Andrade e Dominski (2018) avaliaram 1.281 estudos sobre poluição e exercício e, destes, apenas sete investigavam os efeitos da poluição *indoor* e exercício na saúde humana (Andrade & Dominski, 2018). Além disso, uma metanálise de An e colaboradores (2017) sugeriu que a poluição atmosférica desestimula a prática de atividade física *outdoor* e destacou que estes estudos são focados predominantemente nos Estados Unidos (An *et al.*, 2017).

2. Justificativa

Tendo em vista as elevadas e crescentes concentrações de poluentes, as quais a população está constantemente exposta, e os conhecidos malefícios causados pela inalação destes compostos, a realização de exercício em ambientes poluídos tornou-se um tópico divergente. A grande questão é se a realização de exercício em ambientes *outdoor* e *indoor* é capaz de causar efeitos benéficos que se sobrepõem aos danos causados pela poluição e pelo sedentarismo. Os estudos abordando esse tema obtêm resultados controversos e, de acordo com nosso conhecimento, até o momento não foi realizada uma investigação para analisar se há diferença entre os efeitos da poluição sobre indivíduos que realizam exercício em ambiente *outdoor* ou *indoor* e em indivíduos que permanecem sedentários. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos à saúde causados pela exposição à poluição atmosférica durante a realização de exercício em ambientes *outdoor* e *indoor*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* durante a realização de exercício físico sobre a saúde de adultos saudáveis.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterização dos indivíduos através de questionário sócio-demográfico;
- Investigar sinais e sintomas respiratórios através do questionário *British Medical Research Council*;
- Avaliar consumo de álcool através do questionário Teste de Identificação de Desordens Devido ao Uso de Álcool;
- Verificar histórico de saúde através da realização de anamnese;
- Realizar avaliação nutricional através da avaliação antropométrica e consumo alimentar;
- Determinar o nível de atividade física através do Questionário Internacional de Atividade Física;
- Avaliar medidas hemodinâmicas através da aferição de pressão arterial e frequência cardíaca;
- Avaliar parâmetros bioquímicos plasmáticos: níveis de cotinina, níveis de glicemia e perfil lipídico, marcadores de estresse oxidativo, atividade pró-inflamatória e toxicidade pulmonar;
- Avaliação de bioindicadores através da determinação de metais pesados e metalóides em unhas e avaliação de genotoxicidade através do ensaio do micronúcleo em células de mucosa bucal;
- Avaliações atmosféricas *outdoor* e *indoor* através da concentração dos poluentes NO₂, O₃ e MP (2,5) e monitorar as condições meteorológicas;

4. Material e Métodos

4.1 Delineamento do estudo

Este trabalho consiste em um estudo prospectivo, analítico, controlado do tipo transversal.

4.2 Amostra

Para a realização deste estudo serão selecionados 150 voluntários para compor três grupos de investigação, o grupo que pratica exercício em ambiente *outdoor*, o grupo que pratica exercício em ambiente *indoor* e o grupo sedentário. O grupo de exercício em ambiente *outdoor* será composto por 50 indivíduos, os quais realizem ciclismo em circuito de rua, de quatro a cinco vezes por semana, totalizando o mínimo de 150 minutos de exercício por semana. O grupo exercício em ambiente *indoor* será formado por 50 indivíduos que frequentem locais fechados destinados a prática de exercício físico, como ginásios e academias, e realizem atividade de ciclismo de quatro a cinco vezes por semana, totalizando o mínimo de 150 minutos de exercício por semana. O grupo controle será formado por 50 indivíduos que apresentem um

estilo de vida sedentário e desempenham atividade em área administrativa, na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. O processo de amostragem de todos os grupos será por conveniência.

Serão incluídos no estudo indivíduos de 18-45 anos, do sexo masculino, hígidos, residindo na cidade de Porto Alegre, que realizem exercício físico durante 150 minutos/semana por no mínimo 6 meses, para o grupo de exercício *outdoor/indoor*, ou estejam sedentários por no mínimo 6 meses, para o grupo controle. Serão excluídos do estudo indivíduos fumantes, que apresentem hábito de consumo de bebida alcoólica, que façam uso crônico de medicamentos e/ou suplementos dietéticos, apresentarem qualquer comorbidade e/ou tiverem internação hospitalar nos últimos 6 meses.

As coletas do grupo exercício *outdoor*, exercício *indoor* e do grupo controle serão realizadas a domicílio. Os profissionais habilitados irão se locomover até a residência de cada participante para a realização da coleta de sangue, aplicação de questionários, avaliação nutricional, aferição de variáveis hemodinâmicas e função pulmonar, levando consigo todos os equipamentos e materiais necessários. O armazenamento de materiais biológicos será realizado no Laboratório de Poluição Atmosférica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA).

4.3 Questionários

Todos os participantes que aceitarem participar do presente estudo irão responder aos questionários no dia da coleta. Serão aplicados os questionários de perfil sócio demográfico (Anexo I), de sintomas respiratórios – *British Medical Research Council* - versão adaptada em português (Ramos, 1983) (Anexo II) e de consumo de álcool - AUDIT – Teste de Identificação de Distúrbios Devido ao Uso de Álcool (Anexo III). A aplicação dos questionários será realizada por profissional da área da saúde habilitado (CRN2-12349).

4.4 Anamnese

A aplicação da anamnese será realizada visando a verificação do histórico de saúde dos participantes, a qual será realizada por profissional da área da saúde habilitado (CRN2-12349) (Barros, 2004).

4.5 Avaliação Nutricional

4.5.1 Avaliação antropométrica e de consumo alimentar

Na avaliação antropométrica será realizada a aferição de peso (kg) e altura (cm) com auxílio de balança digital e estadiômetro, respectivamente. O participante estará descalço, com o mínimo de acessórios possíveis e roupas leves. A determinação do Índice de Massa Corporal (IMC) corresponderá a razão entre o peso e a altura ao quadrado, sendo seu resultado expresso em kg/m² e classificados segundo a OMS (1995). A determinação da circunferência da cintura, será realizada utilizando uma fita antropométrica e classificada de acordo com OMS (1998) (Norgan, 1988; OMS, 1998). A avaliação do consumo alimentar será realizada através da aplicação de recordatório alimentar - 24h (Burke, 1947) e a avaliação da qualidade da dieta será determinada pela aplicação do Índice de Alimentação Saudável, adaptação para a população brasileira do Healthy Eating Index (Prevato *et al.*, 2014). A avaliação nutricional será realizada por profissional da área da nutrição habilitado (CRN2-12349).

4.6 Nível de atividade física

A avaliação do nível de atividade física será realizada através da aplicação do Questionário Internacional de Atividade Física (IQPA- versão resumida) (Anexo IV) para todos os indivíduos que participarão da pesquisa.

4.7 Variáveis hemodinâmicas

A aferição da pressão arterial e frequência cardíaca serão realizadas com a utilização de um aparelho automático (Aparelho de Pressão Digital Automático de Braço G-Tech LA250). Para a aferição os participantes da pesquisa serão colocados sentados, permanecerão em repouso por 5 minutos prévios a aferição, o braço será posicionado na altura do coração (nível do ponto médio

do esterno ou 4º espaço intercostal), apoiado, com a palma da mão voltada para cima e o cotovelo ligeiramente fletido. As aferições de pressão arterial e frequência cardíaca serão realizadas por profissional da saúde capacitado (CRBM-5 1195).

4.8 Função pulmonar

A avaliação da função pulmonar será realizada utilizando o espirômetro Collins DSII, com calibração verificada diariamente. O participante estará em repouso 10 minutos antes do exame, será orientado a sentar, respirar em um bocal conectado ao espirômetro, durante o exame respirar enchendo os pulmões de ar e soprando em seguida, garantindo que o sopro seja com força e de forma rápida. Manobras de capacidade vital lenta (CV), capacidade vital forçada (CVF), o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), e suas relações (VEF1/CV e VEF1/CVF) serão obtidas segundo os critérios propostos pelas mais recentes *guidelines* da *European Respiratory Society* e a *American Thoracic Society* (Quanjer *et al.*, 2012; Redlich *et al.*, 2014). A realização da espirometria e a emissão do resultado serão realizadas por profissional da área da saúde habilitado (CRBIO-03 28715-0).

4.9 Análises séricas

A coleta de amostra de sangue será em veia do membro superior com o auxílio de uma seringa, agulha e torniquete e será realizada por profissional da área da saúde habilitado (CRBM-5 1195). O paciente estará em jejum de 12h para a coleta de sangue, sendo posteriormente oferecido um lanche. A cada etapa realizada será explicado ao paciente à qual procedimento ele será submetido. Previamente a coleta os tubos de coleta serão identificados. A anti-sepsia do local da coleta será realizada com álcool 70%. Será realizada coleta de 5mL de sangue, após a coleta o participante será orientado a pressionar um algodão a parte puncionada mantendo o braço estendido. A amostra coletada será alocada em tubo contendo anticoagulante, PMSF, anti-tripsina, pepstatina, leupeptina e aprotinina devidamente identificado e será invertida suavemente de 5-10 vezes (CLSI, 2003). A amostra será centrifugada a 3000 rpm, por 10 minutos a 4º C, então o plasma será separado e armazenado em freezer a -22°C para posteriores análises.

4.9.1 Exposição ao fumo

A exposição ao fumo será realizada através da determinação de cotinina, a qual será realizada no plasma através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O procedimento analítico envolve extração líquido-líquido, separação em coluna de fase reversa sob fluxo isocrático e detecção por ultravioleta (Watts *et al.*, 1990). Esta análise será realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica.

4.9.2 Glicemia e perfil lipídico

A determinação dos níveis de glicose e perfil lipídico serão realizadas em plasma através do método enzimático colorimétrico utilizando os reagentes: glicose monoreagente K082 (Bioclin®), colesterol monoreagente K083 (Bioclin®), HDL direto – K071 (Bioclin®), LDL direto – K088 (Bioclin®) e triglicerídeos monoreagente (Bioclin®). As análises de glicemia e perfil lipídico serão realizadas no Laboratório de Análises Clínicas na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

4.9.3 Estresse Oxidativo

Todas as análises de estresse oxidativo serão realizadas no Laboratório de Poluição Atmosférica.

4.9.3.1 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas no plasma será determinada pelo método de Bradford por espectrofotometria utilizando-se albumina sérica bovina como padrão (Schleicher e Wieland, 1978).

4.9.3.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD será determinada em plasma com comprimento de onda de 420 nm. Esta reação consiste na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da SOD (Marklund e Marklund, 1974). Suas absorbâncias serão determinadas no espectrofotômetro Lambda 35 (Perkin-Elmer do Brasil, SP, Brasil), a 420 nm em 60 e 120s. Os resultados são expressos em unidades de SOD/mg de proteínas totais.

4.9.3.3 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT será determinada em amostras de plasma de acordo com Aebi (1984) (Aebi, 1984). Será verificada a decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT a 25°C durante 120 segundos. A absorbância das amostras será determinada a 240 nm em espectrofotômetro Lambda 35 (Perkin-Elmer do Brasil, SP, Brasil). Os resultados serão expressos em pmol/mg de proteínas totais.

4.9.3.4 Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx será avaliada utilizando-se hidroperóxido de terc-butil como substrato em amostras de plasma. O desaparecimento do NADPH será avaliado a 340nm utilizando-se um espectrofotômetro Lambda 35 (Perkin-Elmer do Brasil, SP, Brasil) (Flohé, 1984). A atividade da GPx é caracterizada como unidade/mg de proteína.

4.9.3.5 Concentração de malondialdeído (MDA)

A determinação da lipoperoxidação será realizada em plasma através da técnica de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de Esterbauer e Cheeseman (1990), a qual se baseia no princípio de que o MDA forma complexos ácidos de coloração rósea com o ácido tiobarbitúrico, a absorbância das amostras será determinada a 535 nm em espectrofotômetro Lambda 35 (Perkin-Elmer do Brasil, SP, Brasil) (Esterbauer e Cheeseman, 1990). A concentração de MDA será expressa em nmol por mg de proteínas totais.

4.9.3.6 Determinação da capacidade antioxidante total

A determinação da capacidade antioxidante total será realizada em plasma através da mensuração da habilidade dos antioxidantes presentes na amostra inibirem os efeitos oxidantes das espécies reativas de oxigênio formadas durante a reação. Esta alteração pode ser detectada em espectrofotômetro sendo a absorbância das amostras determinada a 593nm (Benzie e Strain, 1999).

4.9.4 Perfil Inflamatório

A avaliação do perfil inflamatório será realizada através da concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) em plasma. Os marcadores serão avaliados pela Técnica Multiplex com o uso dos kits Milliplex™ MAP cytokine kits (RCYTO'80K) (Millipore 'Billerica, MA, USA). As análises serão realizadas conforme as recomendações do fabricante. Os valores serão apresentados em pg/ml. A análise de perfil inflamatório será realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica.

4.9.5 Marcador de toxicidade pulmonar – CC16

A determinação da proteína de células de claras 16 kDa (CC16) sérica será realizada em plasma através da utilização do kit de ELISA “Human Clara Cell Protein” da BioVendor (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Brno, Czech Republic). As amostras passarão por processos de lavagem, serão incubadas com anticorpos marcados com biotina contra CC16 e então irão reagir com H₂O₂-tetrametilbenzidina. A leitura da absorbância das amostras será realizada em espectrofotômetro (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil), sendo a absorbância proporcional a concentração de CC16 (Gomes et al., 2011). Esta análise será realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica.

4.10 Bioindicadores

4.10.1 Determinação de Metais

A determinação de metais será realizada em amostras de unha. A coleta da amostra de unha será proveniente da mão do indivíduo, será realizada com auxílio de material descartável e será armazenada em invólucro de plástico, livre de metais, devidamente identificado. O protocolo de concentrações de metais é descrito por Carneiro (2011) (Carneiro et al., 2011). Resumidamente, as amostras serão lavadas, secas e digeridas, seguidas por análise por ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) (Perkin Elmer, Waltham, USA) no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande.

4.10.2 Ensaio de Micronúcleo

O ensaio de micronúcleo (MN) será realizado em células da mucosa bucal, as quais serão obtidas com uma leve escovação do interior da mucosa bucal com uma mini escova citológica (cytobrush), posterior a enxágue bucal intenso com água. Os participantes serão instruídos sobre o procedimento, primeiramente realizarão enxágue bucal com água e, então, será seguida a coleta de células da mucosa bucal. Estas serão armazenadas em um microtubo contendo fixador. As células serão suspensas e alocadas em lâminas, serão fixadas, hidrolisadas e coradas segundo o método de Feulgen. A presença de MN será avaliada microscopicamente através da análise de 1000 células, seguido critérios de avaliação de Holland e colaboradores (Holland *et al.*, 2008). A análise de micronúcleo será realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica.

4.11 Análises ambientais

4.11.1 Concentração de NO₂, O₃ e Material Particulado 2,5

A determinação da concentração de NO₂ e O₃ será realizada por monitoramento passivo utilizando filtros de celulose (37mm, Energética, Rio de Janeiro, Brasil). Para a determinação de NO₂, os filtros serão impregnados com uma solução absorvente de trietanolamina (2mL) e secos na temperatura de 37°C por 24 horas, serão inseridos em tubos de difusão abertos e permanecerão nos locais onde os participantes realizam exercício e no local de trabalho do grupo controle durante um período de 7-14 dias, sendo que as medidas serão repetidas em cada estação do ano (Lodge, 1988). Para a concentração de O₃, os filtros serão impregnados com solução de disulfato de indigotina (400 µL) inseridos nos tubos de difusão abertos e permanecerão nos locais onde os participantes realizam exercício e no local de trabalho do grupo controle por um período de 8-24h, sendo que as medidas serão repetidas em cada estação do ano (Micieta et al., 1996). Em ambas as técnicas, o filtro branco será exposto nas mesmas condições, mas selado de contato atmosférico e as amostras serão analisadas com uso de espectrofotômetro (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil). A concentração de MP_{2,5} será realizada por amostragem ativa, realizando o monitoramento ambiental por 24h, em cada estação do ano, com a utilização do aparelho AirChek XR5000 (com faixa de vazão de 5 a 5000 mL/min-1 e controle digital de fluxo) (Soo et al., 2014).

4.11.2 Meteorologia

Será realizado o monitoramento das condições meteorológicas durante o período de amostragem dos poluentes atmosféricos através dos dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), através do site: www.inmet.gov.br.

4.12 Estatística

Delineamos um estudo composto por 150 participantes divididos nos três grupos de estudo, a partir de dados de estudos avaliando os efeitos da poluição *outdoor* e *indoor* realizados com indivíduos saudáveis, devido à insuficiência de dados de literatura capazes de basear com segurança um cálculo amostral (Lovinsky-Desir et al., 2016; Matt *et al.*, 2016; Day *et al.*, 2017). Após análise preliminar restabeleceremos o tamanho amostral necessário para configuração de poder das diferenças detectadas.

Será aplicado o teste para a verificação da normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que apresentarem distribuição normal serão descritas como média $\pm$ desvio padrão, e quando apresentarem distribuições assimétricas serão descritas como mediana e intervalo interquartil (25-75). Para as variáveis com distribuição normal será utilizado o teste de análise

de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo post-hoc de Student-Newman-Keuls, para comparação entre os grupos. Para as variáveis assimétricas será realizado teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo post-hoc de Dunn's. As análises estatísticas serão realizadas no software SigmaPlot 12.0. e os gráficos elaborados no GraphPad Prism 6.0. O nível de significância adotado será de 95% ($p < 0.05$).

4.13 Considerações Éticas

Este projeto será submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA, a fim de que seja autorizado seu desenvolvimento. O recrutamento dos participantes será por forma verbal através de uma busca ativa em visitas presenciais nos seguintes locais: recrutamento do grupo *outdoor* será no ponto de encontro dos participantes para realizarem a atividade física, o qual é um local público; recrutamento do grupo *indoor* será nas academias onde realizam sua atividade física e o recrutamento do grupo controle será no local de trabalho dos participantes. Todos os participantes irão autorizar sua inclusão na pesquisa ao aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO V). Previamente a realização da pesquisa, a chefia administrativa do grupo controle, os coordenadores dos laboratórios onde será realizada a pesquisa, e responsáveis pelos locais de recrutamento irão fornecer uma autorização formal por meio do Termo de Anuência (ANEXO VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII).

5. Cronograma

Semestre/Ano Atividade	01/18	02/18	01/19	02/19	01/20	02/20	01/21	02/21
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X
Submissão ao CEP	X							
Seleção amostral e aplicação de questionários, colheita de materiais biológicos, monitoramento de poluentes atmosféricos e das condições meteorológicas e Análises de NO ₂ e O ₃		X	X	X				
Análises bioquímicas e de bioindicadores			X	X	X	X		
Compilação de dados e confecção do banco de dados					X	X	X	X
Análise Estatística							X	X
Elaboração da Tese							X	X

6. Orçamento

Material	Quantidade	Custo
Itens disponíveis		
Análises de Estresse Oxidativo		
Cloreto de Sódio SYNTH®	100 ml	R\$ 13,82
Ácido Ortofosfórico Avantor®	1.000 ml	R\$ 213,18
Commassie Brilliant Blue G250 BioRad®	10 g	R\$ 145,00
Albumina Bovina Sérica MpBio®	10 g	R\$ 330,00
Pirgalol Sigma®	25 g	R\$ 235,00
Catalase Sigma®	100 mg	R\$ 436,00
Fosfato de potássio monobásico Avantor®	1.000 g	R\$ 270,00
Fosfato de sódio dibásico Avantor®	1.000 g	R\$ 270,00
Peróxido de hidrogênio 30% SYNTH®	1000 ml	R\$ 20,64
SOD S2515 Sigma®	1 Unidade	R\$ 370,00
Tris (hidroximetil) aminometano SYNTH®	100 g	R\$ 50,00

Ácido tricloroacético Dinâmica®	1.000 ml	R\$ 80,00
Ácido tiobarbitúrico Merck®	25 g	R\$ 591,00
1,1,3,3-tetrametoxipropano Sigma®	500 ml	R\$ 700,00
Butanol Vetec®	1.000 ml	R\$ 39,00
Acetato de sódio trihidratado SYNTH®	1.000 g	R\$ 22,70
Ácido acético Avantor®	1.000 ml	R\$ 83,00
2-4-6-tripiridil-s-triazina Sigma®	1 g	R\$ 486,00
Ácido clorídrico Quemis®	1.000 ml	R\$ 22,00
Cloreto férrico hexahidratado Merck®	250 g	R\$ 40,00
Ácido ascórbico Alphatec®	250 g	R\$ 18,00
Solução calibradora de bilirrubina Bioclin®	0,30 mg	R\$ 224,00
Trolox	500 mg	R\$ 90,00
Micronúcleo		
Fucsina básica	1 Unidade	R\$ 36,63
Metabissulfito de sódio SYNTH®	500 g	R\$ 20,26
Fast Green	1 Unidade	R\$ 411,00
Endobrush escova citologica estéril	2 pacotes (100 unidades/pct)	R\$ 100,00
Álcool etílico Nacional®	10.000 ml	R\$ 320,00
Ácido acético Avantor®	1.000 ml	R\$ 83,00
Ácido clorídrico Nacional®	1.000 ml	R\$ 90,00
Amostragem passiva de NO₂ e O₃		
Trietanolamina SYNTH®	1000 ml	R\$ 64,55
Guaiacol Alphatec®	100 ml	R\$ 82,25
Metabissulfito de sódio SYNTH®	500 g	R\$ 20,26
Peróxido de hidrogênio 30% SYNTH®	1000 ml	R\$ 20,64
Sulfanilamida Avantor®	100 g	R\$ 600,00
8-anilina-1-naftaleno ácido sulfônico Dinâmica® (ANSA)	25 g	R\$ 347,00
Nitrito de Sódio Quimisul®	1000 g	R\$ 34,00
Álcool metílico Nacional®	10.000 ml	R\$ 320,00
Filtros de celulose 37mm Whatmann®	400 unidades	R\$ 400,00
Indigo carmin Alphatec®	25 g	R\$ 60,00
Etilenoglicol SYNTH®	5.000 ml	R\$ 130,00
Acetona PhLab®	1.000ml	R\$ 30,00
Materiais permanentes		
AirChek XR5000	1 Unidade	R\$ 5.500,00
Espectrofotômetro Perkin-Elmer® Lambda 35	1 Unidade	R\$ 4.000,00
Microscópio Olympus® BX51	1 Unidade	R\$ 4.000,00
Centrífuga Excelsa® 4 Mod 280R	1 Unidade	R\$ 2.000,00
Sonicador Ultra Cleaner Unique®	1 Unidade	R\$ 749,00
Estufa Fanem®	1 Unidade	R\$ 1.180,00
Aparelho de Análises Bioquímica Mindray BS - 120®	1 Unidade	R\$ 36.000,00
ICP Mass Spectrometry (ICP-MS) Perkin-Elmer®	1 Unidade	R\$ 140.000,00
Itens a serem adquiridos*		
Kit de Material para Avaliação Antropométrica	1 Balança digital 1 Estadiômetro 1 Fita antropométrica 1 Adipômetro	R\$ 911,40
Aparelho de Pressão Digital Automático de Braço G-Tech® LA250	1 Unidade	R\$ 89,90
Bocal descartável p/ Espirômetro de mesa Schiller® Spirovit SP-1	2 Pacotes – 200 unid.	R\$ 110,00
Kit Cotinina (HPLC)	Coluna, membrana e reagentes –	R\$ 3.142,00

	200 análises	
Glicose monoreagente K082 -Bioclin®	1 Kit – 196 análises	R\$ 78,00
Colesterol monoreagente K083 - Bioclin®	1 Kit - 196 análises	R\$ 100,00
HDL direto – K071 - Bioclin®	1 Kit - 196 análises	R\$ 260,00
LDL direto – K088 -Bioclin®	1 Kit - 196 análises	R\$ 320,00
Triglicerídeos monoreagente Bioclin®	1 Kit - 196 análises	R\$ 136,00
Kit ELISA “Human Clara Cell Protein” (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Brno, Czech Republic)	1 Kit - 196 análises	R\$ 3.479,00
Kit ELISA – IL-6	2 Kits – 192 análises	R\$ 5.000,00
Kit ELISA – TNF- α	2 Kits – 192 análises	R\$ 5.500,00
Kit Glutathiona	1 Kit – 700 análises	R\$ 2.431,00
Tubos para coleta de sangue 6ml / Tam: 13x100mm / Tampa Roxa BD Vacutainer®	200 unidades	R\$ 160,00
PMSF Sigma-Aldrich®	25g	R\$ 1.125,00
Anti-tripsina Sigma-Aldrich®	5g	R\$ 741,00
Pespatina Sigma-Aldrich®	10mg	R\$ 843,00
Leupeptina Sigma-Aldrich®	5mg	R\$ 347,00
Aprotinina Sigma-Aldrich®	10mg	R\$ 509,00
Seringa descartável 5ml - Descarpack - Bico Luer Slip	2 Caixas (200 unidades)	R\$ 60,00
Lanche	Kit – 150 unidades	R\$ 1.200,00
Valor total geral		R\$ 224.325,23
Valor itens a serem adquiridos		R\$ 26.542,30

* os itens que não estão disponíveis serão adquiridos com recurso do próprio pesquisador.

Referências

AEBI, H. CATALASE INVITRO. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984AAB8100014 >.

AGUILERA, I. et al. Particulate Matter and Subclinical Atherosclerosis: Associations between Different Particle Sizes and Sources with Carotid Intima-Media Thickness in the SAPALDIA Study. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 11, p. 1700-1706, Nov 2016. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27258721> >.

AMATO-LOURENCO, L. F. et al. Biomonitoring of genotoxic effects and elemental accumulation derived from air pollution in community urban gardens. **Sci Total Environ**, v. 575, p. 1438-1444, Jan 2017. ISSN 1879-1026. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27720253> >.

AN, R. et al. Impact of ambient air pollution on physical activity among adults: A systematic review and meta-analysis. **Perspect Public Health**, p. 1757913917726567, Aug 2017. ISSN 1757-9147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28829249> >.

ANDRADE, A.; DOMINSKI, F. H. Indoor air quality of environments used for physical exercise and sports practice: Systematic review. **J Environ Manage**, v. 206, p. 577-586, Jan 2018. ISSN 1095-8630. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29127930> >.

ANDRADE, A.; DOMINSKI, F. H.; COIMBRA, D. R. Scientific production on indoor air quality of environments used for physical exercise and sports practice: Bibliometric analysis. **J Environ Manage**, v. 196, p. 188-200, Jul 2017. ISSN 1095-8630. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28284941> >.

BARROS, I. D. C. **Examinando pacientes - A ANAMNESE** 2004.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymol**, v. 299, p. 15-27, 1999. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916193> >.

BLAIR, S. N. Physical inactivity: the biggest public health problem of the 21st century. **Br J Sports Med**, v. 43, n. 1, p. 1-2, Jan 2009. ISSN 1473-0480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136507> >.

BURKE, B. S. The dietary history as a tool in research. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 23, p. 1041-1046, 1947.

BURNETT, R. T. et al. An integrated risk function for estimating the global burden of disease attributable to ambient fine particulate matter exposure. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 4, p. 397-403, Apr 2014. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518036> >.

CARNEIRO, M. F. H. et al. Pollen abortion rates, nitrogen dioxide by passive diffusive tubes and bioaccumulation in tree barks are effective in the characterization of air pollution. . **Environmental and Experimental Botany**, v. 75, n. 2, p. 272-277, 2011.

CHALLONER, A.; PILLA, F.; GILL, L. Prediction of Indoor Air Exposure from Outdoor Air Quality Using an Artificial Neural Network Model for Inner City Commercial Buildings. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 12, p. 15233-53, Dec 2015. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633448> >.

CHECA VIZCAÍNO, M. A.; GONZÁLEZ-COMADRAN, M.; JACQUEMIN, B. Outdoor air pollution and human infertility: a systematic review. **Fertil Steril**, v. 106, n. 4, p. 897-904.e1, Sep 2016. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27513553> >.

DAIGLE, C. C. et al. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. **Inhal Toxicol**, v. 15, n. 6, p. 539-52, May 2003. ISSN 0895-8378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692730> >.

DAY, D. B. et al. Association of Ozone Exposure With Cardiorespiratory Pathophysiologic Mechanisms in Healthy Adults. **JAMA Intern Med**, v. 177, n. 9, p. 1344-1353, Sep 2017. ISSN 2168-6114. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28715576> >.

DETRAN. **Frota de Veículos**. DETRAN, D. N. D. T.-. BRASIL: Ministério das Cidades 2017.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-21, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233308> >.

FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-567, Feb 12 2011. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287556700026 >.

FLOHÉ, L., WA. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRAUNBERGER, E. A. et al. Redox Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 4729192, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26640614> >.

GILES, L. V.; KOEHLE, M. S. The health effects of exercising in air pollution. **Sports Med**, v. 44, n. 2, p. 223-49, Feb 2014. ISSN 1179-2035. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24174304> >.

GOMES, E. C.; STONE, V.; FLORIDA-JAMES, G. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2089-97, Sep 2011. ISSN 1439-6327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21267745> >.

HARRISON, G. et al. Skinfold thicknesses. In: LOHMAN TG, R. A., MARTORELL e R (Ed.). **Anthropometric Standardization Reference Manual**.: Champaign: Human Kinetics, 1988. p.55-70.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMAN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res**, v. 659, n. 1-2, p. 93-108, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514568> >.

KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environ Pollut**, v. 151, n. 2, p. 362-7, Jan 2008. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646040> >.

KOHL, H. W. et al. The pandemic of physical inactivity: global action for public health. **Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 294-305, Jul 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22818941> >.

LAUZÉ, M.; DANEAL, J. F.; DUVAL, C. The Effects of Physical Activity in Parkinson's Disease: A Review. **J Parkinsons Dis**, v. 6, n. 4, p. 685-698, Oct 2016. ISSN 1877-718X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27567884> >.

LELIEVELD, J. et al. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. **Nature**, v. 525, n. 7569, p. 367-71, Sep 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381985> >.

LODGE, J. P. A. Methods of Air Sampling and Analysis. **Lewis Publisher Inc. Chelsea, MI, USA**, 1988.

LOVINSKY-DESIR, S. et al. Physical activity, black carbon exposure and airway inflammation in an urban adolescent cohort. **Environ Res**, v. 151, p. 756-762, Nov 2016. ISSN 0013-9351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27694044> >.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 1974. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654> >.

MATT, F. et al. Acute respiratory response to traffic-related air pollution during physical activity performance. **Environ Int**, v. 97, p. 45-55, Oct 2016. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27776225> >.

MICIETA; K.; MURÍN, G. Microsporeanalysis for genotoxicity of a polluted environment. **Environ. Exp. Bot**, v. 36 n. 1, p. 21-27 1996.

MRAIHIA, R.; R., H.; MRAIHIC, T. Urban air pollution and urban daily mobility in large Tunisia's cities. **Renew Sust Energ Rev**, v. 43, p. 315-330, 2015.

NORGAN, N. G. A Review of: "Anthropometric Standardization Reference Manual". Edited by T. G. LOHMAN, A. F. ROCHE and R. MARTORELL. (Champaign, IL.: Human Kinetics Books, 1988.) **Ergonomics**, v. 31, n. 10, p. 1493-1494, 1988. ISSN 0014-0139. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/00140138808966796> >.

POPE, C. A. et al. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated with Endothelial Injury and Systemic Inflammation. **Circ Res**, Oct 2016. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27780829> >.

PREVIATO, H. D. R. D. A.; VOLP, A. C. P.; FREITAS, R. N. Evaluation of diet quality by the Healthy Eating Index and its variations: a bibliographical review. **Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria**, v. 34, n. 2, p. 88-96, 2014.

PRÜSS-ÜSTUN, A. et al. **Preventing disease through healthy environments. A global assessment of the burden of disease from environmental risks**. Geneva: World Health Organization 2016.

QUANJER, P. H. et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. **Eur Respir J**, v. 40, n. 6, p. 1324-43, Dec 2012. ISSN 1399-3003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743675> >.

RAMOS, M. D. C. Sintomas respiratórios na população da cidade de Ribeirão Preto, SP (Brasil). Resultados da aplicação de um questionário padronizado. **Rev. Saúde Públ.**, v. 17, p. 41-52, 1983.

REDLICH, C. A. et al. Official American Thoracic Society technical standards: spirometry in the occupational setting. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 189, n. 8, p. 983-93, Apr 2014. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735032> >.

RUNDELL, K. W. Effect of air pollution on athlete health and performance. **Br J Sports Med**, v. 46, n. 6, p. 407-12, May 2012. ISSN 1473-0480. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267572> >.

SCHLEICHER, E.; WIELAND, O. H. Evaluation of bradford method for protein determination in body-fluids. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 16, n. 9, p. 533-534, 1978 1978. ISSN 0340-076X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978FR34200009 >.

SOO, J. C. et al. Evaluation of pump pulsation in respirable size-selective sampling: Part III. Investigation of Europe

an standard methods. **Ann Occup Hyg**, v. 58, n. 8, p. 1006-17, Oct 2014. ISSN 1475-3162. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25053700> >.

STUBBS, B. et al. Physical activity and anxiety: A perspective from the World Health Survey. **J Affect Disord**, Oct 2016. ISSN 1573-2517. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802893> >.

TOLEDO, M.; NARDOCCI, C. Poluição veicular e saúde da população: uma revisão sobre o município de São Paulo (SP), Brasil. **Rev. bras. epidemiol** v. 14, n. 3, p. 445-454, 2011.

WANG, Z. Air Pollution and Exercise: A Perspective From China. **Res Q Exerc Sport**, v. 87, n. 3, p. 242-4, Sep 2016. ISSN 2168-3824. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27462823> >.

WATTS, R. R. et al. Cotinine analytical workshop report: consideration of analytical methods for determining cotinine in human body fluids as a measure of passive exposure to tobacco smoke. **Environ Health Perspect**, v. 84, p. 173-82, Mar 1990. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2190812> >.

WHO. **Global recommendations on physical activity for health**. Genebra: World Health Organization (WHO) 2010a.

WHO. **Guidelines for indoor air quality: selected pollutants.** WHO EUROPEAN CENTRE FOR ENVIRONMENT AND HEALTH: World Health Organization 2010b.

WHO. An estimated 12.6 million deaths each year are attributable to unhealthy environments. Geneva, 2016. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/deaths-attributable-to-unhealthy-environments/en/> >.

Anexos

ANEXO I

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE

Questionário Sóciodemográfico

Identificação _____

Nome: _____

Idade: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Raça: _____

Estado Civil: _____

Endereço: _____ Cidade: _____

Tempo de residência: ____

Profissão: _____ Tempo de profissão: _____

Renda: _____

Escolaridade: () 1º Grau incompleto () 1º Grau completo

() 2º Grau incompleto () 2º Grau completo

() Graduação () Pós-Graduação

Atividade física: () Sim () Não Qual? _____ Frequência: _____

Meio de transporte utilizado para locomoção: _____

ANEXO II

British Medical Research Council - Questionário Sinais e Sintomas Respiratórios

1. Identificação

Nome:

Telefone:

Endereço:

2. Sinais e sintomas respiratórios

2.3. Costuma tossir por um período de 3 meses ao ano?

() Sim () Não

2.4. Costuma expectorar (catarro) por um período de 3 meses ao ano?

() Sim () Não

2.5. De 1 ano para cá, tem tido chiado no peito?

() Sim () Não

2.6. Costuma tossir logo ao acordar pela manhã?

() Sim () Não

2.7. Costuma tossir durante o dia ou noite?

() Sim () Não

2.8. Há quanto tempo vem tendo essa tosse?_____

2.9. Costuma expectorar (catarro) ao acordar e a expectoração (catarro) vem do peito?

() Sim () Não

2.10. Costuma expectorar (catarro) durante o dia ou noite?

() Sim () Não

2.11. Há quanto tempo vem tendo essa expectoração?_____

2.12. Sente falta de ar?

() Sim () Não

2.13. Tem crises de falta de ar?

() Sim () Não

2.14. Costuma ter falta de ar nos intervalos das crises?

☐ Sim ☐ Não

2.15. Sente falta de ar quando está andando no plano?

☐ Sim ☐ Não

2.16. Já sentiu falta de ar enquanto subia alguma ladeira?

☐ Sim ☐ Não

2.17. Costuma ter chiado no peito?

☐ Sim ☐ Não

2.18. Somente quando está resfriado?

☐ Sim ☐ Não

2.19. Ocasionalmente, mesmo sem estar resfriado?

☐ Sim ☐ Não

2.20. Na maioria dos dias ou das noites?

☐ Sim ☐ Não

2.21. Tem mais crises de falta de ar e chiado em meses frios?

☐ Sim ☐ Não

2.22. Você teve, nos últimos anos, alguma doença respiratória que o obrigou a se afastar do trabalho/estudo por mais de uma semana?

☐ Sim ☐ Não

2.23. Durante a doença, você teve mais catarro do que normalmente apresenta?

☐ Sim ☐ Não

2.24. Qual o diagnóstico dado pelo médico?_____

2.25. Você fuma atualmente?

☐ Sim ☐ Não ☐ Sim, outros

2.26. Quantos cigarros você fuma atualmente?_____

2.27. Já fumou mais de um cigarro por dia por mais de 1 ano?

☐ Sim ☐ Não

2.28. Com que idade começou a fumar?_____

2.29. Com que idade parou de fumar?_____

2.30. Costuma praticar alguma atividade física?

☐ Sim ☐ Não

2.31. Qual a frequência?

☐ 1 vez por semana

☐ 2 ou mais vezes por semana

2.32. Data de nascimento _____

2.33. Sexo

☐ Masculino ☐ Feminino

2.34. Nível de escolaridade

☐ 0-8 anos

☐ 9-11 anos

☐ acima de 12 anos

2.35. Qual a sua formação? _____

2.36. Qual a sua atividade/ocupação? _____

2.37. Em qual região da Grande Porto Alegre você mora?

Cidade: _____

☐ Norte ☐ Sul

☐ Leste ☐ Oeste

☐ Central

2.38. Qual é o tipo de construção de sua residência?

☐ Alvenaria ☐ Madeira ☐ Outros

2.39. Há quanto tempo mora neste mesmo local?

☐ 1 ano ou menos ☐ 2 anos ☐ 3 anos ☐ 4 anos ☐ 5 anos

2.40. Utiliza atualmente em sua residência fogão a lenha, carvão ou madeira?

☐ Sim ☐ Não

2.41. Próximo à sua residência há fábricas, indústrias ou grandes construções que liberam muita fumaça ou poeira?

☐ Sim ☐ Não

2.42. Tempo de frequência na instituição?

☐ 4-8 h

☐ 8-12 h

☐ acima de 12 h

2.43. Há quanto tempo trabalha/estuda nesta instituição?

() 6 meses–1 ano

() 1 ano-2 anos

() 2 anos-4 anos

() 4 anos ou mais

ANEXO III

Questionário AUDIT – Teste de Identificação de Desordens Devido ao Uso de Álcool



AUDIT – Teste de Identificação de Desordens Devido ao Uso de Álcool



Instruções para preenchimento:

a) escolha uma opção para cada pergunta e passe o número dela para a "caixinha" do lado direito; b) veja na figura o que é uma dose; c) após a última questão some os números que colocou nas "caixinhas".

- 1) Com que frequência você toma bebidas alcoólicas?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 2) Nas ocasiões em que bebe, quantas doses você costuma tomar?
0 1 a 2 doses
1 3 ou 4 doses
2 5 ou 6 doses
3 7 a 9 doses
4 10 ou mais doses
- 3) Com que frequência você toma "seis ou mais doses" em uma ocasião?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 4) Com que frequência, durante o último ano, você achou que não seria capaz de controlar a quantidade de bebida depois de começar?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 5) Com que frequência, durante o último ano, você não conseguiu cumprir com algum compromisso por causa da bebida?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 6) Com que frequência, durante o último ano, depois de ter bebido muito, você precisou beber pela manhã para se sentir melhor?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 7) Com que frequência, durante o último ano, você sentiu culpa ou remorso depois de beber?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 8) Com que frequência, durante o último ano, você não conseguiu se lembrar do que aconteceu na noite anterior por causa da bebida?
0 Nunca
1 Uma vez por mês ou menos
2 Duas a quatro vezes por mês
3 Duas a três vezes por semana
4 Quatro ou mais vezes por semana
- 9) Alguma vez na vida você ou alguma outra pessoa já se machucou, se prejudicou por causa de você ter bebido?
0 Não
1 Sim, mas não no último ano
4 Sim, durante o último ano
- 10) Alguma vez na vida algum parente, amigo, médico ou outro profissional da saúde já se preocupou com você por causa de bebida ou lhe disse para parar de beber?
0 Não
1 Sim, mas não no último ano
4 Sim, durante o último ano

Total

ANEXO IV

Questionário internacional de atividade física – Versão resumida

(*International Physical Activity Questionnaire - IPAQ*)

As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gastou fazendo atividade física na última semana. Lembre-se que as atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal e as atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal.

1a. Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Dias: _____ por **SEMANA** () Nenhum

1b. Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

Horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

Dias: _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

Horas: _____ Minutos: _____

3a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

Dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b. Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

Horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____ horas _____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____ horas _____ minutos

ANEXO V

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Grupo Controle e Grupos Expostos)

Prezado,

Este termo é um convite para você participar da pesquisa: “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, desenvolvida por Bruna Marmett, Ramiro Barcos Nunes e Cláudia Ramos Rhoden, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Justificativa e objetivos: A poluição do ar causa efeitos negativos na saúde e o exercício resulta em benefícios, a prática de exercício em ambientes poluídos leva ao aumento de inalação de poluentes, pois o exercício aumenta a frequência de respiração. Sendo assim, é essencial entender se o exercício causa efeitos benéficos quando realizado em ambientes abertos e fechados, e se há diferença entre a prática nesses locais. O objetivo da pesquisa é avaliar os efeitos causados pela exposição à poluição do ar durante a prática de exercício em ambientes abertos e fechados sobre a saúde de adultos saudáveis.

Procedimentos: Você terá que responder os seguintes questionários:

- Sócio-demográfico: fornecendo informações sobre raça, escolaridade, profissão, renda.
- Sintomas respiratórios: fornecendo informações sobre sua respiração.
- Consumo de álcool: referente a quantidade e frequência de consumo de bebida alcoólica.
- Atividade física: avaliar a realização, frequência, intensidade e duração de exercício.
- Histórico de saúde: avaliar histórico de doenças.
- Avaliação nutricional: responder questões sobre a sua alimentação e o que consumiu de alimentos nas últimas 24h.
- Solicitamos a sua participação para os seguintes procedimentos:
 - Avaliação de medidas corporais: medida de peso com balança e gordura corporal com aparelho que mede gordura.
 - Pressão arterial e frequência cardíaca: avaliadas com um aparelho de pressão digital. Nesse procedimento você permanecerá sentado, em repouso, por 5 minutos prévios à aferição, o braço será posicionado na altura do coração, apoiado, com a palma da mão voltada para cima e o cotovelo ligeiramente dobrado;
 - Função pulmonar através do teste de sopro, o qual verifica a velocidade e volume de ar nos pulmões. Para a realização você ficará sentado, em repouso, por 10 minutos antes do exame,

irá respirar no bocal do aparelho, enchendo os pulmões de ar e soprando com força e de forma rápida;

- Coleta de mucosa bucal: realizada esfregando-se uma escovinha na parte interna da bochecha;

- Coleta da unha realizada com um cortador de unha convencional;

- Coleta de sangue: realizada em veia do antebraço, será realizada anti-sepsia do local da coleta com álcool 70%, será coletado um volume de 5 mL. Para a coleta de sangue será necessário que faça um jejum prévio de 12 horas, sendo oferecido um lanche após a coleta. Após a coleta você irá segurar um algodão à parte puncionada mantendo o braço estendido. Orientamos para após a coleta de sangue não dobrar o braço, carregar peso ou bolsa a tiracolo ou usar manga dobrada no braço coletado por no mínimo 1 hora.

A realização dos procedimentos citados a cima terá duração de uma hora.

Desconfortos e riscos e benefícios: Informamos que nessa pesquisa o participante poderá sentir um pequeno desconforto no momento da coleta de sangue, pelo uso de agulha, podendo surgir um hematoma (roxo) no local onde foi retirado o sangue (se ocorrer este desconforto o participante será orientado a fazer compressas de gelo no local). Asseguramos que a equipe de pesquisa dará orientação e assistência de acordo com sua necessidade. Asseguramos que o participante terá acesso aos resultados e produtos gerados por esta pesquisa.

Solicitamos também a autorização do participante para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto. O participante será informado sobre os resultados da pesquisa após análise de todos os dados em conjunto, não havendo benefícios individuais diretos relacionados aos dados obtidos na pesquisa. Não há despesas pessoais para os participantes em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada a esta participação. O pesquisador se compromete em utilizar os dados coletados no estudo somente para fins da pesquisa.

Os pesquisadores estarão à disposição do participante para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. O investigador coordenador do projeto Professora Dra. Cláudia Ramos Rhoden poderá ser encontrada no endereço: Rua Sarmento Leite, 245, Bairro Centro, Laboratório 602, Prédio de Pesquisa e Pós-Graduação III, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), CEP 90050-170, e/ou pelos telefones (51) 3303-8800. Também poderá ser consultado o Comitê de Ética da UFCSPA, localizado no endereço: Rua Sarmento Leite, 245, Bairro Centro, Sala 407, Prédio de Pesquisa e Pós-Graduação III, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), CEP 90050-170 mesmo endereço, telefone (51) 3303-8804.

Esclarecemos que a participação no estudo é voluntária e, portanto, o participante não é obrigado a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano. Fica garantida a indenização em caso de danos, quando estes comprovadamente forem decorrentes da participação na pesquisa. O TCLE contém duas vias, uma ficará com o pesquisador e outra com o participante.

Adesão à pesquisa

Eu,..... (nome do participante) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito da pesquisa e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Professora Cláudia Ramos Rhoden certificou-me de que todos os dados que forneci serão confidenciais e só serão utilizados para fins de pesquisa.

Data: ____/____/____

Nome e assinatura do participante

Nome e assinatura do pesquisador

ANEXO VI

Termo de Anuência – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá sua realização na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, 12 de Junho de 2018.



Nome – cargo/função

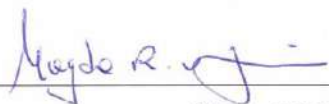
Márcia Giovenardi (carimbar)
Coordenação da Pós-Graduação Stricto Sensu
UFCSPA

ANEXO VII

Termo de Anuência – Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSPA)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá sua realização no Laboratório de Poluição Atmosférica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, 12 de junho de 2018.



Nome – cargo/função

Magda Rosane de Vargas Schardosim
Gerente de Laboratório de Pesquisa
em Pós-Graduação - UFCSPA

(carimbar)

ANEXO VIII

Termo de Anuência – Laboratório de Análises Clínicas (UFCSPA)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá sua realização no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Porto Alegre, 13 de junho de 2018.

Sheila Bimonte Lecke

Nome – cargo/função

Profª. Sheila B. Lecke
Lab. Análises Clínicas
UFCSPA

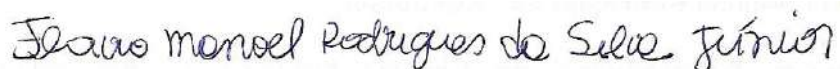
(carimbar)

ANEXO IX

Termo de Anuência – Instituto de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Rio Grande)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Prof^a Dr^a. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá a realização de algumas etapas no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Rio Grande, 06 de junho de 2018.



Professor Doutor Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior

Responsável pelo Laboratório de Ensaios Farmacológicos e Toxicológicos

Instituto de Ciências Biológicas - FURG

ANEXO X

Termo de Anuência – Academia BioExpress

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá o recrutamento de participantes realizado na Academia BioExpress.

Porto Alegre, 04 de junho de 2018.

ACADEMIA BIO MOINHOS LTDA

Nome – cargo/função

(carimbar)

Fabiano Silveiro

Gerente Geral.

ANEXO XI

Termo de Anuência – Academia Moinhos Fitness

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá o recrutamento de participantes realizado na Academia Moinhos Fitness.

Porto Alegre, 07 de Junho de 2018.



Nome – cargo/função

(carimbar)



ANEXO XII

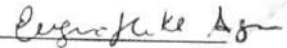
Termo de Anuência – Treinar Academia

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá o recrutamento de participantes realizado na Treinar Academia.

Porto Alegre, 14 de junho de 2018.

Profª. Eugênia Henke Argemi

CREF: 17779 G/RS



Nome – cargo/função

05.877.179/0001-83

(carimbar)

TREINAR ACADEMIA

F: 3024.5423

Rua Mariante, 438

Rio Branco CEP-90.430-180

PORTOALEGRE - RS

ANEXO XIII

Termo de Anuência – Bio Academia

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da exposição à poluição atmosférica *outdoor* e *indoor* e do exercício físico na saúde de adultos saudáveis”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá o recrutamento de participantes realizado na Bio Academia.

Porto Alegre, 14 de junho de 2018.

Yndiaipf. M. Lemes - Gerente
Bio Academia de Ginástica Ltda.
Nome – cargo/função

(carimbar)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE -
UFCSPA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LABORATÓRIO DE PESQUISA EM TOXICOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

**Avaliação da neurotoxicidade de agrotóxicos organofosforado,
piretroide, fenilpirazol e neonicotinoide através do modelo alternativo
*in vivo Caenorhabditis elegans.***

Pesquisadora Responsável:

Eliane Dallegrave

Pesquisadores Colaboradores:

Karine Rigon Zimmer

Gabriela Göethel

Júlia Machado Menezes

Porto Alegre, fevereiro de 2021

Resumo

O amplo uso de agrotóxicos para garantir o aumento da produtividade induz alterações ambientais que impactam de forma significativa a saúde de várias espécies, incluindo o homem. Várias são as formas de exposição a estes produtos, sejam de forma direta durante a aplicação ou indireta via água ou consumo de alimentos. Apesar de muitos estudos indicarem alterações em vários sistemas orgânicos, há dificuldade de se estabelecer onexo-causal nas pesquisas em humanos. Outro fator relevante é a necessidade de se determinar o mecanismo de ação em espécies não alvo, principalmente decorrentes de exposição crônica a baixas concentrações, ou mesmo de misturas de ingredientes ativos. Vários efeitos tóxicos decorrentes da exposição aos agrotóxicos têm sido relatados e, atualmente, aqueles sobre o sistema nervoso tem recebido especial atenção. Dentre as várias indicações, os inseticidas ganham especial atenção devido ao seu uso disseminado tanto agrícola quanto em medicina veterinária, saúde pública ou mesmo doméstico. Atualmente, quatro classes de inseticidas têm sido amplamente utilizadas: organofosforados, piretroides, fenilpirazóis e neonicotinoides, sendo os ingredientes ativos principais o Diclorvós, a Cipermetrina, o Fipronil e o Imidacloprid, respectivamente. Nesse contexto, este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos neurocomportamentais, morfofisiológicos e bioquímicos destes inseticidas e suas associações, usando como modelo experimental o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Para isso, serão realizadas avaliações de letalidade (DL₅₀), reprodutiva, comportamental e de estresse oxidativo (DCFH-DA) em linhagem selvagem N2 em *C. elegans*, exposta aos ingredientes ativos isolados e em associação. Adicionalmente será avaliada a neurotoxicidade por meio das cepas VP596, LX929, BY200, CZ333, VC2937 e VC1944, específicas para diferentes neurotransmissores. Este estudo viabilizará a avaliação neurotoxicológica, bem como os possíveis mecanismos de ação decorrentes da exposição crônica a baixas concentrações de agrotóxicos e suas associações, utilizando *C. elegans* como modelo preditivo de possíveis alterações sobre o sistema nervoso humano.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Inseticidas. Neurotoxicidade. *Caenorhabditis elegans*.

1 Introdução:

1.1 Agrotóxicos

Em meados dos anos 50, os agrotóxicos, fertilizantes e as máquinas agrícolas promoveram a “Revolução Verde” que consistia na chegada da tecnologia à agricultura com a promessa da erradicação da fome no mundo. Com o nome de “defensivos agrícolas”, os agrotóxicos foram aceitos mundialmente e somente em 1962 surgiu o primeiro alerta, através da obra de Rachel Carson, sobre os efeitos adversos dos agrotóxicos e das suas consequências sobre o homem e o meio ambiente (LUCCHESI, 2005).

Conforme a lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989, os agrotóxicos são:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Em 2017 o Brasil foi considerado um dos maiores produtores agropecuários do mundo e o segundo país que mais exporta esses produtos. Por sua vasta área de plantio, o Brasil também já foi descrito como o maior consumidor de agrotóxicos do planeta (PIGNATI et al., 2017), entretanto os efeitos adversos sobre o homem e o meio ambiente crescem proporcionalmente. Os agrotóxicos podem contaminar diversos biomas e interferir na flora e na fauna de ambientes de solo e aquáticos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Alterações do ecossistema e da morfologia de animais e vegetais usados na alimentação da população podem interferir negativamente na saúde humana. Desse modo, pessoas expostas aos agrotóxicos podem sofrer intoxicações e desenvolver diversas alterações físicas tais como: dano celular e de DNA, linfoma, câncer em diversos órgãos, óbitos fetais, más formações congênitas, perda auditiva, alterações hormonais e alterações neurológicas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). SOUZA et al. (2011) relata que indivíduos em contato com agrotóxicos apresentaram 2,5 vezes mais chances de referir alterações neurológicas do que indivíduos sem exposição aos agrotóxicos. As sequelas podem ser tanto sensitivas quanto motoras, além de deficiências cognitivas transitórias ou permanentes. Os indivíduos expostos aos agrotóxicos também relataram hipersalivação em decorrência da ação de substâncias inibidoras da acetilcolinesterase (AChE), fazendo com que a ACh se acumule nas fendas sinápticas, gerando efeitos colinérgicos periféricos e centrais (DE ARAÚJO et al., 2007; DE SOUZA et al., 2011).

Os agrotóxicos podem ter várias ações, como herbicida, fungicida, inseticida, entre outras. Sendo os inseticidas de grande relevância, tanto na agricultura, quanto em medicina veterinária, bem como na saúde pública e domesticamente para o controle de vetores, incluindo ingredientes ativos passíveis de envolvimento nas alterações neurológicas manifestadas pelos usuários (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, 2018).

1.2 Inseticidas

Entre os inseticidas mais utilizados no mundo encontram-se ingredientes ativos das classes de organofosforados, piretroides, fenilpirazois e neonicotinoides (COSTA, 2015; VIEIRA, 2003), sendo seus principais representantes o Diclorvós, a Cipermetrina, o Fipronil e o Imidacloprid, respectivamente.

1.2.1 Organofosforados

O mecanismo de ação dos organofosforados ocorre por meio da inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE). A inibição dessa enzima impede a hidrolização do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas e junções neuromusculares, levando a uma hiperexcitação dos tecidos musculares. Dentro desta classe encontramos o Diclorvós, caracterizado como um inseticida altamente tóxico, comprovado por meio de estudos *in vivo* que evidenciaram neurotoxicidade por estresse oxidativo e um déficit motor severo em ratos (GUVENÇ et al., 2014; SARIN; GILL, 2000).

1.2.2. Piretroides

Os piretroides têm efeito significativo sobre os canais de sódio no sistema nervoso, interferindo na sua abertura, prolongando o tempo de entrada dos íons Na⁺ para o interior da célula. Além disso, os piretroides do tipo II, como a Cipermetrina, manifestam inibição do GABA e podem afetar diversos sistemas em mamíferos como: sistema imune, digestivo, reprodutivo e nervoso. Um estudo feito através do uso de células, relatou que a Cipermetrina tem uma alta atividade metabólica e produz muitos radicais livres, principalmente no cérebro, que é o órgão com metabolismo oxidativo mais ativo do corpo. O cérebro tem uma pequena capacidade antioxidante, não conseguindo prevenir os possíveis danos causados por esses radicais livres. Desta forma, a Cipermetrina consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica e agir no cérebro, induzindo estresse oxidativo que gera danos celulares, necrose e apoptose (ZHOU et al., 2020).

1.2.3 Fenilpirazois

Os fenilpirazois se ligam seletivamente aos canais de cloreto dependente de ácido gama-aminobutírico (GABA), bloqueando a ação inibitória do GABA no sistema nervoso central (SNC). Dentre a classe dos fenilpirazois, destaca-se o ingrediente ativo Fipronil, devido ao seu grande uso em todo o mundo como inseticida de amplo espectro. Entretanto, devido ao uso generalizado e incorreto de Fipronil, a contaminação de água e solo tem sido uma evidência crescente nos últimos anos e pode gerar uma série de efeitos como: neurotóxico, hepatotóxico, nefrotóxico, citotóxicos e reprodutivos em animais (vertebrados e invertebrados) e humanos (WANG et al., 2016). Em um estudo feito com peixes-zebra, foi verificado que o Fipronil induziu nos animais comportamentos semelhantes a ansiedade, como o aumento de velocidade de natação e locomoção, demonstrando o alto efeito tóxico deste pesticida (QIAN et al., 2019).

1.2.4 Neonicotinoides

Os neonicotinoides são inseticidas amplamente utilizados, derivados da nicotina e encontrados em maior parte em água doce. Estes, bloqueiam os receptores pós-sinápticos nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (WU et al., 2009), o mesmo que para nicotina, sendo mais seletivos para insetos do que humanos, comparando-os a agrotóxicos como organofosforados, metilcarbamatos e organoclorados (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Dentre a classe dos neonicotinoides encontra-se o Imidacloprid, que se destaca devido a sua ampla utilização por ser um inseticida potente e de ação sistêmica. Ele é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e por contato com distribuição rápida e uniforme entre os tecidos. Em ratos, através de testes com hepatócitos e mitocôndrias, foi verificado que o Imidacloprid pode gerar metabólitos de biotransformação mais tóxicos do que o próprio pesticida (FRANCISCO; BIZERRA, 2018). Em peixes zebra, a exposição precoce ao Imidacloprid gera efeitos persistentes na primeira infância sobre a função neurocomportamental dos animais apontando o grande potencial de toxicidade deste pesticida (WANG et al., 2016).

1.3 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

Sydney Brenner foi o primeiro pesquisador a descrever e caracterizar o modelo como um nematoide de vida livre que se alimenta de fungos e bactérias presentes no solo e em frutas apodrecidas. Ao longo dos anos, as pesquisas com *C. elegans* vêm elucidando diversos aspectos da biologia que incluem apoptose, interferência de RNA e a função do miRNA (BRENNER, 1973; HUNT, 2017).

Devido a necessidade da redução de animais usados em pesquisas, um modelo alternativo *in vivo* se destaca na avaliação toxicológica de substâncias químicas, este modelo é o *C. elegans*. Ele é um modelo que segue o princípio dos 3Rs de Russel e Burch (1959) que consiste em *Reduction, Refinement e Replacement* com o intuito de promover a diminuição do uso de animais em pesquisas (KIRK, 2018). Por meio de análises de bioinformática, foi verificado que *C. elegans* tem de 60 a 80% dos genes homólogos aos genes humanos, sendo o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAINE, 2015).

Existem diversos fatores que contribuem para o *C. elegans* ser conhecido como um organismo vantajoso para pesquisa. Entre eles, destacam-se o fácil manuseio devido ao tamanho pequeno dos nematoides (1mm), permitindo a manutenção em placas de Petri, baixo custo das cepas e fácil cultivo. O modelo exige boas práticas para que não haja alterações de temperatura (já que o nematoide sobrevive a temperatura em torno de 20°C), contaminações e falta de nutrientes. Esses animais, por serem hermafroditas a grande maioria (se autofecundam) têm ampla capacidade reprodutiva, gerando aproximadamente 300 descendentes com desenvolvimento embrionário que passa por quatro fases larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar a fase adulta, caracterizando seu curto ciclo de vida de aproximadamente 3 dias (SANTOS, 2005). Os nematoides possuem

uma cutícula resistente e transparente, que permite a visualização de suas estruturas e mudanças morfológicas no sistema nervoso por meio de proteínas fluorescentes, o que o torna um modelo adequado para testes de neurotoxicidade (HUNT, 2017; STIERNAGLE, 2006).

2. Justificativa

Considerando, o amplo e crescente uso de agrotóxicos, a dificuldade de avaliação de seus efeitos na saúde em decorrência do caráter crônico da maioria das exposições, mesmo a reduzidas concentrações e de forma associada, torna-se fundamental utilizar modelos experimentais que fundamentam uma ampla e criteriosa avaliação dos efeitos sobre os diferentes sistemas orgânicos. Atualmente, o sistema nervoso tem recebido especial atenção, incluindo efeitos comportamentais. O *C. elegans* tem se mostrado um excelente modelo experimental, possibilitando investigar efeitos decorrentes da exposição a agrotóxicos, bem como entender seus mecanismos de ação tóxica. A neurotoxicidade que envolve diferentes sistemas de neurotransmissão humano pode ser modelada por meio de avaliações comportamentais e morfofisiológicas em *C. elegans*. Sendo assim, este estudo visa a avaliação de alterações comportamentais e morfofisiológicas, bem como dos prováveis mecanismos de ação decorrentes da exposição a baixas concentrações de ingredientes ativos das classes de inseticidas organofosforado, piretroide, fenilpirazol e neonicotinoide, utilizando *C. elegans* como modelo preditivo de impacto à saúde humana.

3. Objetivos:

3.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos neurotóxicos, comportamentais, morfofisiológicos e bioquímicos da exposição a agrotóxicos em *Caenorhabditis elegans* utilizando a cepa selvagem N2 e cepas marcadas para avaliação de neurotoxicidade.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos da exposição aos agrotóxicos “Diclorvós, Cipermetrina, Fipronil, Imidacloprid e associações”, em *C. elegans*, por meio de:
 - ensaio de mortalidade (DL₅₀) dos vermes e de parâmetros comportamentais (locomotoção);
 - parâmetros morfofisiológicos (desenvolvimento – tamanho, batimentos faríngeos e reprodução);
 - parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo através do ensaio (DCFH-DA);
 - ensaio de neurotoxicidade (cepas marcadas para neurônios colinérgicos, nicotínicos, dopaminérgicos e gabaérgicos).

4. Metodologia

4.1 Preparo das cepas e sincronização

Para este estudo serão utilizadas as cepas do tipo selvagem (N2), uma cepa para determinação de estresse oxidativo (VP596), uma cepa marcada para neurônios colinérgicos (LX929), outra cepa marcada para neurônios dopaminérgicos (BY200), duas para neurônios nicotínicos (VC2937 e VC1944) e uma para neurônios GABAérgicos (CZ333) de *C. elegans*, obtidas através do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) da Universidade de Minnesota, EUA. As cepas serão mantidas a 20°C, em meio NGM (*Nematode Growth Medium*) e alimentadas com *Escherichia coli* OP50. Para os tratamentos a serem feitos, populações de nematoides em estágio L1 serão obtidas através de sincronização por isolamento de embriões provenientes de nematoides grávidos através do processo de rompimento da cutícula com a solução *Bleaching* (NaOCl 1%; NaOH 0,25M), seguido pelo processo de flutuação em sacarose (30%) para separação dos ovos. Após, os ovos serão lavados com tampão M9 (0,02 M KH₂PO₄; 0,004M 8; Na₂HPO₄; 0,09 M NaCl e 0,001 M MgSO₄) e dispostos em placas NGM sem bactéria (alimento) para que eles eclodam e os tratamentos de exposição do *C. elegans* aos pesticidas sejam iniciados.

4.1.2 Preparo das amostras e tratamento

As concentrações serão definidas baseadas em concentrações detectadas em água e em estudos com o próprio modelo, além de ensaios pilotos para estabelecimento de curva dose-efeito em relação a DL₅₀.

Países como Holanda, Paquistão e Japão relataram a grande quantidade de pesticidas nas suas águas, afetando os seus ecossistemas e a saúde das suas populações. Na Holanda, os neocotinoides foram encontrados em altíssimas concentrações (Acetamiprida 1,1mg/L e Tiametoxam 0,4mg/L). No Paquistão, 77% das amostras coletadas estavam com grandes índices de contaminantes químicos. No Japão, foram encontradas concentrações de até 10µg/L de herbicidas em suas águas (DAUD et al., 2017; KAMATA; MATSUI; ASAMI, 2020; SJERPS et al., 2019). Esses dados revelam a grande necessidade de maiores estudos relacionados a contaminantes por agrotóxicos no Brasil.

Através de tratamento crônico, os nematoides em estágio L1 serão expostos aos pesticidas em meio líquido. Em cada *ependorf* será adicionado tampão M9, 1500 nematoides e 50µL da concentração de agrotóxico, com um volume final de 1000µL. Os *ependorfs* ficarão homogeneizando por 1 hora. Logo, o meio líquido será transferido para placas de Petri contendo NGM e *E. coli* OP50. As placas do tratamento ficarão armazenadas na incubadora até a realização dos ensaios de toxicidade (JACQUES et al., 2019).

4.2 Avaliação da mortalidade do *C. elegans* (estimativa de DL₅₀)

Será realizada utilizando 2500 larvas em estágio larval L1, sincronizadas previamente. Os vermes serão incubados a 20°C, com a dose de tratamento durante 30 min ou 24 horas, sob agitação constante. Posteriormente as amostras serão lavadas com solução salina 0,5% para retirada do tratamento, e transferidas para placas NGM inoculadas com *E. coli* OP50. Após 24 horas será contado o número de larvas sobreviventes em cada placa.

[K1] Comentário: A DL50 será determinada para tratamento agudo e crônico isso?

4.3 Estresse oxidativo – DCFH-DA

A produção de espécies reativas de oxigênio será avaliada seguindo o mesmo protocolo de tratamento descrito para a avaliação da mortalidade. Após o tratamento, as larvas serão ressuspensas em NaCl 0,9% e transferidas para uma placa de 96 poços, será adicionando 100 µl de diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) 0,05 mM. Na presença de espécies reativas, o DCFH-DA é oxidado a diclorofluoresceína (DCF), um produto fluorescente. A emissão de fluorescência será medida a cada 10 min, durante 90 minutos, a 485 nm de excitação e 535 nm de emissão em um leitor de microplacas (Spectramax Me2 Molecular Devices), obtendo-se o percentual de intensidade de fluorescência emitida pelas amostras testadas em relação ao controle.

4.4 Desenvolvimento dos vermes

O desenvolvimento será avaliado 48h após o tratamento através da medida de área corporal dos vermes adultos em estereomicroscópio. As placas contendo os vermes serão lavadas com água autoclavada e estes transferidos para tubos de centrifugação para retirada total da bactéria. Desta maneira, os vermes irão decantar e a bactéria ficará em suspensão. O processo será repetido até que a solução se torne límpida. Em seguida, 15 µl da solução com os vermes serão depositados sobre uma lâmina coberta por agarose e serão adicionados 30 µl de levamisol 2,25% para a paralisação do verme na lâmina. Os vermes serão fotografados para terem seu contorno corporal medido (10 medições), e este contorno será realizado manualmente com auxílio do software AxioVision versão 4.8.2.

4.5 Reprodução dos nematoides

A reprodução será avaliada pelo tamanho da ninhada. Vinte (20) nematoides por grupo serão avaliados e após a exposição aos agentes intoxicantes, os animais serão transferidos separadamente para uma placa NGM, suprida com *E. coli* OP50. O número de ovos dispostos por cada nematoide será contabilizado diariamente.

4.6 Batimento faríngeo

As contagens dos batimentos faríngeos serão observadas e contabilizadas enquanto o nematoide se alimenta da bactéria. Vinte (20) nematoides por grupo serão avaliados e seus batimentos contabilizados em 6 tempos de 10 segundos.

4.6 Avaliação comportamental

A locomoção é o mais importante comportamento mediado por neurônios colinérgicos. Os números de *body bends* serão contabilizados por 3 minutos em placas sem bactéria para fins de não haver interferência na locomoção do animal (ILJOMONE *et al*, 2020).

4.7. Microscopia

Os vermes serão lavados três vezes com meio M9 para retirar resíduos bacterianos. Os vermes serão colocados em lâminas de vidro (anestesiados com uma pequena alíquota de azida de sódio 100 mM) e a visualização de fluorescência será através de microscópio confocal. As imagens serão processadas com o software Image J (Salim & Rajini, 2017).

4.8. Análise estatística

Ensaio serão realizados em triplicata, em grupos de três experimentos independentes. Dados serão expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por Análise de Variância (Anova) e um valor $p \leq 0,01$ será considerado estatisticamente significativo. As análises de sobrevivência em *C. elegans* serão determinadas usando o teste log-rank e curva de Kaplan-Meier, usando o software Graphpad Prism 9.0.

5 Expectativas

Além de avaliar o impacto dos ingredientes ativos das principais classes de inseticidas em amplo uso em nosso meio, bem como o efeito de suas associações sobre o modelo *C. elegans*, as cepas marcadas para sistemas neurotransmissores permitirá avaliar os mecanismos envolvidos nos efeitos evidenciados e favorecer as interpretações quanto a neurotoxicidade destes agrotóxicos relatadas em várias espécies, incluindo a humana. Estes achados podem fundamentar a relação de nexos causal fragilizada em estudos com humanos, em decorrência do uso de diferentes ingredientes ativos, sob diferentes formulações, associados ou não a outros agrotóxicos, com ou sem uso de equipamentos de proteção individual, sob diferentes protocolos de aplicação, envolvendo concentrações, período de aplicação ou reaplicação diferenciados.

Outrossim, viabilizar a compreensão dos possíveis mecanismos de neurotoxicidade gerados pela exposição crônica aos agrotóxicos e suas associações, fundamentando possíveis alterações nas políticas públicas de prevenção de danos induzidas por substâncias envolvidas em atividades laborais. Gerando assim, publicações com impacto científico e dados com relevância social e de saúde pública.

6 Cronograma

Plano de execução de atividades:

ETAPAS	2021					2022					
	MAR/ ABR	MAI/ JUN	JUL/ AGO	SET/ OUT	NOV/ DEZ	JAN/ FEV	MAR/ ABR	MAI/ JUN	JUL/ AGO	SET/ OUT	NOV/ DEZ
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Preparo, manutenção e sincronização das cepas	X	X	X								
Ensaio <i>in vivo</i>				X	X	X	X	X	X		
Análise dos resultados				X	X	X	X	X	X		
Redação dos artigos e dissertação						X	X	X	X	X	X
Defesa da dissertação											X

7 Orçamento

Materiais de Consumo	Quantidade	Valor em Reais R\$
Fosfato de Potassio Monobasico Anidro P.A. 250g	1	R\$ 22,00
Fosfato de Potassio Bibasico Anidro P.A. 250g	1	R\$ 20,00
Fosfato de Sodio Bibasico Anidro P.A. 250g	1	R\$ 16,00
Cloreto de sódio P.A. 500g	1	R\$ 14,00
Agar Bacteriologico 500g K25-611001	4	R\$ 1.256,00
Peptona Bacteriologica 500g K25-611701	3	R\$ 780,00
Sacarose P.A. 500g	2	R\$ 46,00
Ponteira Amarela com 1000Und	5	R\$ 50,00
Ponteira Azul com 1000und	5	R\$ 120,00
Eppendorf 1,5 ml pct com 1000 unidades	5	R\$ 160,00
Colesterol Sigma (C8667-5g)	1	R\$ 723,00
Diclorvos - Pestanal (5mg)	1	R\$ 159,00
Cypermethrin - Pestanal (5mg)	1	R\$ 448,00
Fipronil – Pestanal (5mg)	1	R\$ 1.324,00
Imidacloprid - Pestanal (5mg)	1	R\$ 483,00
Cepas de C. elegans	6	R\$ 200,00
Bactéria OP50	2	R\$ 60,00
Máscaras	10	R\$ 500,00
Placas de Petri	20	R\$ 1.300,00
Luvas	15	R\$ 1.200,00
Total		R\$ 8.881,00

Todos os materiais necessários à execução do projeto serão adquiridos com verba própria das pesquisadoras, bem como possíveis verbas PROAP destinadas para esta finalidade.

Referências

- BRENNER, S. Nature's gift to science (Nobel lecture). **ChemBioChem**, v. 4, n. 8, p. 683–687, 1973.
- COSTA, L. M. DA. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ASSOCIADOS DOS INSETICIDAS FIPRONIL E IMIDACLOPRIDO SOBRE A MORTALIDADE DA ABELHA NATIVA *Melipona scutellaris* (LATREILLE, 1811). **CNR-ISTI technical report**, v. 3, n. 2, p. 356–369, 2015.
- DAUD, M. K. et al. Drinking Water Quality Status and Contamination in Pakistan. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- DE ARAÚJO, A. J. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: Estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115–130, 2007.
- DE SOUZA, A. et al. [Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil)]. **Ciencia & saude coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3519–28, 2011.
- FRANCISCO, P.; BIZERRA, V. Imidacloprido No Fígado De Rato. 2018.
- GONZALEZ-MORAGAS, L.; ROIG, A.; LAROMAIN, A. C. elegans as a tool for in vivo nanoparticle assessment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 10–26, 2015.
- GUVENÇ, D. et al. 3-Nitrotyrosine Levels in Dichlorvos-Induced Neurotoxicity. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 65, n. 1, p. 109–112, 2014.
- HUNT, P. R. The C. elegans model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50–59, 2017.
- JACQUES, M. T. et al. Reprotoxicity of glyphosate-based formulation in *Caenorhabditis elegans* is not due to the active ingredient only. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1854–1862, 2019.
- KAMATA, M.; MATSUI, Y.; ASAMI, M. National trends in pesticides in drinking water and water sources in Japan. **Science of the Total Environment**, v. 744, p. 140930, 2020.
- KIRK, R. G. W. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. **Science Technology and Human Values**, v. 43, n. 4, p. 622–648, 2018.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.
- LUCCHESI, G. **Agrotóxicos - Construção da Legislação**, 2005.
- PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

QIAN, Y. et al. Exposure of low-dose fipronil enantioselectively induced anxiety-like behavior associated with DNA methylation changes in embryonic and larval zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 362–371, 2019.

SARIN, S.; GILL, K. D. Biochemical characterization of dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rat. **IUBMB Life**, v. 49, n. 2, p. 125–130, 2000.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. Intoxicações agudas por Agrotóxicos. **Pevaspea**, v. 1, p. 20, 2018.

SJERPS, R. M. A. et al. Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources. **Chemosphere**, v. 235, p. 510–518, 2019.

STIERNAGLE, T. **Maintenance of C. elegans. WormBook : the online review of C. elegans biology**, 2006.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247–268, 2005.

VIEIRA, E. A INFLUÊNCIA DO EFEITO MATRIZ NA DETERMINAÇÃO DOS PESTICIDAS ORGANOCLORADOS E ORGANOFOSFORADOS EM AMOSTRAS DE MANGA. 2003.

WANG, X. et al. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 876–899, 2016.

WU, M. L. et al. Neonicotinoid insecticides: An emerging cause of acute pesticide poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 336–341, 2009.

ZHOU, L. et al. Cypermethrin-induced cortical neurons apoptosis via the Nrf2/ARE signaling pathway. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 165, n. 2600, p. 0–1, 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**FABRICAÇÃO DIGITAL DE EPI E DISPOSITIVOS MÉDICOS VALIDADOS
POR ENSAIOS MECÂNICOS E MICROBIOLÓGICOS COM ANÁLISES DE
FALHAS E GARANTIA DE USABILIDADE**

Proponente: Prof^a. Dr^a. Gisele Orlandi Introíni - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Profa Dra Elizandra Braganhol - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Porto Alegre
2020

LISTA DE ABREVIações

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ABS: *Acrylonitrile Butadiene Styrene*

EPI: Equipamento de Proteção Individual

ISCMPA: Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

PFF: Pavilhão Pereira Filho

PLA: *Polylactic Acid*

PA: *Polyamide*

UI: Unidade de Internação

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

São milhares de propostas pulverizadas pelo mundo que utilizam a Fabricação Digital para mitigar os efeitos da pandemia. Voluntários produzem diversificados dispositivos médicos impressos em 3D. Mas é necessário alertar que embora haja flexibilização das normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a confecção de uma série de produtos hospitalares, as normativas existem e devem ser rigorosamente seguidas. Nosso projeto: (1) Fabrica Digitalmente Equipamentos de Proteção Individual para uso em Serviços de Saúde, em virtude da emergência relacionada ao SARS-CoV-2 e (2) Tem como norte para nossas ações, a aplicabilidade para o Sistema Único de Saúde (SUS), no que se refere à factibilidade de utilização dos artefatos nos serviços, programas, e/ou sistemas de Saúde Pública. Pretendemos atingir essa meta por: (i) Democratização do Ensino/Capacitação em Modelagem, Fatiamento, Impressão 3D e Corte a Laser e (ii) *Upload* de todos os arquivos tanto para Corte a Laser quanto para impressão 3D na plataforma LIPECIN para *Download* gratuito. É inconcebível excluir o *frontline* do Cuidado ao Paciente dos processos criativos do presente projeto. Pelo contrário, o protagonismo do trabalhador hospitalar se dará no palco da Fabricação Digital tendo como mediador sensível o docente/pesquisador universitário e como assessor técnico e amplificador da voz da Enfermagem/Medicina os Graduandos e Pós-Graduandos da UFCSPA além da Engenharia de Segurança do Trabalho e Engenharia Clínica da Santa Casa. Os objetivos gerais (do nosso projeto) serão: (1) Conduzir Ensaios Mecânicos utilizando o testador Servo-hidráulico de Fadiga e Resistência para que tenhamos elementos mensuráveis de segurança e durabilidade; (2) Realizar Ensaios Microbiológicos nos protótipos impressos em 3D evitando que os dispositivos carregem consigo agentes patogênicos e (3) Validar os EPIs criados por Manufatura 4.0, juntamente aos profissionais do *frontline* assistencial, para que deixem o *status* de protótipo e sejam considerados produtos (com garantia de usabilidade).

INTRODUÇÃO

A epidemia da COVID-19 se espalhou rapidamente desde a sua origem em Wuhan, província de Hubei, China (KRAEMER et al., 2020). Uma série de intervenções foi implementada após a detecção, no final de dezembro de 2019, de consideráveis casos de pneumonia de etiologia desconhecida e a identificação do vírus causal SARS-CoV-2 no início de janeiro de 2020 (KRAEMER et al., 2020). As intervenções incluem: (i) taxas aprimoradas de testes de diagnóstico, (ii) gerenciamento clínico, (iii) isolamento rápido de casos suspeitos/contatos confirmados e, (iv) principalmente, restrições à mobilidade (doravante denominadas *cordon sanitaire*) impostas à cidade de Wuhan em 23 de janeiro.

A contenção de infecções respiratórias é particularmente difícil quando caracterizadas por sintomas relativamente leves conjugados a elevada virulência (KRAEMER et al., 2020). Medidas intensivas de controle, incluindo restrições de viagem, foram implementadas para limitar a disseminação da COVID-19 na China. KRAEMER et al. (2020) mostram que as restrições de viagem são particularmente úteis na fase inicial de um surto, quando estão confinadas a uma determinada área que atua como uma fonte importante. No entanto, as restrições de trânsito podem ser menos eficazes quando o surto for mais disseminado. A combinação de intervenções efetivadas na China foi claramente bem-sucedida na mitigação do *spread* e na redução da transmissão local da COVID-19, embora neste trabalho não tenha sido possível determinar definitivamente o impacto de cada intervenção. São necessários muito mais trabalhos publicados para determinar como equilibrar de maneira ideal o efeito positivo esperado na Saúde Pública com o impacto negativo na liberdade de movimento e outros setores da sociedade em geral (KRAEMER et al., 2020).

Ao consultar o painel coronavírus do Ministério da Saúde Brasileiro (atualizado às 18h de 22/06/2020), temos os seguintes dados nacionais: (i) 1.188.631 Casos Confirmados; (ii) 53.830 Óbitos; (iii) 25,6 de Mortalidade/100 mil habitantes. Dados Específicos para o Rio Grande do Sul são: (i) 22.009 Casos Confirmados; (ii) 500 Óbitos e (iii) 4,4 de Mortalidade/100 mil habitantes (<https://covid.saude.gov.br/>).

Entretanto, de acordo com Jake Spring e Pedro Fonseca - Brasília/Rio de Janeiro (Reuters), o Brasil provavelmente tem 12 (doze) vezes mais casos do novo coronavírus do que está sendo oficialmente notificado pelo governo, devido aos

poucos testes e longas esperas para confirmar os resultados, de acordo com um estudo divulgado em meados do mês de abril.

Pesquisadores de um consórcio de universidades e institutos brasileiros examinaram a proporção de casos que resultaram em mortes até 10 de abril e compararam-na com dados sobre a taxa de mortalidade esperada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A taxa de mortalidade muito acima do esperado no Brasil indica que há muito mais casos do vírus do que aqueles contabilizados, com o estudo estimando que apenas 8% dos casos estão sendo oficialmente relatados. O governo concentrou-se em testar pacientes graves e não todos os suspeitos, de acordo com o consórcio, conhecido como Núcleo de Operações e Inteligência em Saúde (NOIS). O centro e os profissionais médicos também relataram que há longos tempos de espera para obter os resultados dos testes.

O Ministério da Saúde comunica que há dificuldades de distribuição dos testes em um país de dimensões continentais como o Brasil, reconhecendo a importância de maximizar a eficiência dos ensaios. Até o momento, o número de internações por sintomas respiratórios graves foi três vezes maior que o normal para essa época do ano, mas apenas 12% deles foram confirmados como COVID-19. "O alto grau de subnotificação pode dar uma falsa impressão sobre o controle da doença e, consequentemente, levar a um declínio nas medidas de contenção", afirmou o NOIS. Até o momento, o centro tem sido preciso em prever a evolução do vírus no Brasil, com o número confirmado de casos de coronavírus até 30 de março dentro do intervalo que os pesquisadores previram anteriormente.

O distanciamento social foi a medida adotada pela maioria dos governantes em âmbito global, com o intuito de reduzir o contágio pelo novo coronavírus. Entretanto, profissionais da saúde realizam exatamente o oposto a esta diretriz, e se preparam para o enfrentamento direto da doença, colocando-se em situações de alto risco de contágio por COVID-19.

Impedir a transmissão intra-hospitalar da doença é, portanto, uma prioridade. Com base no modelo da Iniciativa de "Engenharia de Sistemas para Segurança do Paciente", as estratégias e medidas para proteger os profissionais de saúde em um hospital são descritas nos domínios da tarefa de trabalho, tecnologias e ferramentas, fatores ambientais e condições organizacionais. O princípio da "infecção ocupacional

zero” continua sendo uma meta alcançável que todos os sistemas de saúde precisam buscar diante de uma possível pandemia (GAN et al. 2020).

Os números apresentados pelas instituições de saúde, que investigam as características dos infectados são alarmantes. De acordo com a Comissão Nacional de Saúde da China, mais de 3300 profissionais de saúde foram infectados no início de março. Na Itália, aproximadamente 20% dos profissionais de saúde atuantes estavam infectados. As preocupações das equipes que estão na linha de frente ao combate da doença orbitam em torno das difíceis decisões de triagem e da dor de perder pacientes e colegas. Além destas questões o risco de infecção causa exaustão física e mental das equipes médicas (LANCET, 2020).

Cingapura aprendeu lições importantes durante a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2003. 41% dos 238 casos prováveis de SARS em Cingapura ocorreram em profissionais de Saúde. Os esforços de contenção hospitalar foram, portanto, implementados em uma tentativa de conter a transmissão intra-hospitalar de SARS. Essas medidas impediram a disseminação hospitalar irrestrita da SARS, mas não antes de cobrar um preço alto aos profissionais de saúde que cuidam de pacientes infectados (LIN et al. 2020).

O aprimoramento sistemático de Cingapura em capacidade para preparação de enfrentamento a pandemia - desde a criação de um “Centro Nacional de Doenças Infecciosas”, criado para fins específicos, até o armazenamento de equipamentos de proteção individual (EPI) em nível nacional - procura limitar a mortalidade e a morbidade do próximo surto de doença transmissível, como a COVID-19, salvaguardando a saúde ocupacional de seus profissionais de saúde de primeira linha.

Semelhante à SARS, as evidências atuais indicam que a COVID-19 é transmitida essencialmente através de gotículas respiratórias (GAN et al. 2020). Esses elementos infecciosos podem propagar-se por uma distância de até 1.8-2 metros, o que é o argumento irrefutável para promoção do distanciamento social. Tocar uma superfície contaminada por gotículas infecciosas e depois tocar nos próprios olhos, nariz ou boca é outra maneira de propiciar a infecção. Portanto, a chave para evitar a infecção é ter essas áreas do rosto cobertas.

É imprescindível que os profissionais da saúde não sejam vistos apenas como “peças” de um grande sistema, mas sim como seres humanos que precisam da

garantia de que a sua segurança será eficaz. Por este motivo, os trabalhadores não devem ser equiparados a máquinas ou equipamentos que podem ser fabricados com urgência e operar com 100% da capacidade. Atentar para as medidas preventivas de contágio, e produzir equipamentos de proteção individual (EPIs) que sigam as normas regulamentadoras e endossem a segurança dos trabalhadores.

Na Era da Informação, na qual vivemos, em que volumes exponenciais de dados são vertidos em nossa realidade, afirma HARARI (2018): “Num mundo inundado de informações irrelevantes, clareza é poder.” Segundo PAPERT (1993), há algumas décadas, e em muitas partes do mundo, os jovens, seguramente, aprenderiam habilidades que poderiam usar em seu trabalho ao longo da vida. Hoje, nos países onde a Indústria 4.0 dissemina-se, a maioria das pessoas está em trabalhos que não existiam quando nasceram. As habilidades mais importantes que contribuem para o padrão de vida de uma pessoa se alicerçam: (i) na capacidade de aprender novas aptidões, (ii) de adotar conceitos contemporâneos, (iii) de avaliar situações inéditas e (iv) de lidar com o inesperado. Isso será cada vez mais tangível no futuro: a capacidade competitiva respalda-se no aprender. O que é verdade no âmbito individual é ainda mais fundamentado para as nações. A força competitiva de um país é diretamente proporcional à sua competência de aprendizado; isto é, uma combinação das capacidades de assimilação de novos conhecimentos/tecnologias/conceitos pelos indivíduos e pelas sociedades (PAPERT, 1993). A plasticidade é a tônica a ser aplicada diariamente nos mais diversificados ramos fugindo a estagnação e acompanhando o que acontece no cenário global. As ideias apresentadas por PAPERT (1993) nunca foram tão palpáveis quando nos referimos a urgente necessidade de capacitação dos discentes/docentes/colaboradores/profissionais da Saúde para aprenderem conceitos vinculados a Manufatura 4.0.

De acordo com SANDLER (2014), o uso de tecnologias de impressão tridimensionais (3D) pode substituir muitas abordagens convencionais de fabricação na sociedade e transformar as maneiras pelas quais os materiais são transformados em funcionais (GEISSLER & XIA, 2004; MARKS et al., 2011; SYMES et al., 2012). A impressão 3D geralmente é um método de prototipagem rápida que cria objetos tridimensionais a partir de modelos CAD (*Computer-Aided Design*). Três dimensões são criadas pela Manufatura Aditiva (AM): todas as camadas devem solidificar

quando, por exemplo, materiais poliméricos são usados. Nos últimos anos, várias técnicas de impressão 3D foram desenvolvidas, e diferentes materiais para impressão estão disponíveis, como plásticos, cerâmicos e partículas de metal (DIMITROV et al.,2006).

Na plataforma da *European Association of the Machine Tool Industries* (CECIMO), há anúncios de que fornecedores, fabricantes e designers profissionais de AM na comunidade de impressão 3D já começaram a responder à crise global, oferecendo suas respectivas habilidades para aliviar a pressão sobre cadeias de suprimentos e governos.

Filip Geerts, diretor geral do CECIMO, disse: “Acredito que o setor de manufatura aditiva pode desempenhar um papel importante na sustentação do esforço dos trabalhadores de hospitais no meio desta emergência. No entanto, é do interesse de todos esclarecer as questões regulatórias para avançar rapidamente e de uma maneira que não atrase as ações imediatas”.

São milhares de iniciativas pulverizadas pelo mundo que utilizam a Fabricação Digital (com ênfase na Impressão 3D) para mitigar os efeitos da pandemia. Voluntários produzem diversificados implementos impressos em 3D, todavia, é necessário alertar que embora haja flexibilização das normas da ANVISA para a confecção de uma série de produtos hospitalares, as normativas existem e devem ser rigorosamente seguidas.

JUSTIFICATIVA

A norma regulamentadora de saúde e segurança no Trabalho nº06 (NR-06), com redação dada pela portaria SIT n.º 25, de 15 de outubro de 2001, do então Ministério do Trabalho e Emprego, considera como equipamento de proteção individual (EPI) - todo dispositivo ou produto, de uso individual e utilizado pelo trabalhador, destinado à proteção de riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho. Em função do surto da COVID-19, doença causada pelo novo coronavírus (SARS-Cov-2), no dia trinta de janeiro de 2020 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a nota técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 04/2020, definindo as orientações para serviços de saúde quanto às medidas de prevenção e controle que devem ser adotadas durante a assistência aos casos suspeitos ou confirmados de infecção pelo SARS-CoV-2.

Desde então, a publicação já passou por cinco processos de atualização, sendo a última versão publicada em 8 de maio de 2020. No decorrer desse período, mais precisamente em onze de março, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elevou o estado de contaminação da COVID-19 à pandemia. A referida nota técnica da ANVISA estipula a utilização de EPIs dentre as precauções a serem adotadas por todos os Serviços de Saúde durante a assistência, assim como diversas outras medidas igualmente importantes na prevenção da contaminação dos profissionais envolvidos no atendimento de pacientes confirmados ou suspeitos de infecção pelo SARS-CoV-2.

Basicamente, os EPIs recomendados aos profissionais de saúde são: máscara cirúrgica, máscara do tipo peça facial filtrante classe N95/PFF-2 ou equivalente, luvas de procedimento, óculos de proteção ou protetor facial, avental/capote e touca/gorro. Os termos “protetor facial”, “escudo facial” e “*face shield*” serão usados como sinônimos neste trabalho. As situações de trabalho específicas que demandam a necessidade de uso de cada um dos EPI também constam detalhadamente na aludida nota técnica, sendo indicado o uso de óculos de proteção ou protetor facial para os profissionais da saúde e profissionais de apoio quando houver risco de exposição a respingos (de sangue, secreções corporais, excreções entre outros) provenientes de paciente suspeito ou confirmado de infecção por SARS-CoV-2.

A RESOLUÇÃO - RDC Nº 356, DE 23 DE MARÇO DE 2020, emitida pelo Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “dispõe, de forma extraordinária e temporária, sobre os requisitos para a fabricação, importação e aquisição de dispositivos médicos identificados como prioritários para uso em serviços de saúde, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2.” Tece apontamentos sobre as *Face Shields*, “Art. 6º Os protetores faciais do tipo peça inteira devem atender aos requisitos estabelecidos na seguinte norma técnica: § 3º As faixas utilizadas como principal meio de fixação devem ser ajustáveis ou autoajustáveis e ter, no mínimo, 10 mm de largura sobre qualquer parte que possa estar em contato com o usuário. § 4º O visor frontal deve ser fabricado em material transparente e possuir dimensões mínimas de espessura 0,5mm, largura 240 mm e altura 240mm.”

Acreditamos que os protetores faciais são EPIs indispensáveis frente a pandemia. Existem muitos modelos, mas todos recorrem a material plástico transparente preso a um capacete para cobrir os olhos, nariz e boca, impedindo que gotículas infecciosas entrem em contato com essas áreas onde o vírus pode acessar um potencial próximo hospedeiro. Eles cobrem mais o rosto do que máscaras e impedem que o usuário toque seu rosto. É importante ressaltar que os escudos podem apresentar: (i) durabilidade, (ii) capacidade de limpeza/higienização após o uso, (iii) reutilização e, (iv) para muitas pessoas, conforto/usabilidade maximizados. Têm sido produzidos por *maker communities* disseminadas pelo globo.

Ao observarmos estas numerosas iniciativas/projetos amplamente anunciados pelo nosso país, identificamos que muitos projetos individuais e coletivos não têm obedecido as normativas preconizadas pela ANVISA. Cabe a Universidade em parceria com Complexos Hospitalares produzir, validar e publicar como esses escudos faciais devem ser fabricados digitalmente. Todo profissional de saúde precisa de um protetor facial para exercer com segurança seu ofício. Embora ainda sejam necessárias máscaras faciais em algumas situações, a implementação de protetores faciais reduzirá bastante a necessidade de máscaras faciais e ampliará o suprimento nacional limitado de máscaras. Os engenheiros/informatas biomédicos aperfeiçoam projetos para escudos faciais que são de domínio público, e a fabricação em escala é relativamente simples.

O Laboratório de Inovação, Prototipagem, Educação Criativa e Inclusiva (LIPECIN) é protagonista no Espaço *Maker* do Centro de Inovação UFCSPA – Santa Casa. É um local de sinergia entre duas instituições que fomentam colisões bem sucedidas entre profissionais de diferentes áreas do conhecimento para encontrar soluções viáveis nas esferas da Saúde e em outros campos do saber. Nossas principais áreas são a Biologia Celular/Anatomia/Embriologia e Química. Mas, atualmente, estamos capitaneando iniciativas, voltadas para a Fabricação Digital de dispositivos médicos identificados como prioritários para uso em serviços de saúde, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2.

Sendo assim, o presente projeto justifica-se tendo em vista a urgente necessidade de centralizar as condutas envolvidas na gestão de fabricação de equipamentos de proteção Individual, nos maiores impactados nestas ações, as pessoas. O desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação assegurará a padronização e escalabilidade de EPIs a fim de elevar ao máximo o nível de proteção dos profissionais da Saúde, viabilizando melhores condições físicas e consequentemente psicológicas durante a jornada de trabalho.

Cabe à Universidade em parceria com Complexos Hospitalares produzir, validar e publicar como esses escudos faciais devem ser fabricados digitalmente. Todo profissional de saúde precisa de um protetor facial para exercer com segurança seu ofício.

OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é a Fabricação Digital de objetos de uso hospitalar de uma maneira segura recorrendo a Impressão 3D, Corte a Laser e outras máquinas CNC (controle numérico computadorizado), em virtude da emergência relacionada ao SARS-CoV-2.

Para atingir o propósito deste projeto, os seguintes objetivos específicos serão abordados:

- i. Fabricar Digitalmente Equipamentos de Proteção Individual prioritários para uso em serviços de saúde, em virtude da emergência relacionada ao SARS-CoV-2;
- ii. Conduzir Ensaios Mecânicos utilizando o testador Servo-hidráulico de Fadiga e Resistência para que tenhamos elementos mensuráveis de segurança e durabilidade;
- iii. Realizar Ensaios Microbiológicos nos protótipos impressos em 3D evitando que os dispositivos carregem consigo agentes patogênicos;
- iv. Validar os EPIs criados por Manufatura 4.0, juntamente aos profissionais do *frontline* assistencial, para que deixem o *status* de protótipo e sejam considerados produtos (com garantia de usabilidade);
- v. Avaliar a adesão e o conforto da utilização do Escudo Facial;
- vi. Buscar a Aplicabilidade para o Sistema Único de Saúde (SUS), no que se refere à possibilidade de utilização dos artefatos nos serviços, programas, e/ou sistemas de Saúde Pública;
- vii. Democratizar o Ensino/Capacitação em Modelagem, Fatiamento, Impressão 3D e Corte a Laser por edições de Webinar (seminário online em vídeo, gravado ou ao vivo, que, geralmente, permite a interação da audiência via chat);
- viii. Realizar o *Upload* de todos os arquivos tanto para Corte a Laser quanto para impressão 3D na plataforma LIPECIN para *Download* gratuito.

DELINEAMENTO

A estratégia metodológica utilizada para validação dos EPIs será um estudo transversal com a aplicação testes mecânicos e microbiológicos dos equipamentos produzidos utilizando Manufatura 4.0. Para investigação da aceitação do uso do Escudo Facial, um estudo descritivo, exploratório, baseado na abordagem qualitativa dos dados será aplicado.

A disponibilização dos Escudos Faciais se dará para testes pelos profissionais que atuam na Emergência, Unidades de Internação (UIs) dos 3º e 4º andares e Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Pavilhão Pereira Filho (PPF), visto que atualmente são estas as posições na linha de frente da assistência aos pacientes suspeitos/confirmados de COVID-19.

As variáveis em análise deflagram-se em três campos: (i) Ergonomia/Usabilidade em que os parâmetros que serão avaliados pelos usuários compreendem: (1) conforto/desconforto; (2) sensação de segurança em relação a agentes infecciosos; (3) facilidade de higienização; (3) opacidade/translucidez do visor; (4) aparência/design e (5) estabilidade/ancoragem a cabeça. (ii) Ensaio Mecânicos: a partir dos quais, os pesquisadores avaliarão quais materiais (PA - *Polyamide*, PLA - *Polylactic Acid*, ABS - *Acrylonitrile Butadiene Styrene* - e outros plásticos) são mais adequados em termos de estabilidade/durabilidade para a confecção dos artefatos e pelos quais serão investigados os comportamentos/estruturas dos plásticos antes e após protocolos de higienização preconizados pela Santa Casa, com especial atenção a eventuais danos a sua matriz polimérica. (iii) Testes Microbiológicos: com a finalidade de análise das partes impressas em 3D dos EPIs, presumidamente, mais suscetíveis a formação de biofilmes em comparação a plásticos injetados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelagem e Impressão 3D

As atividades relacionadas ao desenvolvimento e fabricação digital dos equipamentos serão realizadas no Laboratório de Inovação, Prototipagem, Educação Criativa e Inclusiva (LIPECIN), que é protagonista no Espaço *Maker* do Centro de Inovação UFCSPA – Santa Casa. É um local de sinergia entre duas instituições que fomentam colisões bem-sucedidas entre profissionais de diferentes áreas do conhecimento para encontrar soluções viáveis nas esferas da Saúde e em outros campos do saber.

A etapa de modelagem e fatiamento dos protótipos médicos será realizada com o auxílio dos programas 3ds Max® e ZBrush®. Para isto, deve-se: (i) realizar a conversão de modelos CAD em arquivos .stl (Estereolitografia); (ii) garantir a calibração correta das 3D *printers* e (iii) efetuar a fabricação propriamente dita, pela qual camadas, de plástico aquecido, serão depositadas para criar objetos sólidos.

Para a consolidação da prototipagem dos modelos fabricados digitalmente os equipamentos utilizados serão: (A) Impressora 3D *Ultimaker 2+*, (B) Impressora 3D *Ultimaker 3 Extended*, (C) Impressora 3D *MoonRay DLP*; (D) Máquina de Corte a Laser e (E) Dezenas de Computadores com softwares de Modelagem e Fatiamento.

Amostra

Os voluntários serão selecionados por método de amostragem não probabilística e a amostra será selecionada por conveniência. A seleção dos participantes da pesquisa será realizada pelos gestores das referidas áreas por convite verbal.

Os protetores faciais disponíveis para teste serão distribuídos juntamente aos profissionais que prestam assistência nas áreas de emergência, Unidade de Internação (UI) e Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) do Pavilhão Pereira Filho (atualmente dedicadas ao atendimento de síndromes respiratórias), do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Os encaminhamentos necessários serão capitaneados pela Segurança do Trabalho (em relação dialógica com a Segurança Assistencial) do hospital para iniciarmos os testes dos referidos EPIs quando possível, considerando a premência das ações que objetivam atenuar as consequências da pandemia.

A amostra será selecionada de maneira representativa da população de profissionais da saúde que operam na linha de frente de manejo de pacientes e situações que envolvem riscos de contaminação por agentes patógenos. O número amostral foi estimado levando-se em conta estudos semelhantes que avaliaram a usabilidade de equipamentos de proteção (GUO et al., 2009), e equipamentos médicos (LILJEGREN, 2006), onde constatou-se que a amostra variou entre 10 e 80 indivíduos para validação dos dispositivos testados.

Sendo assim, o número amostral elencado para validação dos escudos faciais será de 400 unidades, o que irá garantir que a população testada será representativa.

Validação dos Escudos faciais

Os Escudos Faciais serão validados por testes de usabilidade realizados por colaboradores da ISCMPA, profissionais e residentes. Para isto, os voluntários receberão uma (1) unidade do Escudo Facial, e orientações para usar o equipamento durante seis (6) horas diárias (no mínimo) nas suas atividades hospitalares. Tão logo o profissional tenha completado 15 dias utilizando o EPI, com um intervalo de no máximo 2 dias sem uso, receberá o Formulário de Pesquisa para relato da percepção referente ao uso do dispositivo. O profissional que concordar em participar do estudo receberá o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com as informações sobre a pesquisa desenvolvida.

A avaliação da adesão, conforto e usabilidade dos EPIs pelos profissionais e residentes, será estabelecida utilizando como instrumento de coleta de dados um questionário *online* contendo 14 campos a serem preenchidos, contendo perguntas abertas e fechadas. O tempo médio para conclusão das perguntas será de aproximadamente 10 minutos. Transcorridos 15 dias da utilização do EPI, o voluntário receberá por e-mail um *link* para responder aos questionamentos utilizando o aplicativo *Google Forms* (Apêndice I).

As etapas iniciais da análise da situação de trabalho contemplam uma atitude de escuta do ergonomista em relação às verbalizações dos interlocutores, de maneira a explorar os dados e os fatos com os quais é confrontado (GUÉRIN et. al., 2001). Para tanto, os profissionais envolvidos na pesquisa serão entrevistados em relação à sensação subjetiva de conforto relacionada ao uso dos protetores faciais. Salienta-se que a participação dos profissionais na aludida pesquisa está condicionada à

concordância plena e à assinatura de termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

Os dados oriundos dos Questionários de Usabilidade serão quantificados e tabulados para posterior análise estatística (descritiva e multivariada), utilizando o *software SPSS (Statistical Package for Social Sciences)*. Os resultados serão utilizados para validação dos equipamentos e melhorias necessárias.

Ensaio Microbiológicos

Serão modelados (Software 3ds Max®) 120 corpos de prova para *Fused Filament Fabrication (FFF)* e 30 corpos de prova para *Digital Light Processing (DLP)*. Após a modelagem, ocorrerá a impressão usando as *3D Printers (FFF)* - Ultimaker® 3 e 2+ utilizando: (i) *PA (Polyamide)*, (ii) *PLA (Polylactic Acid)*, e (iii) *Copper3D PLACTIVE AN1 - Antibacterial PLA Filament*).

O fatiamento será realizado no *software CURA®* e a impressão dar-se-á com as dimensões: 1,0 cm X 2,0 cm X 1,0 mm (tamanho ideal para Microscopia Eletrônica de Varredura). Simultaneamente, os mesmos arquivos .stl (Estereolitografia) serão impressos com uma resina atóxica, inerte, com certo grau de transparência/translucidez e que possa ser esterilizável (SprintRay Surgical Guide 2), utilizando-se para isso a Moonray® DLP (Digital Light Processing).

A avaliação da formação de biofilme será investigada através de quantificação colorimétrica (cristal violeta), determinação de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL e microscopias eletrônica de varredura (MEV) e confocal. Serão utilizadas bactérias formadoras de biofilme incluindo: *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (modelos Gram negativos) e *Staphylococcus aureus* (modelo Gram positivo).

A formação de biofilme será avaliada usando microplacas de poliestireno de 6 poços com a inserção do corpo de prova nos poços. Serão adicionados meio triptona de soja ou BHI e suspensão bacteriana preparada em solução salina estéril em concentração adequada. As microplacas serão incubadas a 37°C por 24 h e, após esse período, o corpo de prova será coletado, lavado com solução salina estéril para retirada das células não-aderentes, e colocado em uma nova microplaca para a quantificação do biofilme pelo método do cristal violeta.

Para quantificação de UFC, os corpos de prova serão submetidos a banho ultrassônico para liberação do biofilme e, posteriormente, diluições seriadas serão semeadas em ágar triptona de soja e incubadas a 37°C por 24h. O crescimento bacteriano será monitorado pela medida da absorbância a 620 nm. Gentamicina e vancomicina serão utilizadas como controle do crescimento dos modelos Gram negativos e Gram positivo, respectivamente. Da mesma forma, a viabilidade das células no biofilme será avaliada por microscopia confocal a laser utilizando o corante LIVE/DEAD.

Nos ensaios de MEV, os corpos de prova serão fixados com glutaraldeído, desidratados com concentrações crescentes de acetona, submetidos ao ponto crítico com dióxido de carbono e metalizados com ouro para visualização em microscópio eletrônico no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para que o EPI desempenhe sua função primária de proteção do usuário, faz-se necessário acompanhar não somente a fabricação digital do objeto, mas também se a desinfecção está sendo realizada de maneira assertiva. Os participantes da pesquisa serão instruídos com os procedimentos de assepsia apropriados ao dispositivo. Para que estes processos de higienização sejam examinados, periodicamente, serão selecionadas, de forma aleatória, amostras de Escudos Faciais, utilizados pelos profissionais pertencentes ao estudo, para verificação do processo de desinfecção. Ensaios de resistência mecânica, estabilidade e tensegriedade

Os materiais estudados, neste projeto, serão caracterizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por meio de diferentes técnicas analíticas como, por exemplo, Espectroscopia por Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Termogravimétrica (ATG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Cromatografia Gasosa (CG), Difração de Raios X (DRX), Investigação do Comportamento Reológico em Brookfield (LVDV-II) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Aplicabilidade para o Sistema Único de Saúde (SUS)

Os Equipamentos de Proteção Individual são elementos chave para o Sistema de Saúde, e por isso, precisam passar por avaliações criteriosas de usabilidade. Para mensuração da aplicabilidade dos EPIs, um questionário estruturado será disponibilizado para trabalhadores de diferentes áreas hospitalares pertencentes a

grupos específicos, como auxiliares e técnicos (as) de enfermagem, enfermeiros (as), médicos (as) e fisioterapeutas.

As percepções referentes ao uso dos EPIs servirão como base de melhoria e adequação dos equipamentos, a fim de permitir uma eficiente usabilidade, concedendo qualidade de uso do dispositivo nos diversos ambientes hospitalares. É parte fundamental desta etapa que os profissionais sejam treinados adequadamente para utilização do equipamento de proteção. Estas capacitações serão desempenhadas por profissionais relacionados à área de Biossegurança, garantindo a segurança e eficiência do uso do Escudo Facial.

É primordial que os usuários validem a utilização do EPI e apontem as melhorias necessárias para o aperfeiçoamento do utensílio. A premissa com, para e por Profissionais da Saúde, principais beneficiários da confecção de EPIs e dispositivos médicos, é a maior motivação para o desenvolvimento deste projeto.

Democratização do Ensino/Capacitação em Modelagem

Planeja-se realizar o amplo compartilhamento dos arquivos, metodologias e resultados oriundos dos testes realizados para a Fabricação Digital dos modelos. A democratização do Ensino/Capacitação em Modelagem, Fatiamento, Impressão 3D e Corte a Laser será realizada com o auxílio de Webinars (videoconferências, gravadas ou ao vivo), para permitir a interação e o engajamento da audiência via chat.

Outra etapa relacionada a democratização dos achados pelo estudo, será o *upload* de todos os arquivos tanto para Corte a Laser quanto para impressão 3D na plataforma LIPECIN para Download gratuito, garantindo a *printability* e preservação dos aspectos visuais e físicos. Os arquivos (sem exceção) serão disponibilizados com uma documentação fácil e acessível (em português e inglês) explicando todos os parâmetros de Fabricação Digital.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO:

Os critérios de elegibilidade do estudo referem-se à população que será investigada e ao desenho do estudo. Portanto, como critérios de inclusão teremos: (i) profissionais atuantes nas Unidades de Internação, Unidade de Terapia Intensiva e Emergência do ISCMPA; (ii) estar atuante no atendimento de síndromes respiratórias. Os critérios de exclusão definidos serão: (i) afastamento do voluntário, das suas atividades hospitalares, por qualquer condição, de saúde alterada, que interrompa a utilização do EPI; (ii) afastamento do profissional por motivo de férias, impossibilitando que o tempo mínimo para utilização do Escudo Facial seja cumprido.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados oriundos dos Questionários de Usabilidade serão quantificados e tabulados para posterior análise estatística (descritiva e multivariada), utilizando o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*). Os resultados serão utilizados para validação dos equipamentos e melhorias necessárias.

ASPECTOS ÉTICOS

- (1) O presente projeto cumpre todos os preceitos éticos requisitados para estudos científicos realizados com seres humanos, como a cooperação voluntária, a privacidade dos participantes e a confidencialidade das informações.
- (2) A pesquisa é justificada cientificamente pois tem possibilidade concreta de responder as incertezas quanto: (1) a usabilidade/conforto/ergonomia/segurança de EPIs produzidos em Espaços de Fabricação Digital. Durante toda essa pandemia, como comunidades *maker* se engajaram fortemente para a produção de EPIs com impressão 3D, houve muita discussão sobre formas de esterilização adequadas para reutilização após potencial exposição ao vírus da Covid-19. Nesse sentido, a Prusa™ têm se esforçado bastante e está obtendo resultados reais de três laboratórios independentes (https://help.prusa3d.com/en/article/prusa-face-shield-disinfection_125457/#utc).
- (3) Apresenta fundamentação científica prévia, já que EPIs tem sido amplamente produzidos por Fabricação Digital no mundo todo, especialmente nesse cenário pandêmico;
- (4) Esses artefatos impressos tridimensionalmente e cortados a laser precisam ter seus parâmetros validados por Profissionais da Saúde. Sendo o escrutínio dos médicos (as)/enfermeiros (as) o único modo de se obter determinados conhecimentos;
- (5) Os benefícios superam riscos, pois estamos confeccionando os EPIs atendendo as normativas da ANVISA e, simultaneamente, escutando atentamente aos profissionais para melhorar aspectos de usabilidade/segurança/adesão;
- (6) Haverá um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aplicado aos indivíduos que receberão os Escudos Faciais, com explicação detalhada de todos os aspectos da pesquisa, incluindo riscos e incômodos, para que a anuência do sujeito seja livre de fraude, simulação ou erro, dependência, subordinação ou intimidação (BRASIL, 1996);
- (7) Serão asseguradas a privacidade e a confidencialidade, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas;

- (8) Serão proporcionados aos sujeitos da pesquisa os benefícios resultantes do projeto (ou seja, a garantia do desenvolvimento e produção de EPIs com a incorporação de todas as melhorias sugeridas pelos usuários);
- (9) Nosso estudo será descontinuado, exclusivamente, diante de eventuais razões que possam ser apresentadas pelo comitê que o aprovou;
- (10) É prevista indenização: cobertura material em reparação a dano comprovadamente causado pela pesquisa;
- (11) Há garantia de que o participante de nossa pesquisa terá direito à indenização em caso de eventuais danos comprovadamente decorrentes do presente estudo.

ORÇAMENTO

Tabela 1: orçamento detalhado dos insumos

Insumo	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
Filamento PLA	4	381,7	1526,8
Filamento PLA antibacteriano	1	487,32	487,32
Resina Biocompatível (1L)	1	4260	4260
Resina Autoclavável	1	3300	3300
Filamento PA 2.85 mm	2	235,83	471,66
Placas de PetG	10	280	2800
Placas de Silicone (2 x 100cm)	2	492	984
Ágar bacteriológico (500 g)	1	475	475
Ágar Triptona de Soja (500 g)	1	314	314
Alça estéril individual descartável 1 µL	10	16	160
Caldo Triptona de Soja (500g)	1	216	216
Cloreto de sódio (1 kg)	1	21	21
Cristal violeta (solução 1%)	3	22,5	67,5
Dimetilsulfóxido (DMSO) (1 L)	1	701	701
Falcon 15 mL (50 unidades)	10	24	240
Falcon 50 mL (50 unidades)	10	33	330
Gentamicina (250 mg)	1	469	469
Microplaca 6 poços estéril de fundo chato	20	9,9	198
Microplaca 96 poços estéril de fundo chato	100	7,86	786
Placa de Petri 90x15 mm estéril	500	0,38	190
Ponteiras 1000 µL (1000 unidades)	10	28,5	285
Ponteiras 200 µL (1000 unidades)	10	12	120
Tubo de eppendorf 2,0 mL	10	97	970
Vancomicina (250 mg)	1	971	971
Cacodilato de sódio (100g)	1	1490	1490
Glutaraldeído	1	500	500
Stubs (100 unidades)	1	395	395
Caixa para stubs (unidade)	5	45	225
TOTAL			R\$ 22.953,00

CRONOGRAMA

Tabela 1: Cronograma de atividades anuais

Atividades	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4
Modelagem e Fatiamento	X	X	X	X
Impressão 3D e Corte a Laser	X	X	X	X
Ensaio Microbiológicos		X	X	X
Avaliação Mecânica		X	X	X
Avaliação da usabilidade dos EPIs			X	X

REFERÊNCIAS:

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 356, DE 23 DE MARÇO DE 2020**. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-356-de-23-de-marco-de-2020-249317437>. Acesso em: 13 abr. 2020.

BRASIL. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos**. Bioética 1996; 4(2):15-25.

DIMITROV, Dimitar; SCHREVE, Kristiaan; DE BEER, Neal. Advances in three-dimensional printing—state of the art and future perspectives. **Rapid Prototyping Journal**, 2006.

GAN, Wee Hoe; LIM, John Wah; DAVID, K. O. H. Preventing intra-hospital infection and transmission of COVID-19 in healthcare workers. **Safety and Health at Work**, 2020.

GEISLER, Matthias; XIA, Younan. Patterning: Principles and some new developments. **Advanced Materials**, v. 16, n. 15, p. 1249-1269, 2004.

GU, Yexin et al. Inkjet printed antibiotic-and calcium-eluting bioresorbable nanocomposite micropatterns for orthopaedic implants. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 424-431, 2012.

GUO, Yue-Ping et al. Evaluation of different PPE ensembles in terms of sensation, usability, satisfaction and preference. **J Fiber Bioeng Informatics**, v. 2, p. 126-136, 2009.

GUÉRIN, François; KERGUELEN, Alain; LAVILLE, Antoine; DANIELLOU, François; DURAFFOURG, Jacques. **Compreender o trabalho para transformá-lo: A prática da ergonomia**. São Paulo: Blucher, 2001.

HARARI, Yuval Noah. **21 lições para o século 21**. Editora Companhia das Letras, 2018.

KRAEMER, Moritz UG et al. The effect of human mobility and control measures on the COVID-19 epidemic in China. **Science**, 2020.

KUMAR, C. Ganesh; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International journal of food microbiology**, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998.

LANCET, The. COVID-19: protecting health-care workers. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10228, p. 922, 2020.

LI, DeXia et al. PLA/F68/dexamethasone implants prepared by hot-melt extrusion for controlled release of anti-inflammatory drug to implantable medical devices: I. Preparation, characterization and hydrolytic degradation study. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 365-372, 2013.

LILJEGREN, Erik. Usability in a medical technology context assessment of methods for usability evaluation of medical equipment. **International Journal of Industrial Ergonomics**, v. 36, n. 4, p. 345-352, 2006.

LIN, Ray Junhao; LEE, Tau Hong; LYE, David Chien Boon. From SARS to COVID-19: the Singapore journey. **Medical Journal of Australia**, 2020.

LING, Moi Lin et al. APSIC guidelines for disinfection and sterilization of instruments in health care facilities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 25, 2018.

MARKS, P. et al. 3D printing: second industrial revolution is under way (special report). **New Sci**, v. 2823, p. 17-20, 2011.

NEGREIROS, Mateus de Oliveira et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Baccharis psiadioides* essential oil against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* strains. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 12, p. 3272-3279, 2016.

PAPERT, Seymour. **The children's machine: Rethinking school in the age of the computer**. BasicBooks, 10 East 53rd St., New York, NY 10022-5299, 1993.

SANDASI, M1; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. **Letters in applied microbiology**, v. 50, n. 1, p. 30-35, 2010.

SANDLER, Niklas et al. Towards fabrication of 3D printed medical devices to prevent biofilm formation. **International journal of pharmaceutics**, v. 459, n. 1-2, p. 62-64, 2014.

SAÚDE, Ministério da. **Painel Coronavírus**. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 16 abr. 2020.

SYMES, Mark D. et al. Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis. **Nature chemistry**, v. 4, n. 5, p. 349-354, 2012.

SPRING, Jake; FONSECA, Pedro. **Brazil likely has 12 times more coronavirus cases than official count, study finds**. Disponível em: <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-brazil-cases/brazil-likely-has-12-times-more-coronavirus-cases-than-official-count-study-finds-idUSKCN21V1X1>. Acesso em: 13 abr. 2020.

TRAN, Phat L. et al. An organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheters in vivo. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 972-978, 2012.

APÊNDICE I – QUESTÕES ABORDADAS NO RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO DO USO DAS FACE SHIELDS (ESCUDOS FACIAIS)

Seção 1 de 7

RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO FACE SHIELDS - MODELO PANTERA

Equipamentos de proteção individual (EPIs) são itens utilizados por uma pessoa durante o desempenho de uma atividade na qual exista algum tipo de risco, a fim de minimizar ou anular potencial perigo.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o uso do novo modelo de Escudo Facial que está em fase de testes.

Seção 2 de 7

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

O TCLE está disponível no link:

<https://drive.google.com/open?id=15fi5XbtcKDXotE5fcYU8uo3eCqrySjGl>

Seção 3 de 7

IDENTIFICAÇÃO I

Gênero:

- Feminino
- Masculino

Qual o seu cargo ou função?

- Auxiliar de enfermagem
- Técnico (a) de enfermagem
- Enfermeiro (a)
- Médico (a)
- Residente

- Pesquisador
- Estudante
- Outro

Seção 4 de 7

ESPECIALIDADE MÉDICO (A)

Qual é a sua especialidade?

Seção 5 de 7

OUTRO CARGA OU FUNÇÃO

Qual é o seu cargo ou função?

Seção 6 de 7

IDENTIFICAÇÃO II

Qual é o seu setor (unidade) de trabalho?

- Supervisão
- Clínica médica
- Centro cirúrgico
- UTI
- Ambulatório
- Emergência
- Laboratório
- Atendimento domiciliar

Tempo de serviço na Unidade de trabalho?

- Menos de 1 ano
- De 1 a 3 anos
- De 4 a 6 anos

- De 7 a 10 anos
- Mais de 10 anos

Qual é a sua faixa etária?

- 18 a 29 anos
- 30 a 39 anos
- 40 a 49 anos
- 50 anos ou mais

Já sofreu algum acidente de trabalho?

- Sim
- Não

Seção 7 de 7

FACE SHIELD = ESCUDO FACIAL = PROTETOR FACIAL

USABILIDADE

Usabilidade significa facilidade e comodidade no uso dos equipamentos, e se relaciona ao conforto e eficiência no momento da sua utilização.

Como você classifica o Escudo Facial em termos de usabilidade (facilidade e conforto)?

- Ótimo
- Bom
- Regular
- Ruim
- Péssimo

Você sentiu alguma dor associada ao uso do Escudo Facial, durante e/ou após utilização?

- Sim
- Não

Como você classifica a praticidade quanto ao uso do Escudo Facial (colocação e remoção do equipamento)?

- Excelente
- Boa
- Média
- Pouca
- Nenhuma

Como você considera a facilidade para limpar/higienizar o Escudo Facial?

- Excelente
- Boa
- Média
- Pouca
- Nenhuma

Como você classifica a aparência/design do equipamento?

- Excelente
- Boa
- Média
- Pouca
- Nenhuma

Qual a sua percepção com relação a segurança proporcionada pelo Escudo Facial?

- Extremamente protegido
- Protegido
- Parcialmente protegido
- Desprotegido
- Extremamente desprotegido

APÊNDICE II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA UTILIZAÇÃO DE ESCUDOS FACIAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a),

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo intitulado **“Fabricação digital de EPIs e dispositivos médicos validados por ensaios mecânicos e microbiológicos com análises de falhas e garantia de usabilidade”**, desenvolvido pelo Laboratório de Inovação, Prototipagem, Educação Criativa e Inclusiva (LIPECIN).

O objetivo do estudo é fabricar Digitalmente Equipamentos de Proteção Individual prioritários para uso em Serviços de Saúde, em virtude da emergência relacionada a COVID-19, garantindo a qualidade, a segurança e o conforto dos produtos em conformidade com as normas da Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA. A finalidade desta pesquisa é produzir um EPI que além de estar nas normas regulamentadoras dos órgãos de saúde, também seja aceito pelos usuários, pela segurança e conforto.

Além disso, o indivíduo que participar do estudo será beneficiado com capacitação para manejo e higienização do dispositivo. Outro ponto é que utilizar o Protetor Facial exclui a necessidade de óculos de proteção, além de aumentar a área protegida, da face e laterais, durante os procedimentos geradores de aerossóis ou com risco de contato com secreções. Seu uso não substitui a máscara (o correto é usá-la com o Protetor Facial por cima).

Para participar da pesquisa solicitamos que você utilize o Escudo Facial nas suas práticas hospitalares. O EPI deve ser usado por no mínimo, 6 horas diariamente durante 15 dias, sendo usado de maneira contínua ao longo dos dias, com um intervalo de no máximo 2 dias sem utilizar o equipamento. Quando você finalizar o tempo de utilização do Escudo Facial, vai receber um formulário virtual (*Google Forms*) por e-mail, com perguntas referentes ao EPI que você utilizou. O tempo gasto para responder às perguntas será em torno de 10 minutos. Os resultados desse estudo poderão ser usados para fins científicos/tecnológicos, mas você não será identificado, sendo garantido o seu sigilo e privacidade.

Os riscos envolvidos nesta pesquisa podem incluir surgimento de dores ou desconforto local, devido ao contato do equipamento com a pele, durante ou após a utilização do Escudo Facial. Caso isto aconteça, você deverá interromper o uso do Protetor, e informar (imediatamente) o fato ao pesquisador. Você receberá assistência

médica pela Medicina do Trabalho da Santa Casa. Apesar dos riscos relacionados a participação serem mínimos, também nos comprometemos em garantir indenização diante de eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa.

Sua contribuição neste estudo é muito importante, mas a decisão em participar deve ser sua. Você tem a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo, devendo apenas contatar o responsável pelo estudo. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Não há despesas pessoais, nem compensação financeira para o(a) participante em qualquer fase do estudo.

Ao aceitar participar você declara que recebeu dados sobre o Equipamento de Proteção Individual (Escudo Facial) e concorda em participar da pesquisa. Você também confirma que entendeu os riscos e benefícios, e que pode optar pelo “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, pode dizer “não” e desistir sem nenhum prejuízo. Você receberá uma via deste documento assinado pela pesquisadora responsável pela pesquisa.

Com quem você pode esclarecer suas dúvidas?

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em pesquisa da UFCSPA na rua Sarmiento Leite, 245, sala 407, Centro Histórico – Porto Alegre, CEP 90050-170, e-mail: cep@ufcspa.edu.br. Dúvidas a respeito da pesquisa e dos seus resultados poderão ser respondidas pela profa. Gisele Orlandi Introíni, pelo telefone (51) 3303 – 8812 (Espaço *Maker* do Centro de Inovação UFCSPA-Santa Casa) de segunda-feira à sexta-feira, das 9h às 17h, ou por e-mail: giseleoi@ufcspa.edu.br.

Porto Alegre, ____ de _____ de ____.

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Participante

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**O PAPEL DOS NEUROESTEROIDES NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS
CAUSADOS POR FÁRMACOS, CONDIÇÃO AMBIENTAL E LINHAGENS
TIPO-DEPRESSIVAS EM RATOS**

Felipe Borges Almeida

Projeto de doutorado a ser desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde: Farmacologia e Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena M. T. Barros

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício S. Nin

Porto Alegre

2020

RESUMO

A depressão é um transtorno altamente prevalente e incapacitante, sendo causada por fatores internos (ou individuais) e externos (ou ambientais). Diversos modelos animais de depressão que mimetizam tais fatores têm sido empregados a fim de estudar sua etiologia, tendo foco em agentes estressores. No entanto, também é importante investigar os efeitos de condições ambientais positivas sobre comportamentos e marcadores neuroquímicos relacionadas à depressão. Alguns destes marcadores são neuroesteroides como a alopregnanolona e a progesterona, que têm seus níveis diminuídos em modelos de depressão baseados em estresse. Ainda não se sabe se uma predisposição individual ao transtorno ou estímulos ambientais positivos estão relacionadas com seus níveis. Adicionalmente, o estudo de terapias farmacológicas com o controle destes fatores pode ajudar a explicar a razão da alta variabilidade de resposta a estas intervenções. Portanto, este projeto tem o objetivo de investigar, em ratos, o efeito da susceptibilidade individual e da condição ambiental sobre comportamentos tipo-depressivos, níveis cerebrais de neuroesteroides, e eficácia de farmacoterapias.

Serão desenvolvidas duas linhagens de ratos com perfis de comportamentos tipo-depressivos altos e baixos através da seleção comportamental e cruzamentos por três gerações (F0 – F3). Ratos da F3 receberão tratamentos anti- (fluoxetina) e pró-depressivos (finasterida) para verificar o efeito do fármaco de acordo com a condição à qual pertencem. Além disso, ratos *wild-type* serão alocados em condições ambientais distintas (p. ex.: padrão vs. Isolamento vs. enriquecido). Os níveis cerebrais de neuroesteroides e expressão de proteínas neuroesteroidogênicas serão quantificados a fim de determinar o papel destas substâncias nos efeitos comportamentais observados. Espera-se que ao final deste trabalho seja possível demonstrar uma interação entre a predisposição individual à depressão e a eficácia dos tratamentos, preferencialmente sendo modulada por alterações nos níveis cerebrais de neuroesteroides. A publicação de artigos em revistas de alto impacto e a produção de um modelo genético de depressão serão as produções mais relevantes deste projeto.

Palavras-chave: depressão, enriquecimento ambiental, genética, neuroesteroides

ABSTRACT

Depression is a highly prevalent and debilitating disorder, being caused by internal (or individual) and external (or environmental) factors. Several models of depression that mimic such factors have been used to elucidate its etiology, focusing on stressor agents. However, it is also important to investigate the effects of positive environmental conditions on behaviors and neurochemical markers related to depression. Some of these markers are neurosteroids such as allopregnanolone and progesterone, which have lower levels in stress-based animal models of depression. It is still unknown whether an individual predisposition to the disorder or positive environmental stimuli are related to its levels. Additionally, the study of pharmacological therapies controlling these factors may help explain the reason for the high variability in the response to these interventions. Therefore, this project has the aim to investigate, in rats, the effect of individual susceptibility and of environmental condition on depressive-like behaviors, brain neurosteroid levels, and efficacy of pharmacotherapies.

Two lines of rats with high and low depressive-like behavior profile will be developed through behavioral selection and breeding for three generations (F0 – F3). Rats from F3 will receive anti- (fluoxetine) and prodepressant (finasteride) treatments to verify the effect of the drug depending on the condition to which they belong. In addition, wild-type rats will be submitted to distinct environmental conditions (e.g.: standard vs. isolated vs. enriched). Brain neurosteroid levels and expression of neurosteroidogenic enzymes will be quantified to determine the role of these substances on behavioral effects observed. It is expected that by the end of this work it will be possible to demonstrate an interaction between the individual predisposition to depression and treatment efficacy, preferably being modulated by changes in brain levels of neurosteroids. Published papers in high-impact journals and the production of a genetic model of depression will be the most relevant products of this project.

Keywords: depression, environmental enrichment, genetics, neurosteroid

1 INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um transtorno comum no mundo inteiro, com mais de 300 milhões de pessoas afetadas. Pode ser uma condição de saúde grave, especialmente quando se apresenta de forma prolongada e com intensidade moderada a grave. Pode causar muito sofrimento e empobrecimento da funcionalidade no estudo, no trabalho ou na família da pessoa afetada (REHM; SHIELD, 2019). Apesar de este transtorno ser estudado há muito tempo, a determinação de sua etiologia permanece incompleta. O que está claro é que a depressão é causada pela interação de um conjunto complexo de fatores, que podem ser primariamente divididos em externos (ambientais) e internos (individuais) (NABESHIMA; KIM, 2013).

Os fatores ambientais ou externos são aqueles mais classicamente relacionados com o aparecimento do transtorno, consistindo majoritariamente de situações aversivas que ocasionam estresse ao indivíduo. Tais estressores podem ocorrer de incontáveis diferentes maneiras, incluindo eventos como luto, trauma, abandono, perda de status social, dificuldades financeiras, abuso de drogas, entre outros (ROY et al., 2014). O oposto também pode ocorrer, onde fatores ambientais atuam como protetores que diminuem a probabilidade do desenvolvimento do transtorno depressivo (COLMAN et al., 2014). Já os fatores internos são predominantemente determinados pela composição genética de cada indivíduo, que por mecanismos ainda desconhecidos conferem maior ou menor susceptibilidade a desenvolver o transtorno. Isto também significa que há um aspecto de herdabilidade na depressão, que se aproxima de 40% (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). Com relação aos fatores externos, muita atenção tem sido dada a eventos estressores que aumentam o risco de desenvolver depressão. Mas é importante também estudar a influência de condições positivas que podem trazer proteção em indivíduos suscetíveis.

A fim de determinar os mecanismos através dos quais estes dois conjuntos de fatores interagem entre si e como os mesmos influenciam na eficácia de terapias farmacológicas, é necessário investigar aspectos neuroquímicos subjacentes, o que é particularmente difícil em estudos clínicos. Desta forma, o uso de modelos animais torna-se uma ferramenta muito útil para compreender melhor este fenômeno.

1.2 Modelos animais de depressão

Existem diversos modelos animais de depressão, sendo que os mais clássicos se baseiam na exposição dos animais a situações aversivas que mimetizam fatores externos levando a um estado tipo-depressivo. Alguns destes são o isolamento social, estresse crônico imprevisível, bulbectomia olfatória, desamparo aprendido, entre outros (CZÉH et al., 2016). Também é usualmente empregado um teste comportamental que visa mensurar comportamentos tipo-depressivos, como o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (FST, do inglês '*forced swim test*') ou a preferência pelo consumo de sacarose. O FST é um teste amplamente utilizado originalmente proposto por Porsolt em 1977, no qual antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade apresentado por roedores quando forçados a nadar em um tanque inescapável (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). O teste de preferência à sacarose é comumente aplicado para medir comportamento tipo-anedonia, caracterizado pela diminuição do consumo de uma solução doce que é naturalmente preferida pelos ratos sobre água.

Na direção oposta, alguns estudos têm investigado os efeitos de intervenções positivas sobre comportamentos tipo-depressivos, em especial a inserção dos animais em um ambiente enriquecido. Ratos expostos a este tipo de alojamento apresentam um menor tempo de imobilidade no FST, por exemplo (ASHOKAN et al., 2018; BRENES; RODRÍGUEZ; FORNAGUERA, 2008; POSSAMAI et al., 2015). O ambiente enriquecido também reverteu uma diminuição na preferência pela sacarose em um modelo transgênico de camundongos (DONG; XUE; SAKATA, 2018).

Outros trabalhos buscaram desenvolver modelos que mimetizam a influência genética da depressão, ao cruzar seletivamente animais que apresentam naturalmente comportamentos tipo-depressivos detectados em testes comportamentais (ALMEIDA et al., 2018; BRUNELLI et al., 1997; GERSNER et al., 2014; WEISS; CIERPIAL; WEST, 1998; WILL; AIRD; REDEI, 2003). Estes modelos possibilitam o estudo da ação de fármacos em indivíduos com diferentes perfis genéticos relevantes à condição de interesse, abrindo caminho para o desenvolvimento de farmacoterapias individualizadas.

Tabela 1. Modelos animais de depressão gerados por seleção e cruzamentos

Publicação original	Espécie	TC	# gerações	Denominação	n F0	# casais
BRUNELLI et al., 1997	ratos (N:NIH)	USV	5	High Low	N.I.	N.I.
WEISS; CIERPIAL; WEST, 1998	ratos (Sprague-Dawley)	FST	18	SwHi SwLo	84 ♂ 42 ♀	9 SwHi 6 SwLo
WILL; AIRD; REDEI, 2003	ratos (Wistar-Kyoto)	FST	7	WMI WLI	N.I.	2–4 WMI 2–4 WLI
EL YACOUBI et al., 2003	camundongos (CD1)	TST	14	H/Rouen NH/Rouen	92 ♂ 58 ♀	2 DRL 2 MRL
GERSNER et al., 2014	ratos (Sprague-Dawley)	FST; SPT; HCL	10	DRL MRL	16 ♂ 16 ♀	2–3 DRL 2–3 MRL
ALMEIDA et al., 2018	ratos (Wistar)	FST	3	HI LI	50 ♂ 50 ♀	8 HI 8 LI

Legenda: TC: teste(s) comportamental(is); LH: desamparo aprendido; USV: vocalização ultrassônica após separação maternal; FST: teste do nado forçado; TST: teste de suspensão de cauda; SPT: teste da preferência pela sacarose; HCL: locomoção na gaiola de moradia; N.I.: não informado ou insuficientemente detalhado. Adaptada de ALMEIDA (2017).

1.3 Neuroesteroides

Neuroesteroides são substâncias endógenas sintetizadas no sistema nervoso a partir do colesterol ou hormônios esteroides circulantes (BAULIEU; ROBEL; SCHUMACHER, 2001), sendo que diversas linhas de evidência têm dado suporte para o seu papel na depressão. O tratamento com inibidores da síntese de neuroesteroides (p. ex.: finasterida) está associada ao desenvolvimento de depressão em homens (WELK et al., 2017), e em mulheres há uma correlação inversa entre os níveis circulantes de progesterona e o risco de aparecimento de humor depressivo (FRYE et al., 2012). Acredita-se que estes achados estejam relacionados com a capacidade de alguns neuroesteroides de modular atividades neuronais, sendo assim também incluídos no grupo dos esteroides neuroativos (PAUL; PURDY, 1992).

A alopregnanolona (outras denominações: 3 α ,5 α -tetrahidroprogesterona; 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona) é um dos metabólitos da progesterona que têm sido

amplamente estudado e se mostrado um dos neuroesteroides neuroativos com maior papel na modulação da depressão (ZORUMSKI et al., 2013). Estudos clínicos e pré-clínicos já demonstraram que seus níveis estão reduzidos na depressão, e que os mesmos são aumentados pelo tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) como a fluoxetina (revisado em SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014). Trabalhos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram um efeito região-específico da infusão intracerebral de alopregnanolona sobre comportamentos tipo-depressivos e hemisfério-específico sobre parâmetros neuroquímicos (ALMEIDA et al., 2019; NIN et al., 2008, 2012). Além disso, a infusão intracerebroventricular de alopregnanolona reduziu o tempo de imobilidade no FST em um modelo hereditário de depressão desenvolvido em nosso laboratório (ALMEIDA et al., 2018).

1.4 *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)

O principal mecanismo de ação através do qual os neuroesteroides exercem seus efeitos comportamentais tem sido classicamente atribuído à sua modulação do sistema GABAérgico. Na qualidade de moduladores alostéricos positivos do receptor GABA_A, os neuroesteroides facilitam a neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA e que pode ser parte importante do processo fisiopatológico da depressão (ZORUMSKI et al., 2013). No entanto, associações entre níveis de neuroesteroides e marcadores neurotróficos tem levantado a hipótese de que este seja um mecanismo direta ou indiretamente relacionado ao efeito antidepressivo de diversos neuroesteroides, sobretudo a alopregnanolona (ALMEIDA et al., 2019; EVANS et al., 2012; NAERT et al., 2007; NIN et al., 2011; PISU et al., 2016).

De fato, modelos animais de depressão estão associados com uma diminuição em diferentes marcadores de neurotrofia, particularmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) (SAMUELS; HEN, 2011). Além disso, esta diminuição nos níveis de BDNF (particularmente no hipocampo) é acompanhada por menores níveis de alopregnanolona após protocolos como o isolamento social (EVANS et al., 2012; PISU et al., 2016). A administração exógena de alopregnanolona ou fármacos que estimulam a biossíntese de neuroesteroides restaura estes níveis de BDNF para o normal (EVANS et al., 2012; LEE et al., 2018), além de aumentar sua expressão em ratos não submetidos a um protocolo de estresse (ALMEIDA et al., 2019; NAERT et

al., 2007). Por outro lado, a exposição a um ambiente enriquecido está associada a um robusto efeito neurogênico mediado principalmente pelo BDNF, conforme evidenciado por uma meta-análise de estudos pré-clínicos publicada recentemente (BARROS et al., 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da alta oferta de fármacos antidepressivos no mercado, sua eficácia quando comparada com placebo em ensaios clínicos randomizados permanece baixa (TURNER; TELL, 2008). Portanto, fica claro que a transmissão monoaminérgica, sobre a qual virtualmente todos estes antidepressivos atuam, não é o único sistema implicado na psicobiologia da depressão, evidenciando que outros alvos devem ser buscados para o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Isto evidencia a necessidade de desenvolver uma sólida pesquisa de base com o objetivo de compreender a fundamentação neurobiológica deste transtorno. Este trabalho possibilitará um estudo aprofundado da interação entre fatores individuais, biológicos e ambientais, que contribuem para o desenvolvimento da depressão, mas isolados e controlados de forma que seus efeitos podem ser confiavelmente mensurados.

Além disso, será possível determinar se os efeitos isolados e em conjunto destes fatores tem relação com a regulação de neuroesteroides no sistema nervoso central, que tem sido amplamente implicada na neurobiologia da depressão. Já foi demonstrado que a administração exógena de alopregnanolona é capaz de amenizar a acentuada manifestação comportamental tipo-depressiva em animais cruzados seletivamente para este fenótipo (ALMEIDA et al., 2018). Resta elucidar se ratos pertencentes a esta linhagem apresentam um déficit nos níveis cerebrais de alopregnanolona, o que estabeleceria um novo pilar neurobiológico para a depressão. Finalmente, o modelo a ser desenvolvido neste projeto servirá como plataforma para que outros estudos possam ser realizados fazendo uso desta ferramenta, permitindo inclusive o estudo de marcadores neuroquímicos além dos neuroesteroides.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da interação de fatores individuais e ambientais em um modelo geracional de depressão associado ao enriquecimento ambiental sobre o comportamento, eficácia farmacológica e alterações neuroquímicas de ratos, com foco sobre o papel dos neuroesteroides sobre a modulação destes parâmetros.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar o efeito da condição da moradia padrão, enriquecida, ou em isolamento social sobre os níveis cerebrais de neuroesteroides e BDNF;
- b) promover a reprodução de linhagens de animais predispostos a apresentar comportamentos tipo-depressivos;
- c) avaliar o efeito comportamental de intervenções farmacológicas com ação sobre a neuroesteroidogênese (fluoxetina em dose baixa e finasterida) em cada uma das linhagens produzidas;
- d) determinar se as manifestações comportamentais das duas linhagens estão relacionadas com os níveis de neuroesteroides em diferentes regiões cerebrais e se a exposição a um ambiente enriquecido é capaz de modificar estes parâmetros;
- e) avaliar a eficácia do tratamento com fluoxetina em indivíduos com diferente susceptibilidade interna para depressão e tipo de ambiente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

Este projeto será dividido em três partes experimentais, que estão descritos nesta seção. Os procedimentos metodológicos específicos estão descritos nas seções subsequentes e referenciados dentro desta.

4.1.1 Experimento 1

Aos 75 dias de idade, ratos machos e fêmeas serão submetidos aos testes comportamentais de depressão (Seção 4.4) e serão separados de acordo com seus perfis de comportamento tipo-depressivo conforme score detalhado na Seção 4.5. Os ratos com alta susceptibilidade (linhagem suscetível, LS) e baixa susceptibilidade (linhagem resiliente, LR) serão cruzados dentro de seus grupos, dando origem a uma nova geração de animais (F1) composta por duas linhagens. Este procedimento (seleção comportamental e cruzamento) será repetido mais duas vezes, dando origem às gerações F2 e F3 (Seção 4.6). Juntamente ao FST e teste de preferência à sacarose para a seleção dos indivíduos com alta e baixa susceptibilidade, os animais serão submetidos ao teste do campo aberto (Seção 4.4.3) para a obtenção de dados comportamentais adicionais.

4.1.2 Experimento 2

Após o primeiro procedimento de seleção comportamental do experimento 1, uma nova amostra de ratos com 40 dias de idade ($n = 48 \text{ ♂} + 48 \text{ ♀}$) será obtida e os animais serão submetidos a condições de moradia distintas (especificadas na seção 4.3): isolamento social ($n = 16 \text{ ♂} + 16 \text{ ♀}$), ambiente enriquecido ($n = 16 \text{ ♂} + 16 \text{ ♀}$) ou moradia padrão ($n = 16 \text{ ♂} + 16 \text{ ♀}$). Ao fim da intervenção, os ratos serão avaliados comportamentalmente e eutanasiados (Seção 4.8.1), tendo o nível de neuroesteroides (Seção 4.8.2) e expressão gênica (Seção 4.8.3) determinados nas regiões cerebrais de interesse.

4.1.3 Experimento 3

O experimento final deste projeto dará sequência ao Experimento 1, no qual as linhagens LS e LR serão geradas. Ratos machos da F3 ($n_{\text{LS}} = 60$; $n_{\text{LR}} = 60$) serão igualmente divididos em dois grupos relativos à condição ambiental (padrão ou

enriquecido, por 35 dias). Posteriormente, serão subdivididos em mais três subgrupos de tratamento com veículo (salina 0,9%), fluoxetina (1 mg/kg) e finasterida (100 mg/kg). Após a avaliação no FST, os animais serão eutanasiados e seus cérebros serão removidos para as análises neuroquímicas.

4.2 Animais

Ao longo deste projeto, um total de 156 ratos Wistar *wild-type* (PND 40, 150–170 g) serão obtidos do biotério da UFCSPA. Destes, 30 machos e 30 fêmeas irão compor a população inicial (F0) do experimento 1, que dará origem às linhagens desenvolvidas neste trabalho. O *n* alvo de para seleção comportamental em cada geração será de 60 animais para em cada linhagem, sendo que metade deste número será de machos e metade será de fêmeas (detalhes na Seção 4.6). Os demais 96 animais *wild-type* obtidos diretamente do biotério serão utilizados no experimento 2 (Seção 4.1.2).

4.3 Condições de Alojamento

4.3.1 Ambiente padrão

Como condição padrão, os animais serão mantidos em uma sala sob ciclo constante claro-escuro de 12 h (luzes ligadas das 07:00 às 19:00) com umidade e temperatura (22 ± 2 °C) controladas e livre acesso a água e comida. Os animais serão mantidos nas condições acima em grupos de 2 a 3 em caixas plásticas padrão (40 × 33 × 18 cm).

4.3.2 Isolamento social

Quando em isolamento, os animais serão mantidos sozinhos em caixas menores opacas, de forma a inviabilizar o contato visual com ratos na mesma sala. As condições de luz, umidade e temperatura, bem como de acesso à água e comida serão as mesmas de animais em ambiente padrão. Os animais em isolamento serão manipulados o menor número de vezes e pelo menor tempo possível, a fim de evitar a quebra do paradigma do isolamento social.

4.3.3 Ambiente enriquecido

Os animais serão mantidos em grupos de 8 a 10 animais em caixas espaçosas (80 × 50 × 40 cm) de polipropileno (espessura de 4 mm), com dois andares (20 cm de altura, plataforma com 48 × 20 cm) que contam com escada, uma roda de exercício e outros objetos que serão trocados e/ou rearranjados frequentemente. Este meio proporciona um ambiente de complexa interação social, atividade física e estímulo da memória (FREESE et al., 2018).

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Teste do Nado Forçado (FST)

Será utilizado o modelo proposto por (DETKE; LUCKI, 1995) com pequenas modificações (FERIGOLO et al., 1998). Brevemente, os animais serão colocados individualmente em um tanque cilíndrico com 25 cm de diâmetro e paredes transparentes preenchido com água com temperatura de 25 ± 1 °C em profundidade de 30 cm. O protocolo contará com duas seções separadas por 24 h: treino (15 min) e teste (5 min), que será gravado e posteriormente analisado por observador treinado e cego para os grupos de tratamento e condição através do software Behavsoft. Serão contabilizados tempo de imobilidade e mobilidade (nadar e escalar), bem como a latência para imobilidade e o número de *head shakes*.

4.4.2 Teste de Preferência pela Sacarose

Os ratos terão acesso por 48 h a duas garrafas, uma contendo uma solução de sacarose (32% m/v) e outra contendo água da torneira. Os ratos serão colocados em gaiolas individuais imediatamente antes do início da sessão. As posições das duas garrafas serão invertidas a cada 12 h para controlar a preferência pelo posicionamento. As garrafas serão pesadas antes e depois da sessão e o consumo de líquido (solução de sacarose ou água) será calculado pela seguinte fórmula: $100\% \times \text{consumo da solução de sacarose (g)} / \text{consumo total de líquidos (g)}$.

4.4.3 Teste do Campo Aberto

Cada animal será colocado no centro de uma arena com 90 cm de diâmetro e cercada de paredes com 36 cm de altura, cujo piso está subdividido em 25 partes (9 centrais e 16 periféricas). A atividade locomotora será contabilizada quando o animal colocar todas as quatro patas em um novo quadrante. Outros comportamentos,

como levantar, grooming e tempos de permanência no centro e na periferia também serão contabilizados. Após 5 minutos, o animal será retirado e o aparato será limpo com álcool 70%.

4.5 Seleção Comportamental

Ao longo do Experimento 1, os animais serão selecionados de acordo com suas manifestações comportamentais mais ou menos tipo-depressivas. Um escore (adaptado de GERSNER et al., 2014) será utilizado para fazer a caracterização comportamental. Primeiramente, cada rato receberá um escore de 0 a 1 em cada um dos dois testes comportamentais utilizados para a caracterização (FST e teste de preferência à sacarose).

Em cada teste comportamental, cada rato (em sua respectiva i^{a} posição dentre o n total da população) terá seu escore bruto (E_i) convertido para um escore normalizado (NE_i) com os valores mínimos [Mín()] e máximos [Máx()] brutos, de acordo com a fórmula abaixo:

$$NE_i = \frac{E_i + \text{Mín}(E_1 \dots E_n)}{\text{Máx}(E_1 \dots E_n) - \text{Mín}(E_1 \dots E_n)}$$

Assim que o escore para cada teste for calculado, a média aritmética simples dos dois escores será calculada para cada rato e os mesmos serão ranqueados de acordo com seus escores de susceptibilidade.

4.6 Cruzamentos

Estes procedimentos serão executados de maneira similar a trabalho prévio desenvolvido em nosso laboratório (ALMEIDA et al., 2018). Os animais da população inicial (F0) que tiverem escores superiores ou inferiores a aproximadamente um desvio padrão da média (n previsto: 7 animais LS e 7 animais LR em cada sexo) serão alocados para os grupos de alta e baixa susceptibilidade, respectivamente. Eles serão acasalados dentro de seus grupos (um macho e uma fêmea serão mantidos por 7–10 dias em uma caixa padrão) e as gerações posteriores serão submetidas ao mesmo procedimento até a F3. Os animais selecionados na F3 serão cruzados uma segunda vez para dar origem ao n necessário para o Experimento 3 (Seção 4.1.3). A partir da F1, a seleção

comportamental será unicaudal (somente serão selecionados animais mais suscetíveis na LS e somente animais menos suscetíveis na LR), mantendo a seleção de 7 casais em cada linhagem. As ninhadas serão padronizadas para 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). A consanguinidade será evitada ao cruzar animais com menor grau de parentesco possível de acordo com sistema esquematizado no Quadro 1 abaixo (MAJEROWICZ, 2008), e o cruzamento entre ratos da mesma ninhada não será realizado.

Fêmea da gaiola nº	Macho da gaiola nº	Número próxima geração
1	2	1
3	4	2
5	6	3
7	8	4
2	1	5
4	3	6
6	5	7
8	7	8

Quadro 1. Esquema para acasalamentos em cada população de ratos.

4.7 Drogas e Tratamentos

Serão administrados fluoxetina nas doses de 1 mg/kg (dose com ação estimulante da biossíntese de esteroides) (PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2009) e 10 mg/kg (dose com ação serotoninérgica; controle positivo), bem como finasterida na dose de 100 mg/kg (BECKLEY; FINN, 2007). As drogas serão dissolvidas em solução salina a 0,9% e administradas via intraperitoneal (i.p.) 24, 5 e 1 h antes da sessão de teste do FST, de acordo com o protocolo original de Porsolt (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

4.8 Análises neuroquímicas

4.8.1 Eutanásia e preparação do tecido cerebral

Os animais do Experimento 1 que não forem selecionados para os cruzamentos — e que portanto não terão seus cérebros destinados para análises neuroquímicas — serão eutanasiados através da aplicação via i.p. de dose letal do anestésico cetamina (180 mg/kg) combinado com xilazina (30 mg/kg) (FAVORETTO;

SEABRA; OLIVATO, 2019), sendo que a morte será confirmada pela apneia prolongada, ausência de batimentos cardíacos e pulsação e presença de mucosas pálidas (CONCEA, 2018). Os demais animais serão eutanasiados por decapitação 1 dia após a sessão de teste do FST. Seus encéfalos serão imediatamente removidos e cada estrutura cerebral (hipocampo, estriado e córtex frontal) será separada em seu hemisfério direito e esquerdo, que serão analisados separadamente. Metade dos cérebros de cada grupo serão aleatoriamente alocados para a quantificação de neuroesteroides, enquanto a outra metade será utilizada para a verificação da expressão gênica de proteínas.

4.8.2 Determinação do conteúdo cerebral de neuroesteroides

As amostras de tecido serão extraídas com o uso de 1 mL de tampão de extração por 100 mg de tecido e então homogeneizadas a frio no tampão de lise contendo NaCl (137 mM), NP40 (1%), glicerol (10%), Tris-HCl (20 mM; pH 8.0), leupeptina (1 µg/mL), PMSF (1 mM), aprotinina (10 µg/mL) e vanadato de sódio (0,5 mM). Os homogenatos serão centrifugados a 13.000 g por 30 min a 4 °C e os sobrenadantes serão coletados. A alopregnanolona será quantificada pelo kit DetectX® Allopregnanolone Immunoassay (LI et al., 2017) e a progesterona será quantificada com o uso do kit DetectX® Progesterone Immunoassay (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, EUA). Seis amostras por grupo serão utilizadas para determinar os valores de OD em 450 nm em um aparelho leitor de ELISA.

4.8.3 Análise da expressão de mRNA

O RNA total será extraído de homogenatos cerebrais com o kit TRIzol® conforme instruções do fabricante. Uma alíquota de 3 µg do RNA extraído será transcrita reversamente para cDNA usando o kit SuperScript III® conforme instruções do fabricante. O cDNA obtido será analisado através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (*real time quantitative PCR*; qPCR) para análise da expressão dos genes de interesse. Será utilizado o reagente Power SYBR Green I PCR Master Mix® e as análises serão realizadas no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System®.

Será analisada a expressão de duas enzimas neuroesteroidogênicas e da proteína neurotrófica BDNF. Os primers para 5α-redutase tipo 1 e 3α-hidroxiesteroide desidrogenase serão os mesmos utilizados por (MUNETSUNA et

al., 2011). Os primers de BDNF serão os mesmos utilizados em (ALMEIDA et al., 2019). O gene referência será o GAPDH (forward 5'-AACGACCCCTTCATTGACCTC-3'; reverse 5'-CCTTGACTGTGCCGTTGAACT-3'). Os valores de C_t serão processados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todos os reagentes são oriundos da Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, EUA).

4.9 Análise Estatística

As análises estatísticas inferenciais serão realizadas através do programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA). Será utilizada ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey. O número de vias dependerá da quantidade de fatores em estudo, que podem ser condição ambiental, linhagem, tratamento ou hemisfério. Também será realizada correlação de Pearson para verificar se há associação entre comportamentos tipo-depressivos e níveis cerebrais de neuroesteroides. Em caso de falha na normalidade, serão utilizados os testes não-paramétricos correspondentes. Diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS ESPERADOS E PRODUTOS

De maneira geral, é esperado que este trabalho possa demonstrar que os comportamentos tipo-depressivos apresentados pelas duas linhagens produzidas estejam relacionados à biossíntese cerebral de neuroesteroides, sendo que a exposição a um ambiente enriquecido seja capaz de modular estes níveis.

No experimento 1, é esperado que as duas linhagens produzidas apresentem perfis comportamentais diferenciados de acordo com a separação realizada após os cruzamentos. Também levanta-se a hipótese de que estes comportamentos linhagem-dependentes tenham relação com os níveis cerebrais de neuroesteroides, enzimas neuroesteroidogênicas e de BDNF

No experimento 2, espera-se que o isolamento social reduza os níveis cerebrais de neuroesteroides quando comparado com o alojamento em grupo padrão, conforme já determinado na literatura (revisado em PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2009). Esperamos também poder demonstrar um aumento de neuroesteroides no cérebro dos animais submetidos ao ambiente enriquecido, com determinadas regiões apresentando perfis diferenciados, o que ainda é desconhecido.

No experimento 3, nossa expectativa é de que o tratamento com fluoxetina seja mais eficaz em ratos de alta susceptibilidade, conforme sugerido em trabalho anterior do nosso laboratório (ALMEIDA et al., 2018). Espera-se também que a finasterida não seja capaz de aumentar os comportamentos tipo-depressivos em ratos de resilientes, demonstrando que a regulação na neuroesteroidogênese tem papel importante na neurobiologia deste modelo.

Estes experimentos deve dar origem a dois artigos científicos a serem publicados em periódico internacional indexado, com classificação QUALIS A1 ou A2. Além da produção científica, este trabalho propiciará a criação de duas linhagens de ratos predispostos a apresentar perfis de comportamentos tipo-depressivos diferenciados. É de nossa intenção, se for do interesse da Universidade, deixar este modelo como patrimônio institucional a ser mantido no biotério da UFCSPA, oferecendo uma útil ferramenta que outros laboratórios e grupos de pesquisa possam utilizar para investigar outros aspectos relacionados à dimensão genética/hereditária da depressão.

6 ORÇAMENTO

Item	Quantidade	Custo Unitário (R\$)	Custo Total (R\$)
Material já adquirido:			
Xilazina (20 mg/mL)	10 (10 mL)	20,00	200,00
Cetamina (50 mg/mL)	10 (10 mL)	17,00	170,00
TRIzol®	100 mL	521,00	521,00
SuperScript III®	1	2.450,00	2.450,00
Placas para qPCR	15 (96 poços)	95,00	1.425,00
SYBR Green I®	2 (5 mL)	1.415,88	2.830,00
Filmes ópticos para qPCR	10	94,21	942,10
Ponteiras P1000	200	1,07	214,00
Ponteiras P100	200	0,97	194,00
Ponteiras P10	500	0,70	350,00
Tubos 1,5 mL	500	0,18	90,00
Tubos 0,2 mL	200	0,30	60,00
Custo do material já adquirido:			R\$ 9.446,10
Material a adquirir			
Fluoxetina	600 mg (1 cx)	30,00	30,00
Finasterida	300 mg (5 cx)	50,00	250,00
DetectX® Alopregnanolona	5 (96 poços)	1.500,00	7.500,00
DetectX® Progesterona	5 (96 poços)	1.200,00	6.000,00
Primers	6 (3 pares)	80,00	480,00
Custo total:			R\$ 14.260,00

Os materiais já disponíveis foram adquiridos em projetos anteriores e encontram-se à disposição para uso neste projeto. Os reagentes e kits ainda a serem adquiridos serão comprados com auxílio da taxa de bancada da professora orientadora do projeto (HMTB, Pesquisadora 1B CNPQ), além de verba oriunda de edital de internacionalização 06/2018 da FAPERGS (nº 19/2551-0000665-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. B. **Efeitos da alopregnanolona sobre o comportamento tipo depressivo de ratos com perfis distintos de imobilidade no nado forçado.** Dissertação de Mestrado—Porto Alegre: UFCSPA, 2017.

ALMEIDA, F. B. et al. The effect of intracerebroventricular alopregnanolone on depressive-like behaviors of rats selectively bred for high and low immobility in the forced swim test. **Physiology & Behavior**, v. 194, p. 246–251, out. 2018.

ALMEIDA, F. B. et al. Hemisphere-dependent Changes in mRNA Expression of GABAA Receptor Subunits and BDNF after Intra-prefrontal Cortex Allopregnanolone Infusion in Rats. **Neuroscience**, v. 397, p. 56–66, jan. 2019.

ASHOKAN, A. et al. Housing environment influences stress-related hippocampal substrates and depression-like behavior. **Brain Research**, v. 1683, p. 78–85, mar. 2018.

BARROS, W. et al. Can the effects of environmental enrichment modulate BDNF expression in hippocampal plasticity? A systematic review of animal studies. **Synapse**, v. 73, n. 8, p. e22103, ago. 2019.

BAULIEU, E. E.; ROBEL, P.; SCHUMACHER, M. Neurosteroids: Beginning of the story. In: **International Review of Neurobiology**. [s.l.] Elsevier, 2001. v. 46p. 1–32.

BECKLEY, E. H.; FINN, D. A. Inhibition of progesterone metabolism mimics the effect of progesterone withdrawal on forced swim test immobility. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 4, p. 412–419, out. 2007.

BRENES, J. C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, n. 1, p. 85–93, 1 mar. 2008.

BRUNELLI, S. A. et al. Five generations of selective breeding for ultrasonic vocalization (USV) responses in N:NIH strain rats. **Developmental psychobiology**, 4. v. 31, p. 255–265, dez. 1997.

COLMAN, I. et al. Protective factors against depression during the transition from adolescence to adulthood: Findings from a national Canadian cohort. **Preventive Medicine**, v. 65, p. 28–32, 1 ago. 2014.

CONCEA. Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15.02.2018. . 22 fev. 2018, Sec. I, p. 5.

CZÉH, B. et al. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, jan. 2016.

DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 43–46, dez. 1995.

DONG, B. E.; XUE, Y.; SAKATA, K. The effect of enriched environment across ages: A study of anhedonia and BDNF gene induction. **Genes, Brain and Behavior**, v. 17, n. 8, p. e12485, 2018.

EVANS, J. et al. Allopregnanolone regulates neurogenesis and depressive/anxiety-like behaviour in a social isolation rodent model of chronic stress. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1315–1326, dez. 2012.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. **Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa**, 2019. Disponível em: <https://www.unifesp.br/reitoria/ceua/images/C/Guia_eutan%C3%A1sia_vers%C3%A3o_final_042019.pdf>. Acesso em: 3 fev. 2020

FERIGOLO, M. et al. Comparison of Behavioral Effects of Moclobemide and Deprenyl During Forced Swimming. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 60, n. 2, p. 431–437, jun. 1998.

FREESE, L. et al. Environmental enrichment reduces cocaine neurotoxicity during cocaine-conditioned place preference in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 169, p. 10–15, jun. 2018.

FRYE, C. A. et al. Effects and Mechanisms of 3 α ,5 α -THP on Emotion, Motivation, and Reward Functions Involving Pregnane Xenobiotic Receptor. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, 2012.

GERSNER, R. et al. Inherited behaviors, BDNF expression and response to treatment in a novel multifactorial rat model for depression. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 06, p. 945–955, jun. 2014.

LEE, B. et al. Effects of Epigallocatechin Gallate on Behavioral and Cognitive Impairments, Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Dysfunction, and Alternations in Hippocampal BDNF Expression Under Single Prolonged Stress. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 10, p. 979–989, out. 2018.

LI, L. et al. Overexpression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) in the hippocampal dentate gyrus produced anxiolytic and antidepressant-like behavioural effects. **Neuropharmacology**, v. 125, p. 117–128, out. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios e biossegurança**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

MUNETSUNA, E. et al. Environmental enrichment alters gene expression of steroidogenic enzymes in the rat hippocampus. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 28–32, mar. 2011.

NABESHIMA, T.; KIM, H.-C. Involvement of Genetic and Environmental Factors in the Onset of Depression. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 4, p. 235, 2013.

NAERT, G. et al. Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8–10, p. 1062–1078, set. 2007.

NIN, M. S. et al. Antidepressant effect and changes of GABA_A receptor $\gamma 2$ subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 477–485, jul. 2008.

NIN, M. S. et al. Neurosteroids Reduce Social Isolation-Induced Behavioral Deficits: A Proposed Link with Neurosteroid-Mediated Upregulation of BDNF Expression. **Frontiers in Endocrinology**, v. 2, p. 73, 21 nov. 2011.

NIN, M. S. et al. The effect of intra-nucleus accumbens administration of allopregnanolone on δ and $\gamma 2$ GABA_A receptor subunit mRNA expression in the hippocampus and on depressive-like and grooming behaviors in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 2, p. 359–366, dez. 2012.

PAUL, S. M.; PURDY, R. H. Neuroactive steroids. **The FASEB Journal**, v. 6, n. 6, p. 2311–2322, 1 mar. 1992.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 24–30, fev. 2009.

PISU, M. G. et al. Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. **Neuroscience**, v. 320, p. 172–182, abr. 2016.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, abr. 1977.

POSSAMAI, F. et al. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 58, p. 15–21, abr. 2015.

REHM, J.; SHIELD, K. D. Global Burden of Disease and the Impact of Mental and Addictive Disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 2, p. 10, fev. 2019.

ROY, M. et al. Molecular and genetic basis of depression. **Journal of Genetics**, v. 93, n. 3, p. 879–892, dez. 2014.

SAMUELS, B. A.; HEN, R. Neurogenesis and affective disorders: Neurogenesis and affective disorders. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1152–1159, mar. 2011.

SCHÜLE, C.; NOTHDURFTER, C.; RUPPRECHT, R. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. **Progress in Neurobiology**, v. 113, p. 79–87, fev. 2014.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552–1562, out. 2000.

TURNER, E. H.; TELL, R. A. Selective Publication of Antidepressant Trials and Its Influence on Apparent Efficacy. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 3, p. 252–260, 2008.

WEISS, J. M.; CIERPIAL, M. A.; WEST, C. H. K. Selective Breeding of Rats for High and Low Motor Activity in a Swim Test: Toward a New Animal Model of Depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 1. v. 61, p. 49–66, 1998.

WELK, B. et al. Association of Suicidality and Depression With 5 α -Reductase Inhibitors. **JAMA Internal Medicine**, v. 177, n. 5, p. 683, 1 maio 2017.

WILL, C. C.; AIRD, F.; REDEI, E. E. Selectively bred Wistar–Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 11, p. 925–932, nov. 2003.

ZORUMSKI, C. F. et al. Neurosteroids, stress and depression: Potential therapeutic opportunities. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 1, p. 109–122, jan. 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANÁLISE TRANSLACIONAL DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA E DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA FIBROSE
PULMONAR**

Orientadora: Dra Katya Vianna Rigatto

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2022

RESUMO

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma condição progressiva e fibrosante dos pulmões sem causa definida e com sobrevida média de apenas três anos. A etiologia e o mecanismo fisiopatológico da doença são bastante complexos, o que impossibilita o desenvolvimento de alternativas terapêuticas eficazes. Sabe-se que a Angiotensina II (Ang II), principal peptídeo vasoativo do sistema renina angiotensina (SRA), está envolvido na patogênese da fibrose pulmonar (FP). Nesse contexto, é possível acreditar que o desequilíbrio do SRA, a favor do eixo fibrosante (Ang II/AT1), esteja associado ao desenvolvimento e comprometimento funcional dos pacientes com FPI. A identificação dos peptídeos Angiotensina 1-7 e Alamandina (ALA) permitiram a descoberta de um eixo contra regulatório e protetor do SRA. Esses achados trazem novas interpretações e exigem um novo olhar sobre a participação desse sistema no desenvolvimento da FP. Nosso grupo vem demonstrando a importância do equilíbrio do SRA em humanos e experimentalmente. Mostramos que, em plasma de pacientes com FPI, a ALA está reduzida 365% quando comparada a pacientes não fibróticos. Além disso, o desequilíbrio a favor do eixo fibrosante também foi observado no tecido pulmonar de pacientes com FPI. Adicionalmente, dados ainda não publicados do nosso grupo comprovam que a administração subcutânea de ALA, em modelo experimental de FP, é capaz de atenuar o estabelecimento da fibrose e manter os parâmetros respiratórios saudáveis. Com base nos nossos dados inéditos e promissores, a presente proposta tem como objetivo dar seguimento às investigações sobre a participação dos eixos do SRA na FPI. Os dados desse estudo são de grande interesse clínico pois contribuirá para elucidar os mecanismos envolvidos nesta doença ainda sem cura e de alto custo para o sistema de saúde. Da mesma forma, incentivará o desenvolvimento de terapias que melhorem a qualidade de vida dos pacientes, reduzindo o número de internações e de transplantes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fibrose pulmonar idiopática

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é considerada uma doença crônica não infecciosa, com etiologia e mecanismo fisiológico ainda não totalmente esclarecido. A FPI pode ter um curso lento e progressivo ou de forma rápida, resultando em uma sobrevida média de apenas três anos após o diagnóstico^{1,2}. Atualmente, a hipótese mais aceita para a patogênese da doença é a fibroproliferação e o acúmulo excessivo de matriz

extracelular. Tal evento no tecido pulmonar pode ocorrer durante o reparo de lesões epiteliais alveolares, com a liberação de mediadores com atividade pró-inflamatória³.

Devido a característica crônica e as limitações terapêuticas, a FPI está no grupo de doenças pulmonares intersticiais que causam maior mortalidade e morbidade respiratória em todo o mundo. Além disso, os dados epidemiológicos mostram que a prevalência da FPI é maior entre homens a partir da sexta década de vida⁴.

O acometimento respiratório é manifestado clinicamente através de dispneia, fadiga, tosse seca e maior esforço da musculatura respiratória e esquelética⁵. Diante disto, o comprometimento funcional destes pacientes reflete na redução significativa da qualidade de vida⁶⁻⁸.

1.2 Relação entre o sistema renina-angiotensina e fibrose pulmonar idiopática

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um conjunto de peptídeos, enzimas e receptores que exercem um papel importante e eficiente na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão arterial⁹. Classicamente, a ativação do SRA ocorre pela conversão do angiotensinogênio no peptídeo angiotensina I (Ang I). Por ter fraca ação vasoconstritora, Ang I é metabolizada no principal peptídeo vasoativo do SRA, angiotensina II (Ang II), através da enzima conversora de angiotensina (ECA)^{10,11}.

A Ang II possui funções fisiológicas mediadas por dois receptores acoplados à proteína G, receptor de angiotensina I (AT1) e receptor de angiotensina II (AT2)⁹. Desses, o AT1 é o receptor envolvido nos efeitos fisiológicos da Ang II, como vasoconstrição, ativação do sistema nervoso simpático e secreção de aldosterona¹². No entanto, quando ativado de forma exagerada, estudos mostram que a via AngII/ AT1 pode induzir efeitos deletérios ao tecido como inflamação, estresse oxidativo e fibrose¹³.

Por outro lado, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) pode induzir um novo eixo através da clivagem da Ang II em angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)]¹⁴, a qual se liga ao receptor Mas¹⁵. A Ang 1-7 é conhecida por desencadear efeitos antagônicos ao eixo clássico da Ang II como vasodilatação, anti-inflamatório e antifibrótico¹⁶. Dessa forma, ativa vias protetoras e altamente desejáveis em pacientes com FPI¹⁷.

O papel antifibrótico da Ang-(1-7) foi demonstrado nos tecidos cardíacos, pulmonares e do sistema nervo central^{18,19}. Além disso, a descoberta da alamandina (ALA), outro peptídeo com ações opostas e protetoras à Ang II despertou ainda mais o interesse sobre a associação desse sistema com a fibrose pulmonar²⁰.

Conforme Lautner *et al.* (2013)²⁰, a ALA pode ser gerada pela ação catalítica da ECA2 sobre a angiotensina A ou derivada da descarboxilação da Ang-(1-7). As ações da ALA, embora semelhantes às da Ang-(1-7), ocorrem especificamente através do receptor MrgD.²¹ Apesar de recentemente descoberta, a via ALA/MrgD já foi descrita como protetora em diversas condições como antioxidante, anti-inflamatória e antifibrótica²²⁻²⁴

Considerando que os pulmões são um importante sítio de ativação do SRA¹³, a associação entre a patogênese da FPI e o desequilíbrio entre os eixos do SRA Ang II/AT1 *versus* Ang-(1-7)/Mas e/ou ALA/MrgD vem sendo discutida na literatura. Desta forma, os autores²⁵ acreditam que a ativação do eixo da ECA2, associado ao exercício, pode representar melhoras significativas na redução da FP.

Segundo estudos em modelos animais, os antagonistas da Ang II exercem um efeito que atenua o desenvolvimento da fibrose pulmonar e desempenha um poderoso papel sobre a fibrogênese²⁶. Isso sugere que peptídeos que antagonizam os efeitos da Ang II, como a ALA, possam ter um papel importante na manutenção da saúde desses pacientes.

De fato, nosso grupo já demonstrou que a ALA está 365% menor no plasma de pacientes com FPI do que em pacientes controle²⁷. Além disso, mostramos um desequilíbrio, a favor do eixo fibrosante, diretamente no tecido pulmonar de pacientes com FPI²⁸. Raupp *et al.* (2020)²⁸ também observaram que a expressão do receptor AT1 estava correlacionado negativamente com parâmetros respiratórios importantes.

Nesse contexto e, considerando o caráter translacional do nosso laboratório, nosso grupo de pesquisa está investigando paralelamente o efeito da administração da ALA em modelo experimental de fibrose pulmonar (FP). Dados já aceitos para publicação demonstraram um promissor efeito preventivo da ALA em ratos induzidos por bleomicina. Observamos que a ALA é capaz de reduzir o desenvolvimento da FP, bem como manter os parâmetros funcionais iguais aos animais saudáveis.

Em conjunto, os dados apontam para a relevância da continuidade desse projeto. Avaliações plasmáticas e teciduais no mesmo paciente são de extrema importância para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na FPI. Além disso, estudos detalhados sobre as possíveis vias influenciadas pela ALA irão contribuir para essa compreensão.

2 JUSTIFICATIVA

A FPI é uma doença crônica que envolve o comprometimento funcional pulmonar, debilitando o paciente e dificultando as suas atividades diárias. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos em saúde, inúmeras estratégias vêm sendo investigadas e utilizadas visando o retardo na progressão da doença e a melhora da qualidade de vida destes pacientes.

Com base nos achados do nosso grupo até o momento, acreditamos que o desequilíbrio do SRA está envolvido diretamente no comprometimento respiratório dos pacientes com FPI. Nesse contexto, nossa proposta pretende contribuir com os dados já descritos e aperfeiçoar a compreensão do envolvimento do SRA com a FPI. Também pretendemos demonstrar que, mais importante do que inibir o eixo fibrosante do SRA, seja estimular o eixo protetor.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Descrever a participação dos eixos Ang II/AT1 *versus* Ang-(1-7)/Mas e ALA/Mrgd do sistema renina angiotensina em pacientes com fibrose pulmonar idiopática e investigar o papel protetor da administração da ALA no modelo experimental induzido por bleomicina.

3.2 Específicos

- Avaliar a relação entre a expressão dos peptídeos (ECA, AngII, AT1, AT2, ECA2, Ang-(1-7), Mas, Alamandina e MrgD) no tecido pulmonar e plasma dos pacientes com e sem FPI.
- Associar as concentrações plasmáticas com o grau de comprometimento funcional dos pacientes com FPI;
- Correlacionar os dados espirométricos com a expressão tecidual dos componentes do SRA no grupo FPI.
- Associar a concentração plasmática e a expressão tecidual dos componentes do SRA com o grau de fibrose liberado pelo patologista do hospital.

- Avaliar o efeito da administração de ALA em ratos induzidos por bleomicina nos parâmetros inflamatórios e oxidativos.
- Determinar e associar as concentrações plasmáticas dos componentes do SRA com o comprometimento funcional dos ratos.

4 MÉTODO

4.1 Delineamento do estudo em humanos

Estudo do tipo caso controle.

4.2 Local da realização do estudo

As amostras serão obtidas na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (SCMPA), nos Hospitais Dom Vicente Scherer (HDVS) e Pavilhão Pereira Filho (PPF). Os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Translacional em parceria com o Laboratório de Espectrometria de Massa, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

4.3 População em estudo

Pacientes com diagnóstico de FPI submetidos ao transplante de pulmão (grupo FPI casos) e pacientes com diagnóstico de carcinoma brônquico, submetidos à ressecção pulmonar como tratamento (grupo controle). Todos os pacientes serão recrutados pela equipe médica do Serviço de Cirurgia Torácica e de Transplante Pulmonar do HDVS e PPF e comunicado à equipe de pesquisa.

Critérios de inclusão de para o grupo com FPI (casos): Pacientes com FPI diagnosticada através de teste anatomopatológico compatíveis com a doença, que apresentem ou não hipertensão portal (HP) e idade superior a 18 anos.

Para o grupo controle os critérios de inclusão serão: Indivíduos sem diagnóstico de FPI e HP, submetidos a ressecção pulmonar para o tratamento de carcinoma brônquico e com idade superior a 18 anos. Preferencialmente serão pareados de acordo com idade e sexo semelhante ao grupo com FPI.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos serão: Paciente com distúrbio clínico que comprometa sua participação ou conclusão neste estudo; pacientes com diagnóstico de insuficiência cardíaca e paciente que faça uso de antibióticos, inibidores da

enzima conversora da angiotensina (ECA); beta bloqueadores e bloqueadores do receptor de angiotensina.

O cálculo do tamanho amostral foi estimado com base em dados da literatura¹⁹. Considerando uma diferença de 120% na Ang-(1-7)/Alamandina, um erro tipo I de no máximo 5% ($\alpha=0.05$) e um poder de 80% ($b=0.2$). Assim, o número amostral previsto será de 24 indivíduos. Sendo 12 pacientes do grupo com FPI e 12 pacientes para o grupo controle.

4.4 Coleta das amostras

A coleta das amostras biológicas (sangue e tecido pulmonar) será realizada pela médica responsável no centro cirúrgico do HDVS para o grupo FPI e no centro cirúrgico do PPF para o grupo controle e entregue para os pesquisadores. Serão coletados 2mL de sangue o qual será transferido para um tubo BD Vacuette® EDTA contendo coquetel inibidor de protease (Complete™, comprimidos de coquetel inibidor de mini-protease Roche®-Alemanha). O sangue será centrifugado por 10 minutos, 3.500 rpm a 4°C logo após a coleta, na UFCSPA. O plasma será aliquoteado e congelado a -80°C para posterior análise.

O fragmento pulmonar coletado do grupo FPI será de 1cm³ do pulmão retirado no momento do transplante, o qual será acondicionado em um tubo Eppendorf e imerso de forma imediata em nitrogênio líquido. Após, será armazenado no freezer -80°C, para futura análise por meio da técnica de *Western-blot*. Para o grupo controle, a amostra de tecido será retirada das bordas, na margem distal da peça cirúrgica, local com características semelhantes a um pulmão sadio, não tendo nenhum impacto para o paciente. Os demais procedimentos serão da mesma forma que dos pacientes FPI.

Os dados espirométricos serão coletados do prontuário do paciente, conforme prévia autorização.

4.5 Participação dos peptídeos do sistema renina angiotensina - Western-blot

A expressão proteica da ECA, da ECA2 e dos receptores AT1, AT2, Mas e MrgD será realizada por meio da técnica de *Western-blot*. As amostras serão descongeladas e em seguida serão homogeneizadas com o auxílio de um tampão.

4.7 Investigação da concentração plasmática dos peptídeos

A metodologia utilizada nesse estudo está sendo desenvolvida e validada em

parceria com o Laboratório de Espectrometria de Massa. A técnica utilizada será cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography).

4.8 Correlações moleculares *versus* comprometimento funcional

Todos os dados clínicos utilizados para as associações serão coletados a partir do prontuário do paciente e realizadas pela equipe de pesquisa no Laboratório de Fisiologia Translacional da UFCSPA.

Metodologia em ratos

4.9 Animais

Todos os procedimentos de indução e coleta das amostras biológicas já são realizados no Laboratório de Fisiologia Translacional.

Para indução da FP, sob efeito anestésico, será instilado sulfato de bleomicina (Biosintética, São Paulo, Brasil - dose de 1,5U diluído em 0,2ml de solução fisiológica) pela via orofaríngea. O tratamento será realizado com Alamandina (50µg/kg; obtida do Tocris Bioscience - Bristol, UK) por infusão subcutânea por mini-bombas (50ul/hora; ALZET Osmotic Pump-DURECT Corporation) a partir do 9º dia após a indução e seguirá durante 15 dias.

Serão utilizados 60 animais distribuídos em 4 grupos de 15 animais cada: 1- Grupo Controle CO (animais saudáveis, submetidos aos procedimentos utilizados para indução e tratamento, recebendo apenas solução salina 0,9%); 2- Grupo AL (animais saudáveis, submetidos ao procedimento de indução com solução salina e tratamento com Alamandina); 3- Grupo BLM (animais induzidos à FP por Bleomicina, e submetidos ao procedimento de tratamento recebendo apenas solução salina); 4- Grupo BLEO + ALA (animais induzidos à FP por Bleomicina e tratados com Alamandina).

Após os 15 dias de tratamento, todos os animais serão anestesiados e serão realizadas avaliações hemodinâmicas e de função pulmonar (pressão arterial e mecânica ventilatória). Logo após, ainda sob anestesia, serão coletadas amostras de sangue e os animais serão mortos por sobredose anestésica, seguida de perfuração do diafragma e coleta de pulmões e coração, assim como demais amostras teciduais para posteriores análises bioquímicas e histológicas.

4.10 Avaliação da produção de TGF- β 1

Será utilizado kit de ELISA (R&D Systems) para medir a concentração de TGF- β 1 no tecido pulmonar. É possível avaliar a concentração de TGF- β 1 por densidade óptica a 540 nm com o comprimento de onda de correção ajustado para 570 nm em leitor de placas de ELISA.

4.11 Análise de citocinas inflamatórias e parâmetros oxidantes

As técnicas serão realizadas no tecido pulmonar, conforme orientação dos fabricantes.

4.12 Investigação da concentração plasmática dos peptídeos

A técnica utilizada será a mesma já descrita para os procedimentos em humanos. E para as análises em animais, será coletado o sangue, sob anestesia, logo após as análises hemodinâmicas e de função pulmonar, diretamente da carótida.

4.13 Análise estatística

A análise estatística dos dados será realizada pelo programa SPSS versão 21.0. A normalidade dos dados será verificada por Shapiro-Wilk. A análise paramétrica dos dados será realizada usando análise de variância (ANOVA) unilateral ou bidirecional seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Para os dados com distribuição não normal, será utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunn. Será utilizada a correlação de Pearson para verificar se existe associação desses parâmetros com os demais resultados. Os resultados serão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Valores de $P \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

5 Considerações bioéticas

Esta pesquisa já está aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA de acordo com a emenda CAAE N°: 69947517.2.0000.5345, parecer N° 3657105. O estudo em animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (protocolo 749/21).

O desenvolvimento desta pesquisa seguirá todas as normas e diretrizes éticas atendendo a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12. Antes da inclusão do sujeito ao estudo, o paciente escolhido, será informado da natureza e do objetivo do estudo e assinará um documento de consentimento livre e esclarecido.

6 Orçamento

Todos os equipamentos, insumos e reagentes necessários para a execução do projeto encontram-se disponíveis no Laboratório de Fisiologia Translacional da UFCSPA.

Material	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Anticorpo Angiotensinogênio (SAB5700748)	1	R\$ 2.280,00	R\$ 2.280,00
Anticorpo AT1 (SAB3500209)	1	R\$ 3.454,00	R\$ 3.454,00
Anticorpo AT2 (SAB3500098)	1	R\$ 3.128,00	R\$ 3.128,00
Anticorpo ECA (SAB4301112)	1	R\$ 1.675,00	R\$ 1.675,00
Anticorpo ECA2 (SAB3500346)	1	R\$ 3.454,00	R\$ 3.454,00
Anticorpo Mas (AV51197)	1	R\$ 2.386,00	R\$ 2.386,00
Anticorpo MrgD (ab155099)	1	R\$ 2.435,91	R\$ 2.435,91
Anticorpo secundário	2	R\$ 1.200,00	R\$ 2.400,00
Angiotensinogênio (A2562)	1	R\$ 3.534,00	R\$ 3.534,00
Renina (SCP0236)	1	R\$ 1.536,00	R\$ 1.536,00
Angiotensina I (A9650)	1	R\$ 816,00	R\$ 816,00
Angiotensina II (A9525)	1	R\$ 514,00	R\$ 514,00
Angiotensina A (SML1373)	1	R\$ 593,00	R\$ 593,00
Angiotensina 1-7 (A9202)	1	R\$ 1.771,00	R\$ 1.771,00
Alamandina (SML1374)	1	R\$ 2.393,00	R\$ 2.393,00
Frasco de EDTA (com 100)	1	R\$ 53,90	R\$ 53,90
Seringa 3 ml	24	R\$ 0,80	R\$ 19,20
MrgD (APREST78135)	1	R\$ 1.301,00	R\$ 1.301,00
ECA (SAE0075)	1	R\$ 1.181,00	R\$ 1.181,00
ECA2 (AS-60757)	1	R\$ 2.970,00	R\$ 2.970,00
Inibidores enzimáticos	1	R\$ 946,00	R\$ 946,00
TOTAL		R\$ 37.622,61	R\$ 38.841,01

7 Cronograma

	1º Sem. 2022	2º Sem. 2022	1º Sem. 2023	2º Sem. 2023	1º Sem. 2024	2º Sem. 2024	1º Sem. 2025	2º Sem. 2025	1º Sem. 2026
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Compra de material dos insumos	X								
Treinamento dos procedimentos	X								
Coleta de material biológico	X	X	X	X	X	X			
Análise plasmática dos peptídeos						X			
Execução da técnica de Western Blot						X			
Tabulação dos dados e análise dos resultados							X		
Correlação dos dados							X		
Análise estatística parcial dos resultados							X	X	
Submissão de resumos científicos para Congresso								X	X
Análise estatística final dos resultados								X	X

Início: 01/03/2022 e Término: 31/03/2026

8 RESULTADOS ESPERADOS

Acredita-se que com este projeto possamos contribuir para elucidar e confirmar a os mecanismos envolvidos na FPI, da mesma forma, como a ALA é capaz de atenuar o estabelecimento da fibrose e manter uma melhor qualidade de vida nestes pacientes com FPI.

REFERÊNCIAS

1. Funke-Chambour M, Geiser T. Idiopathic pulmonary fibrosis: The turning point is now! Swiss Med Wkly. 2015;145(May):1–13.
2. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(6):788–824.
3. Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. Orphanet J Rare Dis. 2008;3(1):1–15.
4. Baddini-Martinez J, Baldi BG, da Costa CH, Jezler S, Lima MS, Rufino R. Update on diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. J Bras Pneumol. 2015;41(5):454–66.
5. Eaton T, Young P, Milne D, Wells AU. Six-minute walk, maximal exercise tests: Reproducibility in fibrotic interstitial pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171(10):1150–7.
6. Collard HR, King TE, Bartelson BB, Vourlekis JS, Schwarz MI, Brown KK.

- Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(5):538–42.
7. Harris-Eze AO, Sridhar G, Clemens RE, Zintel TA, Gallagher CG, Marciniuk DD. Role of hypoxemia and pulmonary mechanics in exercise limitation in interstitial lung disease. *Pneumologie*. 1997;51(1):60.
 8. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>
 9. Ferreira AJ, Santos RAS, Raizada MK. Angiotensin-(1-7)/angiotensin-converting enzyme 2/mas receptor axis and related mechanisms. *Int J Hypertens*. 2012;2012:7–8.
 10. Bitker L, Burrell LM. Classic and Nonclassic Renin-Angiotensin Systems in the Critically Ill. *Crit Care Clin*. 2019;35(2):213–27.
 11. Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res* [Internet]. 2017;125:4–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.008>
 12. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenes Tissue Repair* [Internet]. 2015;8(1):1–7. Available from: ???
 13. Tan WSD, Liao W, Zhou S, Mei D, Wong WSF. Targeting the renin–angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2018;40:9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2017.12.002>
 14. Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7). *Hypertension* [Internet]. 1997 Sep;30(3):535–41. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.30.3.535>
 15. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, De Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8258–63.
 16. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. UltraRapid Communication A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87:e1–9.
 17. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2007;292(2):736–42.
 18. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*. 2018;98(1):505–53.
 19. Soares ER, Barbosa CM, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS, Alzamora AC. Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of

- angiotensin-(1–7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. *Peptides* [Internet]. 2017;96(May):67–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.005>
20. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*. 2013;112(8):1104–11.
 21. Villela DC, Passos-Silva DG, Santos RAS. Alamandine: A new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(2):130–4.
 22. Huang Y, Li Y, Lou A, Wang G zhen, Hu Y, Zhang Y, et al. Alamandine attenuates hepatic fibrosis by regulating autophagy induced by NOX4-dependent ROS. *Clin Sci* [Internet]. 2020 Apr 17;134(7):853–69. Available from: <https://portlandpress.com/clinsci/article/134/7/853/222504/Alamandine-attenuates-hepatic-fibrosis-by>
 23. De Souza-Neto FP, De Moraes E Silva M, De Carvalho Santuchi M, De Alcântara-Leonídio TC, Motta-Santos D, Oliveira AC, et al. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. *Clin Sci*. 2019;133(5):629–43.
 24. De Carvalho Santuchi M, Dutra MF, Vago JP, Lima KM, Galvão I, De Souza-Neto FP, et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages in Vitro and in Vivo. *Mediators Inflamm*. 2019;2019.
 25. Prata LO, Rodrigues CR, Martins JM, Vasconcelos PC, Oliveira FMS, Ferreira AJ, et al. Original Research: ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. *Exp Biol Med*. 2017;242(1):8–21.
 26. Li X, Molina-Molina M, Abdul-Hafez A, Ramirez J, Serrano-Mollar A, Xaubet A, et al. Extravascular sources of lung angiotensin peptide synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):887–95.
 27. Sipriani TS, dos Santos RAS, Rigatto K. The Renin-Angiotensin System: Alamandine is reduced in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Cardiol Cardiovasc Med*. 2019;4(3):210–5.
 28. Raupp D, Fernandes RS, Antunes KH, Perin FA, Rigatto K. Impact of angiotensin II type 1 and G-protein-coupled Mas receptor expression on the pulmonary performance of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Peptides* [Internet]. 2020 Nov;133:170384. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978120301339>

Identificação

Título: Prospecção de biomarcadores urinários não invasivos para avaliação de dano renal agudo e predição de gravidade/mortalidade da COVID-19

Palavras chave: SARS-CoV-2, lesão renal aguda, inflamação, mediadores inflamatórios

Resumo

Introdução: A pandemia atual de Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo SARS-CoV-2, agente causador da COVID-19, já atingiu mais de 496 milhões de pessoas, com mais de 30 milhões de casos no Brasil. A COVID-19 está associada com significativa morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva (UTI). Além da insuficiência respiratória, a infecção com SARS-CoV-2 pode também afetar outros órgãos, sendo a lesão renal aguda relativamente comum em pacientes com COVID-19 internados em UTIs. A patogênese da lesão renal é pouco clara, mas postula-se que os mecanismos incluem a resposta de hiperinflamação, liberação exacerbada de citocinas e/ou lesão direta do vírus, sendo identificada alta proporção de casos de COVID-19 grave que necessitam de hemodiálise durante a internação aguda. A investigação da urina de pacientes acometidos pela COVID-19, pode fornecer indícios sobre o avanço da COVID-19 em múltiplos órgãos, além de fornecer informações relevantes sobre lesão/função renal. Com base na hipótese de que o aumento da expressão de citocinas e inflamação renal pode ser uma causa importante de disfunção renal na COVID grave.

Objetivos: Investigar marcadores urinários presentes no Exame Qualitativo de Urina, citocinas, quimiocinas inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo e de dano renal que possam estar correlacionados com a lesão renal aguda (LRA) na COVID-19 grave e mortalidade. **Metodologia:** Estudo retrospectivo, transversal, onde se recrutou pacientes adultos admitidos consecutivamente no Hospital São Camilo de Esteio/RS, entre junho/2020 e dezembro/2020 com diagnóstico de COVID-19, e pessoas positivas para COVID-19, com sintomas brandos, que não necessitaram de hospitalização como controles. O diagnóstico de LRA será baseado nos critérios KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes Clinical* - Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease). Imunoensaios serão realizados para determinar os níveis solúveis de marcadores de inflamação e de toxicidade renal, enquanto que o estado redox urinário será analisado por técnicas bioquímicas. Os desfechos estudados são o desenvolvimento de LRA e a mortalidade hospitalar.

Resultado esperado: Espera-se que o estresse oxidativo causado pela COVID-19, associado ao aumento dos níveis de marcadores de inflamação e dano renal na urina de pacientes internados, sirvam como indicadores do desenvolvimento de LRA e/ou

letalidade, bem como a observação de elementos sedimentoscópicos urinários, em pacientes hospitalizados com COVID-19.

Proponente: Liane Nanci Rotta – coordenadora do projeto, farmacêutica, biomédica, especialista em análises clínicas, doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica (UFRGS), professora UFCSPA.

Instituições participantes: UFCSPA, UNISINOS

Equipe incluindo colaborações/parcerias já estabelecidas para a execução do projeto

- Dr. José Antonio Tesser Poloni – colaborador, farmacêutico bioquímico, especialista em análises clínicas, doutor em Ciências da Saúde (UFCSPA), professor na Unisinos
- Camila Peter – colaboradora, biomédica, diretora técnica do Laboratório Exame – Análises Clínicas.
- Lisiane Mezzomo – colaboradora, farmacêutica, especialista em Citopatologia
- Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão – colaborador, farmacêutico, doutor em Imunologia, professor na UFCSPA.
- Dr. Gilson Dornelles – Pós-Doutorando PPGCS/UFCSPA
- Dra. Claudia E. Thompson – colaboradora, bióloga, doutora em genética e biologia molecular, professora na UFCSPA.

Pós-Graduandos

- Viviane Schmitt Jahnke – colaboradora, mestranda do PPGCS da UFCSPA.
- Paula Coelho Teixeira (Mestranda do PPGCS da UFCSPA – bolsa edital COVID-19 CAPES)
- Carla Andreatta Moreira Neves – colaboradora, enfermeira da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar/Hospital Esteio, mestranda em Ciências da Saúde/UFCSPA.
- Filipe da Silva de Freitas – bolsista de iniciação científica ano 2020/2021, aluno Biomedicina/UFCSPA

Caracterização da proposta

A Coronavírus Disease 19 (COVID-19) é uma doença respiratória aguda causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), de elevada transmissibilidade e de distribuição global (OMS 2019, Chen *et al.* 2020, Zhu *et al.* 2020). A COVID-19 é considerada atualmente uma doença indutora de endotelite e com potencial de dano multiórgão, a depender da gravidade da infecção e da exacerbação da resposta inflamatória (Zhu *et al.*, 2020). Neste sentido, dentre os diversos órgãos e sistemas do corpo humano acometidos pelo SARS-CoV-2, destaca-se o grande dano no sistema renal observado em pacientes hospitalizados. A presença desse vírus no tecido renal tem sido sugerida como a causa de danos estruturais significativos dos túbulos proximais ao infectar diretamente as células epiteliais

tubulares e os podócitos (Bruchfeld 2020, Werion *et al.* 2020, Frithiof *et al.* 2020) provavelmente pela ligação do vírus ao receptor da enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2), que é expressa nos rins, especialmente na superfície das células tubulares renais (Mohanty *et al.* 2020; Maksimowski *et al.* 2020, Farkash *et al.* 2020, Puelles *et al.* 2020).

Pan e colaboradores (2020) identificaram os podócitos e as células do túbulo proximal renal (que desempenham um papel crítico na filtração, reabsorção e excreção da urina) como células hospedeiras do vírus nos rins. Os podócitos são particularmente vulneráveis a ataques bacterianos e virais, e os danos aos podócitos induzem facilmente uma proteinúria intensa (Pan *et al.* 2020).

Há recomendações de um exame de urina na admissão hospitalar em pacientes com COVID-19, pois o comprometimento renal causado pelo SARS-CoV-2 foi associado à gravidade e mortalidade pela doença, sendo elevada a prevalência de utilização de recursos como hemodiálise em pacientes com gravidade elevada da doença. A justificativa para o emprego da urinálise é apoiada por estudo de autópsia que demonstra o tropismo renal do SARS-CoV-2 associado à gravidade da doença, o que inclui o desenvolvimento de lesão renal aguda (LRA) e eventual morte. Como o vírus pode ser detectado nos rins, levantou-se a preocupação de que a infecção direta pelo SARS-CoV-2 possa contribuir para a lesão renal (Wu *et al.* 2020).

Assim como outras infecções virais respiratórias, a COVID-19 causa morte das células infectadas, com estado hiperinflamatório, ativação da resposta imune inata, ativação de linfócitos além da secreção de citocinas inflamatórias (Vabret *et al.* 2020). Além disso, há associação entre a gravidade da doença com altos níveis de citocinas sistêmicas em decorrência do estado inflamatório, o que provavelmente seja o principal fator contribuinte para o desenvolvimento de dano renal (Mehta *et al.* 2020, Han; Ye 2021, Wrapp *et al.* 2020). Esses processos inflamatórios estão associados à geração de estresse oxidativo, o que catalisa a patogênese de infecções virais, como a causada pelo SARS-CoV-2 (Tonga-Pono *et al.* 2020, Delgado-Roche *et al.* 2020).

Entre 8 e 15% (dependendo da configuração geográfica e das características individuais) de todos os casos positivos para SARS-CoV-2 podem ser classificados como graves ou que necessitam de internação em unidade de terapia intensiva (UTI). Em pacientes com COVID-19, 7,58% (95% IC 3.30–13.54%) desenvolveram LRA, com um índice de mortalidade de 93,27% (95% IC 81.46–100%). Em 5,74% (95% ICI

2.88–9.44%) de pacientes com COVID-19 foi detectado o RNA viral na amostra de urina (Chan *et al.* 2020).

A LRA, na COVID-19, pode surgir de uma resposta imune sistêmica, alterações hemodinâmicas, hipercoagulabilidade e tropismo renal viral (Chan *et al.* 2021) e é uma importante complicação da COVID-19 ocorrendo em 0,5-7% dos casos e em 2,9-28,2% dos pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) (Pan *et al.* 2020). Citocinas inflamatórias estão elevadas na urina em condições como incontinência urinária e cistite intersticial/síndrome da dor na bexiga, em comparação com controles normais. Gradin *et al.* (2020) descreveram que além das citocinas estarem elevadas na LRA com base na creatinina sérica há uma correlação entre a concentração de citocinas urinárias (NT3, ST1A1, IL-5, GDNF, ASA, TNF-Beta, IL-20RA, IL-2RB, IL-1alfa, IL-2, TSLP, TNFSF14, FGF23, IL-10RA, IL-22RA1, beta-NGF, TRANCE, IL-24, IL-13, IL-10, IL-20, IL-33, IFN-gama, IL-4) e marcadores teciduais de lesão renal (NGAL, KIM1 e ACR) em pacientes criticamente doentes com COVID-19, onde de 29 pacientes do estudo 19 desenvolveram LRA e, destes, nove morreram sendo 3 deles no estágio 3 da doença renal (transplante renal) (Gradin *et al.* 2021). No estudo de Huang *et al.* (2020) foram avaliados 41 pacientes, 13 dos quais foram internados em UTI, apresentando níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas de fase aguda mais elevados (IL-2, IL-6, CCL-2, CCL-5). Aproximadamente 23% dos pacientes internados desenvolveram LRA.

Justificativa

Pesquisas anteriores relataram a utilidade dos resultados bioquímicos da tira reativa de urina na previsão da gravidade de pacientes com COVID-19 (Liu *et al.* 2019, Morell *et al.* 2021), mas contribuições exatas de efeitos indiretos ou diretos nos rins de pacientes com COVID-19 ainda são desconhecidos e atualmente são foco de pesquisas. Portanto, investigar os níveis de dano renal, citocinas/mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo em amostra de urina de pacientes com COVID-19 e relacionar esses dados aos parâmetros da urinálise tem relevância para avaliar pacientes que foram a óbito (desfecho: morte) ou que sobreviveram (desfecho: não morte), auxiliando a orientar o monitoramento dos pacientes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o conteúdo de marcadores bioquímicos e celulares avaliados no Exame Qualitativo de Urina, mediadores inflamatórios e marcadores de toxicidade, dano renal e de estresse oxidativo na urina de pacientes hospitalizados com COVID-19 e analisar o impacto no desenvolvimento de LRA e na mortalidade.

Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da COVID-19 no desenvolvimento de LRA e mortalidade na população do estudo;
- Avaliar a incidência de anormalidades no exame de urina em pacientes hospitalizados com COVID-19;
- Quantificar os níveis de citocinas/quimiocinas e prostaglandina E2 de pacientes com COVID-19 sobreviventes e que foram a óbito em consequência da COVID-19;
- Determinar os níveis urinários de calbindina, colágeno tipo IV, proteína 1 de ligação a ácidos graxos (FABP-1), glutathione S-transferase alfa (GSTα), IP-10 (CXCL-10), molécula de lesão renal 1 (KIM-1), renina, fator de trefoil 3 (TFF-3) e inibidor tecidual de metaloproteinase tipo I (TIMP-1) em pacientes com diferentes gravidades e desfechos de COVID-19;
- Verificar a correlação de danos observados no EQU com os marcadores inflamatórios avaliados na urina;
- Avaliar e comparar os marcadores de estresse oxidativo entre pacientes com COVID-19 sobreviventes e que foram a óbito em consequência da COVID-19;
- Avaliar a associação os biomarcadores investigados na predição de mortalidade por COVID-19.

METODOLOGIA

Aspectos éticos: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFCSPA (4.838.254). O consentimento informado por escrito foi obtido dos responsáveis legais pelos pacientes após a explicação dos procedimentos. Os autores assinaram um acordo para preservar o anonimato do paciente e da equipe em relação ao uso dos dados.

Delineamento: Estudo retrospectivo, transversal, cujas coletas de material biológico ocorreram no período de julho de 2020 a dezembro de 2021 no Laboratório Exame que presta serviço ao Hospital São Camilo em Esteio-RS.

Cálculo amostral: A amostra foi calculada utilizando-se um índice de confiança de 95%, um erro amostral de 10%, uma verdadeira probabilidade de evento de 50%.

$$n = \frac{z^2 \cdot p(1 - p)}{e^2}$$
$$n = \frac{1,96^2 \cdot 50(1 - 50)}{10^2} = 39$$

n = Amostra calculada
Z = Variável normal padronizada associada ao nível de confiança
p = Verdadeira probabilidade do evento
e = Erro amostral

Crítérios de inclusão: Pacientes ≥ 18 anos, com teste de RT-PCR positivo para COVID-19, realizado no Lab EXAME, internados (casos moderados a críticos) ou não (casos leves) no Hospital São Camilo (Esteio/RS).

Pacientes do estudo: Um total de 60 participantes com teste qRT-PCR positivo para COVI-19 serão incluídos no estudo. Os participantes serão divididos nos seguintes grupos: **39 pacientes hospitalizados** com COVID moderada, grave ou crítica (20 sobreviventes e **19 não sobreviventes**), também haverá um grupo de pacientes com COVID leve, denominado **controle (sem comprometimento renal)** (n=21). Será realizada uma revisão de prontuário eletrônico para coletar as informações sobre características demográficas como idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), comorbidades pré-existentes, sintomas clínicos, tratamento farmacológico e sinais vitais na internação, resultados de parâmetros laboratoriais e estratégias de ventilação. Com base nas dosagens de creatinina, os pacientes serão classificados com LRA ou não, utilizando os critérios de KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes Clinical - Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*), que se baseiam no valor da creatinina sérica (KDIGO 2012).

O desfecho obtido para a análise final será a mortalidade hospitalar, que incluirá recuperados/alta (sobreviventes) e falecidos (não sobreviventes). Será considerado

recuperado aqueles com sintomas e sinais agudos completamente resolvidos, melhora significativa na disfunção de órgãos pulmonares e extrapulmonares e não precisarem mais de cuidados de suporte, tendo eliminado completamente o vírus confirmado por testes repetidos para SARS-CoV-2 com resultado negativo, antes da alta hospitalar.

Exame Quantitativo de Urina: Amostras de urina foram obtidas por micção espontânea ou por sondagem, e apenas incluídas no estudo se as amostras de urina pudessem ser obtidas e processadas imediatamente pela equipe do estudo (em até 2h). A urinálise foi realizada por meio da análise de tira reagente no sistema automatizado Urisys 2400 (Roche Diagnostics, Suíça) e realizada a microscopia de sedimento urinário, utilizando-se 20 µL do sedimento urinário entre lâmina e lamínula, em microscópio de campo claro (magnificação microscópica de 100x e 400x), de acordo com as normas laboratoriais vigentes (Poloni *et al.* 2016).

Determinação dos níveis de marcadores de dano renal e mediadores inflamatórios em amostras de urina: As concentrações urinárias das citocinas IL-1 β , IL-6, MCP-1/CCL-2, CXCL-9, VEGF, EGF, PDGF, prostaglandina E2 serão quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme instruções dos fabricantes. As concentrações urinárias de marcadores de citotoxicidade renal serão quantificadas por sistema luminex através de kit multiplex para 9 marcadores: calbindina, colágeno tipo IV, proteína 1 de ligação a ácidos graxos (FABP-1), glutathione S-transferase alfa (GST α), IP-10 (CXCL-10), molécula de lesão renal 1 (KIM-1), renina, fator de trefoil 3 (TFF-3) e inibidor tecidual de metaloproteinase tipo I (TIMP-1).

Estresse oxidativo:

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) será avaliada no através da intensidade de fluorescência do corante redox-sensível diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH, 100 µM, Sigma-Aldrich) (comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente) usando Spectra Max M2e (Molecular Devices, EUA).

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os produtos da oxidação proteica (AOPP) serão determinados conforme descrito por Ohkawa *et al* (1979). Resumidamente: 0,2 mL de urina será adicionada ao dodecil sulfato de sódio (8,1%, 0,05 mL), ácido acético (0,2 mL, 2,5 M, pH 3,4) e 0,8% de

ácido tiobarbitúrico (0,25 mL, Sigma, EUA) e aquecido em água fervente (90°C) por 60 min. Em seguida, os sobrenadantes são transferidos para placas com 96 poços e a absorbância é lida em 532 nm (EZReader, EUA). Os resultados são calculados com base em curva padrão com o equivalente de cloramina e expressos em $\mu\text{mol/L}$.

Os tióis totais são medidos pela reação de 25 μL de plasma com 450 μL de tampão fosfato (0,2 M, pH 8,0) e 25 μL de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 30 min no escuro. Em seguida, 200 μL são transferidos para a microplaca e a leitura espectrofotométrica realizada no comprimento de onda de 412 nm (leitor de microplacas Biochrom EZ Read 400).

As concentrações de nitrato serão usadas como medida da produção de óxido nítrico pelo método de Griess de acordo com o método Miranda (Miranda *et al.* 2001).

Análises estatísticas: O software SPSS 22.0 (IBM Corporation, SPSS Inc., EUA) será utilizado para análise estatística. Após o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados serão apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana e amplitudes interquartis. As comparações serão feitas pelos testes t Student ou U de Mann-Whitney para variáveis contínuas, conforme apropriado, e pelo uso do teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas. O teste de correlação de Pearson será utilizado para determinar a correlação significativa entre as variáveis. As comparações entre os grupos também serão realizadas por meio do teste de análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido do post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas. O teste do Coeficiente de Pearson será utilizado para verificar a correlação entre variáveis inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo. Um valor de $p \leq 0,05$ será adotado para todos os testes para indicar significância estatística.

Etapas de execução da proposta com respectivo cronograma de atividades

Atividade	Meses (1-12)
Recrutamento de pacientes	Já realizada
Coleta de material biológico	Já realizada
Coleta de dados de prontuários	Já realizada
Revisão bibliográfica	1-12
Elaboração/análise de banco dados	1-12
Análise de EQU	Já realizada
Quantificação de citocinas/quimiocinas e prostaglandinas	4-8
Avaliação de estresse oxidativo	1-6
Quantificação de marcadores de dano e toxicidade renal	8-10
Avaliar a associação entre a gravidade da doença, idade, presença de comorbidades, dano renal e desfecho clínico (sepse, falência múltipla de	8-10

órgãos, óbito) com biomarcadores de dano renal, bioquímicos e imunológicos	
Análise estatísticas	1-10
Orientação de alunos de Pós-Graduação	1-12
Preparação do artigo para publicação	10-12

Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Principais resultados esperados

- a) Espera-se que o estresse oxidativo causado pela COVID-19 associado ao aumento dos níveis de citocinas na urina de pacientes internados sirvam como indicadores de desenvolvimento LRA e/ou letalidade, bem como a observação de elementos sedimentoscópicos urinários, em pacientes hospitalizados com COVID-19.
- b) Formação de recursos humanos: Profissionais da área da Saúde (Lab da Rede Exame onde teremos alunos de IC realizando estágios vinculados ao projeto) e de Pós-Graduação estarão envolvidos no desenvolvimento, discussão dos resultados desta pesquisa.
- c) Produção de artigos científicos a serem publicados em revistas indexadas e internacionais de alto impacto;
- d) Impacto social: geração de conhecimentos que irão auxiliar no entendimento da patogenia da COVID-19
- e) Fortalecimento de uma parceria público-privada no estudo da COVID-19 estabelecida entre pesquisadores da UFCSPA – rede exame de análises clínicas e Prefeitura Municipal de Esteio.

Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão.

- O projeto propiciará a formação de recursos humanos, estudantes de graduação e pós-graduação, profissionais da saúde, entre outros, bem como a divulgação dos dados científicos para comunidade científica, gestores e a comunidade em geral através da elaboração de informativos em linguagem clara e acessível à comunidade.

Orçamento

O presente projeto está sendo realizado em parceria com o laboratório de análises clínicas da Rede Exame, e convênio com a Prefeitura Municipal de Esteio-RS, de modo que os recursos financeiros se destinam apenas para a aquisição dos kits abaixo.

	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
CUSTEIO*			
Kit milliplex human kidney injury (o kit quantifica os seguintes analitos utilizando sistema luminex:	1	8.435,00	8.435,00
Kit ELISA para prostaglandina E2	1	3.485,06	3.485,06
TOTAL			11.920,06

*Os Kits/reagentes para as demais dosagens a serem quantificadas já foram adquiridos previamente e não constam neste orçamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bruchfeld, A. The COVID-19 pandemic: consequences for nephrology. Nat Rev Nephrol 17, 81–82 (2021). PMID: 33257872

Chan KW, Yu KY, Lee PW, Lai KN, Tang SC. Global Renal Involvement of Coronavirus Disease 2019 (RECORD): A Systematic Review and Meta-Analysis of Incidence, Risk Factors, and Clinical Outcomes. Front Med (Lausanne). (2021). May 25;8:678200. doi: 10.3389/fmed.2021.678200. eCollection 2021. PMID: 34113640

Chan V W-S, Chiu P K-F, Yee C-H, Yuan Y, Ng C-F, Teoh J Y-C. A systematic review on COVID-19: urological manifestations, viral RNA detection and special considerations in urological conditions. World J Urol. Sep;39(9):3127-3138 (2021). PMID: 32462305

Chen, N.; Zhou, M.; Dong, X.; Qu, J.; Gong, F.; Han, Y.; Qiu, Y.; Wang, J.; Liu, Y.; Wie, Y.; et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study, Lancet 395, 507–513. (2020) PMID: 32007143

Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative stress as key player in severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection. Arch Med Res 51(5):384–387 (2020). PMID: 32402576

Farkash EA, Wilson AM, Jentzen JM. Ultrastructural Evidence for Direct Renal Infection with SARS-CoV-2. J Am Soc Nephrol. Aug;31(8):1683-1687 (2020). PMID:32371536

Frithiof, R., Bergqvist, A., Järhult, J.D. et al. Presence of SARS-CoV-2 in urine is rare and not associated with acute kidney injury in critically ill COVID-19 patients. Crit Care 24, 587 (2020). PMID: 32993742

Gradin A, Andersson H, Luther T, Bülow S, Anderberg, S. Rubertsson, M. Lipcsey, M. Å, Larsson A., Frithiof R., Hultström M., Urinary cytokines correlate with acute kidney injury in critically ill COVID-19 patients, *Cytokine*, 146:155589 (2021). PMID: 34161857

Han, X.; Ye, Q. Kidney involvement in COVID-19 and its treatments. *J Med Virol* John Wiley and Sons Inc. 93(3):1387-1395.(2021). PMID: 33150973

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395(10223), 497–506. (2020) PMID: 31986264

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) acute kidney injury work group KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int. Suppl.* 1–138. (2012)

Liu R, Qingfeng M, Huan H, et al. Chengliang. "The value of urine biochemical parameters in the prediction of the severity of coronavirus disease 2019" *Clin Chem Lab Med*, 58(7):, 1121-1124. (2020) PMID: 32286242

Maksimowski N, Williams VR, Scholey JW. Kidney ACE2 expression: Implications for chronic kidney disease. *PLoS One*. (2020). 15(10):e0241534. PMID: 33125431.

Mehta, P.; McAuley, D.F.; Brown, M.; Sanchez, E.; Tattersall, R.S.; Manson, J.J. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet* 395, 1033–1034. (2020) PMID: 32192578

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. Arapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62–71 (2001) PMID: 11178938

Mohanty SK, Satapathy A, Naidu MM, Mukhopadhyay S, Sharma S, et al. severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19) - anatomic pathology perspective on current knowledge. *Diagn Pathol.* 15(1), 103. (2020) PMID: 32799894.

Morell-Garcia, D., Ramos-Chavarino, D., Bauça, J.M. et al. Urine biomarkers for the prediction of mortality in COVID-19 hospitalized patients. *Sci Rep* 11, 11134 (2021). PMID: 34045530

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry.* 95(2): 351–358. (1979) PMID: 36810

Pan XW, Xu D, Zhang H, Zhou W, Wang LH, Cui XG. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Med.* 46(6), 1114-1116. (2020). PMID: 32236644

Poloni, J. A. T. et al. Bright Field Microscopy to Detect Decoy Cells Due to BK Virus Infection in the Fresh and Unstained Urine Sediment in Kidney Allograft Recipients. *J. Clin. Lab. Anal.*, 30(6), 1044–1050, (2016). PMID: 27122351

Puelles VG, Lutgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* 383(6):590-592. (2020). PMID: 32402155

Tonga-Pono MP. COVID-19 infection and oxidative stress: an under-explored approach for prevention and treatment? *Pan Afr Med J* 35(Suppl 2):12. (2020) PMID: 32528623

Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*.52(6):910–941. (2020) PMID: 32505227

Werion A, Belkhir L, Perrot M, et al. SARS-CoV-2 causes a specific dysfunction of the kidney proximal tubule. *Kidney Int*, 98(5):1296-1307 (2020) PMID: 32791255

World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected: Interim guidance V 1.2. WHO/2019-nCoV/Clinical/2020.4. (2020).

Wrapp, D, Wang N, Corbett K.S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation., *Science* 367, 1260–1263 (2020). PMID: 32075877

Wu, C. et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern* 180(7):934-943 (2020). PMID: 32167524

Zhu N. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382(8):727–733. (2020) PMID: 31978945

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**DIETAS HIPERGLICÍDICA, HIPERLIPÍDICA E HIPERPROTEICA
ASSOCIADAS AO USO DE PROBIÓTICOS DEIXAM OS MESMOS RASTROS
METABÓLICOS E COMPORTAMENTAIS DEPOIS QUE OCORRE UM
EQUILÍBRIO NA ALIMENTAÇÃO DE RATOS WISTAR?**

**LUIZA FERRACINI CUNHA
PROFA. MARCIA GIOVENARDI
PROFA. ALETHEA GATTO BARSCHAK
AMANDA MACIEL**

Porto Alegre

2021

ÍNDICE

1 Justificativa	4
2.Introdução.....	4
2.1 Padrões dietéticos ocidentais	4
2.2. Influência das dietas na alteração de comportamento	5
2.3. Implicações metabólicas das dietas hiperglicídica, hiperlipídica e hiperproteíca.....	6
2.4. Probióticos e seus benefícios	7
2.5. Aplicação em modelos experimentais dos padrões dietéticos associados a probióticos	8
3 Objetivos	10
3.1 Objetivo Geral	10
3.2 Objetivos Específicos	10
4 Materiais e Métodos	12
4.1 Delineamento do estudo	12
4.2 Amostra	12
4.3 Grupos do estudo	12
4.4 Composição das dietas.....	13
4.5. Administração dos probióticos.....	13
4.6. Avaliação do peso corporal	14
4.7 Protocolo de obtenção de tecidos	15
4.8. Análises em plasma.....	15
4.9. Análises em fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e intestino	15
4.10. Análise Histológica do fígado.....	17
4.10. Análise Morfológica do Tecido Adiposo.....	17
4.11 Análises comportamentais.....	17
4.12 Análise Estatística	19
5. Local de Realização	19
6. Cronograma	19

7. Orçamento	20
8. Aspectos Éticos	21
Referências Bibliográficas	22

RESUMO

Os padrões dietéticos ocidentais são caracterizados pelo alto consumo de gorduras e açúcar refinado, e sabe-se que esse tipo de dieta pode aumentar o risco de doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Hoje esse tipo de patologia é responsável por cerca de 70% das causas de morte no mundo. A longo prazo, consumir quantidades excessivas de alimentos ricos gordura saturada, carboidratos simples ou proteínas afeta a homeostase de todo o corpo, incluindo a saúde do cérebro. Diversos estudos também mostram os benefícios de probióticos na reversão dos danos metabólicos causados por dietas ricas em algum dos macronutrientes, mas sem a avaliação de alterações comportamentais. Tendo isso em vista, o objetivo do presente estudo é comparar as implicações metabólicas e comportamentais do consumo das dietas hiperproteica, hiperglicídica e hiperlipídica associadas ao uso de probióticos em ratos Wistar.

ABSTRACT

Western dietary patterns are characterized by high consumption of fats and refined sugar, and this type of diet can increase the risk of Chronic Noncommunicable Diseases (NCDs). Today these pathologies are responsible for about 70% of the causes of death in the world. In the long run, consuming excessive amounts of foods rich in saturated fat, simple carbohydrates or proteins affects homeostasis throughout the body, including brain health. Several studies also show the benefits of probiotics in reversing the metabolic damage caused by diets rich in some of the macronutrients, but without assessing the behavioral modifications. Therefore, the objective of the present study is to compare the metabolic and behavioral implications of the consumption of high-protein, high-carbohydrate and high-fat diets associated with the use of probiotics in Wistar rats.

JUSTIFICATIVA

O uso de probióticos tem se tornado cada vez mais comum entre os profissionais da saúde, principalmente para regulação do intestino. A relação entre o uso desses probióticos e rastros metabólicos e comportamentais deixados pela dieta consumida pelos pacientes ainda não foi descrita e comparada.

Sabe-se que grande parte da população consome o que chamamos de Dieta Ocidental, rica em carboidratos e gorduras e, assim, hiper palatáveis, mas também existe uma pequena parcela que faz uso de dieta hiperproteica, por questões estéticas. Cada macronutriente fornece um tipo de substrato para o organismo, e pode levar a consequências quando consumido em excesso. O objetivo do estudo é comparar os rastros deixados pela dieta rica em cada um dos macronutrientes, e ainda verificar se o uso de probióticos pode influenciar esses rastros.

INTRODUÇÃO

2.1. Padrões dietéticos ocidentais

Cada vez mais temos à nossa disposição alimentos processados ricos em gordura e/ou carboidratos simples, principalmente após a revolução industrial (Kiple & Ornelas, 2000). Antes desse fenômeno, era comum nos alimentarmos de alimentos in natura ou minimamente processados, além de serem raros os alimentos refinados.

O primeiro registro de açúcar refinado foi no norte da Índia, no ano 500 A.C (Kiple & Ornelas, 2000). Ao longo dos anos, a qualidade desse alimento foi modificada tanto quanto a quantidade consumida pelos humanos. Por ser um alimento com boa palatabilidade, cada vez mais é consumido e adicionado a preparações e alimentos prontos.

Os padrões dietéticos ocidentais são caracterizados pelo alto consumo de gorduras e açúcar refinado, e sabe-se que esse tipo de dieta pode aumentar o risco de doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) (Psaltopoulou et al., 2017). Hoje esse tipo de patologia é responsável por cerca de 70% das causas de morte no mundo (WHO, 2020) e são raras em caçadores/coletores e em pessoas menos ocidentalizadas (Cunnane, 2005).

Além disso, o estabelecimento desse tipo de dieta como padrão alimentar também pode levar a doenças neurológicas, como demência (Kaprinay et al., 2016; Morris & Tangney, 2014).

2.2. Influência das dietas na alteração de comportamento

Nos últimos anos, tem se estudado os fatores psicológicos associados ao consumo de dietas específicas, pois o que consumimos pode afetar diretamente o comportamento.

Existem diversos estudos que relacionam o consumo de dietas específicas com comportamento em animais (Carnevali et al., 2017, 2018), e hoje sabe-se que uma microbiota saudável está relacionada com menor chance de doenças como a depressão, por exemplo (Abildgaard et al., 2017). A longo prazo, consumir quantidades excessivas de alimentos ricos gordura saturada afeta a homeostase de todo o corpo, incluindo a saúde do cérebro. Evidências mostram que uma dieta rica em alimentos gordurosos diminui o volume do hipocampo, prejudica a função cognitiva, incluindo memória, eficiência psicomotora, atenção em humanos e, mais importante, aumenta a vulnerabilidade à depressão e ansiedade (Jacka et al., 2015). O alto consumo de carboidratos também já foi associado à diminuições cognitivas, principalmente quando falamos de açúcar simples (Roberts et al., 2012).

O comportamento alimentar é controlado pela interação entre eventos psicológicos (percepção de fome, ânsia), operações comportamentais (ingestão de refeições, lanches, energia e macronutrientes), além de eventos fisiológicos periféricos e metabólicos, assim como dos níveis de

neurotransmissores e de interações metabólicas no cérebro (Blundell et al., 2001).

Existem dois mecanismos que estão relacionados com o comportamento alimentar: homeostáticos e hedônicos (Egecioglu et al., 2011). O sistema homeostático auxilia na regulação de fome, saciedade e níveis de adiposidade, e os hormônios relacionados são a leptina, grelina e insulina, que atuam em circuitos cerebrais hipotalâmicos e do tronco cerebral, mantendo um balanço energético adequado. Já o sistema hedônico trabalha com circuito de recompensa, e é em função desse mecanismo que alimentos considerados palatáveis são consumidos mesmo após as necessidades energéticas terem sido atingidas. Nessas situações o sistema hedônico se sobrepõe ao homeostático (Dias, Vera Junn, Eunsung Mouradian, 2008).

Quando a dieta é rica em carboidratos simples – principalmente açúcares refinados – o sistema de recompensas é ativado, assim como quando o alimento é rico em gorduras. Quando se trata de alteração de comportamento, a comparação entre dietas ricas em carboidratos e dietas ricas em gordura já é muito estabelecida, mas faltam evidências sobre a relação com uma dieta rica em proteínas, que hoje é amplamente utilizada.

As dietas ricas em proteína são indicadas para indivíduos praticantes de exercício físico quando o objetivo é manutenção ou ganho de massa magra (Longland et al., 2016). Porém, quando feitas sem supervisão, podem trazer malefícios para o organismo, como danos renais, metabólicos e com relação à longevidade (Kitada et al., 2019; Zapata Posada, 2020).

2.3. Implicações metabólicas das dietas hiperglicídica, hiperlipídica e hiperproteíca

Há uma forte crença de que existe uma dieta mágica que ajuda as pessoas a perder peso e não ganhar novamente depois. Essa ideia generalizada estimulou o desenvolvimento de vários estudos que se concentraram em diferentes quantidades de gordura, proteína ou carboidrato na dieta e até em

suplementos dietéticos. As dietas modernas podem ser datadas de 1863, quando William Banting, um agente funerário, publicou sua perda de peso de 23 kg usando uma dieta pobre em carboidratos prescrita por seu médico William Harvey (Banting, 1863).

Os carboidratos na dieta são fornecidos por amidos e açúcares adicionados e podem ser ingeridos em alimentos sólidos ou em bebidas. Hoje, a população em geral consome uma dieta rica em carboidratos e muitas vezes em gordura, o que leva à epidemia da obesidade que estamos vivendo. Estudos indicam que uma dieta rica em carboidratos pode aumentar o consumo de calorias a longo prazo, assim como aumentar os níveis de leptina (Ceolin et al., 2019) e gerar resistência a insulina, o que leva a doenças cardiovasculares (Rickman et al., 2010).

Dietas com alto teor de gordura normalmente apresentam um teor energético – quantidade de calorias – maior, pois a gordura tem mais energia por unidade de peso do que proteína ou carboidrato (ou seja, tem maior densidade de energia) (Astrup et al., 2000). Assim, reduzir a gordura dietética reduz a ingestão de gordura e reduz a densidade energética da dieta, o que também pode ser uma estratégia quando se fala em perda de peso. Estudos mostram que dietas ricas em gordura (ou high fat) podem gerar resistência a insulina, aumento de gordura corporal e esteatose hepática tanto em animais quanto em seres humanos (Buettner & High-fat, 2007).

Dietas ricas em proteína são amplamente utilizadas como estratégia para perda de peso, em função do aumento de saciedade. Isso faz, inclusive, com que a perda de peso seja mantida ao longo do tempo (Westerterp-Plantenga et al., 2004). Apesar de normalmente efetivo, esse tipo de dieta também traz riscos para a saúde, que são pouco divulgados (por ser uma estratégia que está em alta). Um dos maiores equívocos sobre a dieta hiperproteica é confundi-la com a estratégia low carb (pobre em carboidratos), onde o correto seria diminuir o consumo de carboidratos e aumentar proporcionalmente o consumo de proteínas e lipídios. Quando feita sem o devido estudo, esse tipo

de dieta acaba aumentando mais o consumo de proteínas do que de gorduras, o que pode levar a danos renais e metabólicos (Kitada et al., 2019).

A formação de ATP e o suprimento energético são elementos fundamentais no funcionamento adequado de qualquer tecido (Lenaz et al., 2006). O funcionamento inadequado da cadeia transportadora de elétrons e do ciclo de Krebs podem trazer prejuízos importantes, especialmente no SNC em função da grande dependência do metabolismo aeróbico. Alterações nesses sistemas podem acarretar déficit na formação de ATP, além de exacerbação na produção de espécies reativas levando ao dano oxidativo (Carnevali et al., 2018). Dessa forma, acredita-se que possa haver um envolvimento dos diferentes tipos de consumo de dieta no metabolismo energético nas alterações observadas, particularmente na obesidade.

2.4. Probióticos e seus benefícios

Os probióticos são caracterizados como uma ampla gama de organismos micro-simbióticos isolados do intestino, que quando administrados podem melhorar a saúde pela modulação e restauração da microbiota intestinal (Gerritsen et al., 2011). Diferentes tipos de bactérias podem ser usados como probióticos. As bactérias mais comumente usadas incluem Lacto-bacilos e Bifidobactérias (Fijan, 2014), pois têm uma relação simbiótica com o hospedeiro. Elas colonizam a membrana mucosa presente nas células epiteliais do intestino, onde inibem o crescimento e a fixação de bactérias prejudiciais ao produzir compostos bactericidas (por exemplo, bacteriocinas [toxinas proteicas produzidas por bactérias para inibir o crescimento de cepas bacterianas semelhantes ou intimamente relacionadas], antibióticos, ácidos graxos livres, peróxido de hidrogênio) contra essas bactérias prejudiciais (Holzapfel & Schillinger, 2002) e regulam a motilidade intestinal e a secreção de muco.

Os probióticos apresentam efeitos benéficos no tratamento e prevenção de diversas doenças, desde distúrbios gastrointestinais (doenças inflamatórias

do intestino, doenças do fígado) até alergia, distúrbios metabólicos e câncer. Esses efeitos são consequência da restauração do equilíbrio da microbiota intestinal (bactérias comensais vs. patogênicas), mantendo a integridade da barreira intestinal, o que reduz a produção de produtos tóxicos e melhora a função hepática (Neag et al., 2020). O efeito benéfico dos probióticos pode acontecer devido à inibição do crescimento de bactérias nocivas pela produção de ácidos graxos livres, peróxido de hidrogênio e peptídeos antimicrobianos (El-Khadragy et al., 2019).

Ainda, os probióticos têm muitos benefícios metabólicos, como a regulação a homeostase da insulina, fermentação de alimentos não digeríveis, biotransformação de certos xenobióticos e drogas e síntese de algumas vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta. Os probióticos podem ser um fator que suprime efetivamente o crescimento e a passagem de vários patógenos, aumentando a formação da barreira da mucosa intestinal e a imunidade da mucosa (Mukherjee et al., 2018). Vários estudos também relataram o efeito potencial dos probióticos em parasitas, como protozoários (por exemplo, *Cryptosporidium*, *Eimeria*) e vermes (por exemplo, *Ascaris*, *Trichuris*) (Travers et al., 2011).

Além dos benefícios metabólicos, os probióticos também podem ser positivos para o equilíbrio redox do organismo. Estudos demonstram que o uso de probióticos interfere no crescimento microbiano e nos níveis antioxidantes, aumenta a eliminação de radicais hidroxila e reduz a glutatona, um potente antioxidante celular (Kullisaar et al., 2002, 2003). A atividade antioxidante expressa por algumas cepas de *Lactobacillus* usadas como componentes alimentares e probióticos podem ter um impacto substancial sobre o bem-estar humano (Lin & Chang, 2000).

2.5. Aplicação em modelos experimentais dos padrões dietéticos associados a probióticos

O consumo de diferentes dietas não só proporciona substratos específicos para o metabolismo do corpo, mas também afeta a estrutura e o metabolismo da comunidade microbiana, tanto em ratos quanto em humanos (Ubeda et al., 2017) . Já é sabido que o uso de probióticos associados à uma dieta hiperlipídica pode melhorar padrões de comportamento e doenças como depressão (Abildgaard et al., 2017).

Também se sabe que a suplementação de probióticos, quanto associada à uma dieta hiperproteica pode melhorar os níveis de ureia, além de reduzir a incidência de um tipo específico de câncer (Adilah et al., 2018). Apesar desses benefícios, não há literatura sobre comportamento comparado a esse tipo de dieta.

Estudos que utilizam probióticos com dietas hiperglicídicas (normalmente adicionadas de frutose) mostram redução de glicemia, parâmetros lipídicos e estresse oxidativo em ratos, porém sem avaliar comportamento, e ansiedade (Yadav et al., 2007).

Animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e, posteriormente, tratado com probióticos *L. curvatus* HY7601 e *L. plantarum* KY1032 apresentaram redução no ganho de peso corporal e na expressão de genes relacionados à inflamação tanto no fígado quanto no tecido adiposo (Park et al., 2013). Assim como, em modelo de síndrome metabólica induzida por dieta high fat foi constatado a melhora da sensibilidade à insulina no grupo suplementado com 5×10^8 UFC de *Bifidobacterium adolescentis* por 12 semanas (Chen et al., 2012)

Tendo isso em vista, o objetivo do presente estudo é comparar as implicações metabólicas e comportamentais do consumo das dietas hiperproteica, hiperglicídica e hiperlipídica associadas ao uso de probióticos em ratos Wistar.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar e comparar as implicações metabólicas e comportamentais do consumo das dietas hiperproteica, hiperglicídica e hiperlipídica associadas ao uso de probióticos em ratos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

Comparar, em animais alimentados com dieta hiperproteica, hiperglicídica ou hiperlipídica e suplementados ou não com probióticos os seguintes parâmetros:

1. Perfil lipídico plasmático através da determinação do colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilgliceróis e HOMA.
2. Glicemia.
3. Função renal e hepática por meio da determinação plasmática de ureia, creatinina, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH).
4. Estado redox por meio da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de sulfidrilas e avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo.
5. Via de sinalização envolvendo a insulina (via AKT/PI3K, fator de transcrição PPAR) no tecido adiposo e músculo esquelético.
6. Determinação dos níveis plasmáticos de leptina, grelina e insulina.
7. Avaliação do metabolismo energético, por meio da determinação da atividade dos complexos da Cadeia transportadora de elétrons no hipocampo, córtex cerebral, tecido adiposo, músculo esquelético e intestino.

8. Histologia do fígado.
9. Morfologia do tecido adiposo.
10. Aumento de massa corporal.
11. Comportamento de saciedade e ansiedade.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Este projeto será realizado como um estudo de Caso-Controle.

Amostra

Serão utilizados 140 ratos Wistar, machos, de 8 semanas (200-250g), obtidos através Biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, mediante aprovação do projeto pelo CEUA-UFCSPA. Eles serão mantidos em ambiente com temperatura (20-24°C) e umidade (40-60%) controladas, água e alimentos ad libitum e ciclos claro-escuro de 12 horas. Os animais serão alojados em gaiolas de manutenção para ratos, de dois a três ratos por gaiola.

Grupos do estudo

Com base em estudos anteriores (Abildgaard et al., 2017; Silva et al., 2012), foi estimado o número de animais necessário para realizar o experimento com base nas hipóteses criadas. O tamanho mínimo de amostra para este estudo é de 20 animais por grupo. Tendo em vista que o experimento será realizado com 7 grupos, totalizariam 140 animais.

O estudo será realizado em 2 tempos (T1 e T2). No T1, os animais serão divididos em 7 grupos:

Grupo 1 – Controle Normal (Dieta Normal) receberá ração padrão e água.

Grupo 2 – Dieta hiperglicídica (Dieta com alto teor de carboidrato) receberá dieta com alto teor de carboidratos e água.

Grupo 3 – Dieta hiperglicídica + probióticos (Dieta com alto teor de carboidrato + probióticos) receberá dieta com alto teor de carboidratos, probióticos e água.

Grupo 4 – Dieta hiperlipídica (Dieta com alto teor de lipídios) receberá, dieta com alto teor de lipídios e água.

Grupo 5 – Dieta hiperlipídica + probióticos (Dieta com alto teor de lipídios + probióticos) receberá, dieta com alto teor de lipídios, probióticos e água.

Grupo 6 – Dieta hiperproteica (Dieta com alto teor de proteínas) receberá, dieta com alto teor proteínas e água.

Grupo 7 – Dieta hiperproteica + probióticos (Dieta com alto teor de proteínas + probióticos) receberá, dieta com alto teor proteínas, probióticos e água.

Os animais serão divididos em 7 caixas com 2 animais e 2 caixas com 3 animais por grupo.

Ao final de T1 – 8 semanas – 1/3 dos animais (1 caixa com dois animais e uma caixa com 3 animais por grupo) serão submetidos a testes comportamentais e eutanasiados para obtenção dos tecidos. Os animais restantes de cada grupo serão divididos em dois outros grupos: alimentados com dieta normal + água e alimentados com dieta normal + água + probióticos por mais 8 semanas (T2), para verificação da reversão dos danos causados pelas dietas hipercalóricas e a comparação com os animais suplementados com probióticos. Após as 8 semanas será feito mais um teste comportamental e todos os animais serão eutanasiados para obtenção dos tecidos.

4.4 Composição das dietas

Os animais serão alimentados conforme os grupos do estudo com dieta padrão (controle), hiperglicídica, hiperlipídica e hiperproteica, conforme a tabela abaixo, que demonstra a composição de cada dieta.

Tabela 1. Composição de nutrientes das dietas

	<i>Dieta Padrão</i>	<i>Dieta alto teor de carboidratos</i>	<i>Dieta com alto teor de lipídios</i>	<i>Dieta com alto teor de proteína</i>
Proteínas (%)	2	21,09	1	52
	2		6,67	,73
Carboidratos (%)	6	69,56	3	37
	7		8,23	,92
Amidos (%)		32,16	2	26,
			9,2	49
Sacarose (%)		36,36	8,	10,
			21	39
Gordura (%)	4	9,35	4	9,
			5,09	35
Óleo de soja (%)		9,35	7,	9,3
			39	5
Banha (%)		0	3	0
			7,7	
Mix de vitaminas (%)	1	1,04	0	1,
			,82	04
L Cristina (%)		0,31	0	0,
			,25	78

As dietas serão produzidas pela empresa Pragsoluções Biociências em formato de pallet de acordo com as especificações nutricionais da Tabela 1. O volume consumido por cada caixa será pesado semanalmente utilizando o cálculo de peso final no término da semana - peso inicial (colocado para os animais), para análise de gramagem e valor calórico consumido ao final do

estudo, pois existem desfechos que podem ser afetados pelo consumo de cada animal, como o Índice de Lee.

Administração dos probióticos

As cepas de probióticos escolhidas foram *Lactobacillus acidophilus* (~10¹⁰ CFU/g) e *Bifidobacterium lactis* (~10¹⁰ CFU/g), por serem amplamente utilizados na prática clínica e terem indícios de modificação de comportamento. Serão administrados 3x na semana durante 8 semanas, aos animais dos grupos 3, 5 e 7 por gavagem. Os animais dos grupos dos grupos 1, 2, 4 e 6 receberão igual volume de água por gavagem na mesma frequência. Após as 8 semanas, metade dos animais restantes de cada grupo receberá a mesma dose por mais 8 semanas (para verificar a reversão dos danos).

Avaliação do Peso Corporal

Todos os animais serão pesados semanalmente, para determinação do ganho de peso. O peso final de cada animal será subtraído do peso inicial, sendo o resultado considerado a alteração total de peso do animal. Será calculado o índice de Lee (equivalente nos animais ao Índice de massa corporal nos humanos (Bernardis, 1970).

Protocolo de obtenção de tecidos

Ao final do estudo os animais serão mantidos em jejum por 4 horas e sacrificados por decapitação.

A eutanásia dos animais será realizada por decapitação, sem o uso de anestesia. A literatura científica apresenta relatos sobre a possível indução de alterações em parâmetros de avaliação de estresse oxidativo (alguns avaliados nesse estudo) ocasionado pelo uso de diferentes tipos de anestésicos (Buzaleh et al., 2005; Nelson, David L.; Cox, 2014; Rezin et al., 2010; Türkan et al., 2004; Yesilkaya et al., 1998). Os anestésicos poderiam

apresentar um efeito sobre parâmetros analisados, impedindo dessa forma a avaliação do efeito real do tratamento. A partir disso, optou-se pela não utilização de anestésicos na eutanásia dos animais.

Serão coletadas amostras de sangue total (sangue troncular), conforme método de Cocchetto e Bjornsson – 1983 (Cocchetto & Bjornsson, 1983), hipocampo, córtex cerebral, músculo esquelético, intestino, fígado e tecido adiposo. A coleta dos tecidos será realizada em gelo. Os materiais coletados serão analisados imediatamente ou mantidos congelados a -80°C até o momento das análises de acordo com cada ensaio. Todos os procedimentos realizados na coleta de material serão acompanhados pelo orientador.

Análises em plasma

Avaliação do perfil bioquímico

Os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis, glicose, HOMA, leptina e insulina serão determinados utilizando kits comerciais seguindo as recomendações do fabricante.

Análises em estruturas cerebrais, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e intestino

Determinação dos complexos da CTE

As atividades dos complexos I, II, III e IV serão determinados de acordo com o método de Spinazzi (Spinazzi et al., 2012). Os resultados serão expressos como nmol/min. mg de proteína.

Enzimas do ciclo de Krebs

A enzima citrato sintase será determinada segundo Spinazzi (Spinazzi et al., 2012) e a enzima Isocitrato desidrogenase será determinada de acordo com Plaut (Plaut, 1968).

Proteínas

As proteínas nas amostras de tecido serão determinadas de acordo com (Lowry et al., 1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico: será realizada pelo método de Buege e Aust (Buege & Aust, 1978). A curva de calibração será realizada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, seguindo o mesmo tratamento das amostras. Os resultados serão calculados em nmol de MDA/mg proteína.

Sulfidrilas: Esse método é baseado na redução do 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) cuja absorção é mensurada espectrofotometricamente a 412 nm (Aksenov & Markesbery, 2001). Resultados serão reportados como nmol TNB/mg de proteína.

Enzima antioxidante – Catalase: Será determinada de acordo com método descrito por Aebi (H. Aebi, 1984). Os resultados serão expressos em unidade de atividade para a catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μ mol de H_2O_2 /min/mg de proteína).

Enzima antioxidante – Superóxido dismutase (SOD): SOD será avaliado quantificando a inibição de superóxido dependente da autooxidação da epinefrina, verificando a absorção das amostras em 490 nm de acordo com Misra e Fridovich (Misra & Fridovich, 1972). SOD será expresso como a quantidade de enzima que inibe a oxidação de epinefrina em 50%, o que é igual a uma unidade. O resultado será expresso em unidade/mg de proteína.

Determinação proteica: As proteínas serão determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (Lowry et al., 1951).

Análise Histológica do Fígado

Amostras do fígado serão coletadas e fixadas para processamento histológico e coloração com HE para análise morfológica. A amostra será armazenada em solução fixadora de formol tamponado 4% por um período mínimo de 24 horas.

Análise Morfológica do Tecido Adiposo

O tecido adiposo branco epididimal dos animais será removido e fixado em solução de formalina 10%. O tecido será processado e incorporado em parafina, cortes de 4µm serão preparados e corados com hematoxilina-eosina; as áreas coradas são analisadas ao microscópio ótico com aumento de x200.

Análises comportamentais

Os animais serão submetidos a testes comportamentais no início do estudo e no momento da eutanásia. Os animais que serão eutanasiados em T1 terão um intervalo de 8 semanas entre os testes, e os animais que seguirem no estudo terão 16 semanas entre os testes, pois serão realizados ao final de T2.

Entre um teste comportamental e outro haverá um intervalo de 3 a 5 dias. Todos os registros comportamentais serão registrados em vídeo e as análises comportamentais serão feitas no programa The Observer ® (Noldus).

A locomoção dos animais será avaliada no teste do campo aberto durante o ciclo claro, por 5 minutos, conforme previamente descrito por (Blanchard & Blanchard, 1990). Depois da realização do teste no campo aberto, a memória de curto prazo será avaliada no teste do reconhecimento de objetos durante o ciclo claro, por 5 minutos, conforme previamente descrito por (Ennaceur & Delacour, 1988).

Também conhecido como Teste de Borrifada da Sacarose (TBS), o Splash test avalia o comportamento espontâneo e motivacional de autolimpeza (“grooming”) após a borrifada de uma solução de sacarose a 10% no dorso do animal. Neste teste, inicialmente os animais serão habituados a uma caixa de

polipropileno revestida com papel contact preto, medindo (30x20x13 cm) durante 20 minutos. Neste período, essa gaiola ficará com a tampa na parte superior para que o animal não possa escapar. Após a habituação, a tampa será retirada e, no mesmo ambiente, será borrifada uma solução de 10% de sacarose no dorso do animal. Todo o procedimento será gravado para posterior análise e os parâmetros comportamentais avaliados manualmente serão: a latência para o primeiro grooming e o tempo em que o animal permaneceu realizando a autolimpeza durante os 6 minutos de teste.

O comportamento impulsivo dos animais será avaliado através do teste de tolerância ao atraso da recompensa, em um protocolo adaptado de Bizot e colaboradores (Bizot et al., 2007). O protocolo é dividido em quatro diferentes fases:

Habituação: no primeiro dia de experimento os animais serão submetidos a duas sessões de habituação. Em cada sessão, os animais serão colocados individualmente no braço de partida e poderão explorar livremente o aparato por 5 minutos. Durante este período, será permitido aos animais comerem as recompensas alimentares presentes na porção final de cada um dos braços.

Pré-treino: a partir do segundo dia, as recompensas pequena e grande passarão a ser colocadas sempre nos braços determinados para cada animal. O pré-treino será realizado durante 3 dias, com duas sessões diárias de cinco treinos. Durante esta fase, todas as portas permaneceram abertas, com os animais tendo livre acesso e podendo comer a recompensa de ambos os braços. Após consumir as recompensas, os animais serão removidos do aparato e devolvidos a sua caixa-moradia para um intervalo entre os treinos de 2 a 3 min.

Treino: assim como no pré-treinamento, nesta fase será permitido aos animais entrarem no braço contendo a recompensa pequena e a recompensa grande. No entanto, ao escolher um dos braços a porta contida em seu início era fechada assim que o animal a cruzasse, evitando que pudesse voltar ou escapar para o outro braço. A segunda porta deste braço permanecerá aberta para

permitir o livre acesso a sua recompensa alimentar. Após comer a recompensa, os animais serão devolvidos a sua caixa-moradia para o intervalo entre os treinos. Nesta fase serão realizadas duas sessões diárias, cada uma composta de cinco treinos. Para concluir o treinamento e passar para a próxima fase, o animal deverá atingir o critério de selecionar a recompensa grande em pelo menos 80% dos treinos em um mesmo dia de treino (oito de dez treinos). Estipula-se que, independentemente da performance, os animais permanecerão por um mínimo de 5 dias nesta fase antes de prosseguir para o teste.

Teste: nesta fase, será estipulado um período de espera antes de o animal ter acesso a grande recompensa. Ao entrar no braço com a grande recompensa, ambas as portas serão fechadas, confinando o animal no espaço entre as portas por um período de 8, 15 ou 30 segundos. Após este período, a porta distal era aberta e, aí sim, o animal terá acesso à recompensa. Caso o animal entre no braço que leva à recompensa a porta proximal deste braço será fechada mas nenhum atraso será imposto para o acesso a essa recompensa. Cada período de espera (8, 15 ou 30 segundos) será realizado por um período de cinco dias consecutivos. Na fase de teste os animais serão submetidos a uma única sessão diária de cinco treinos, e o número de escolhas das recompensas pequena e imediata ou grande mas atrasada será registrado. Neste protocolo, a incapacidade de esperar pela grande recompensa será considerada uma medida de comportamentos associados à escolha impulsiva.

Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo serão analisados através do programa SPSS. A normalidade dos dados será analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise das variáveis quantitativas que apresentem distribuição normal será realizada através de ANOVA de duas vias, conforme necessário será utilizado como teste post hoc Duncan. Caso os dados não apresentem distribuição normal serão utilizados os testes de Friedman e Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

LOCAL DE REALIZAÇÃO

Este projeto será realizado nas dependências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, a qual possui os recursos necessários para a execução do projeto. O mesmo será realizado no laboratório 502 do prédio 3.

CRONOGRAMA

Plano de trabalho e cronograma de atividades para execução do projeto de pesquisa.

Atividades	2021	2022	2023	2024
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Encaminhamento ao CEUA	X			
Desenvolvimento do experimento (dieta/ suplementação/ coleta de dados/ material)		X	X	
Avaliação do perfil bioquímico		X	X	

Determinação do estado redox		X	X	
Análises morfológicas		X	X	
Análises dos resultados		X	X	X
Redação do artigo		X	X	X
Apresentação da tese				X

ORÇAMENTO

O projeto será submetido às agências de fomento para obtenção dos recursos necessários à sua execução. Parte dos materiais e os equipamentos já estão disponíveis na instituição.

Itens	Valor
Dietas (hiperglicídica, hiperlipídica e hiperproteica) +probióticos	R\$ 20.000,00
Reagentes	R\$ 7.000,00
Material de consumo	R\$ 1.000,00
Total	R\$ 28.000,00

ASPECTOS ÉTICOS

As normas éticas que definem o uso de animais de laboratório para fins de estudos científicos serão adotadas e o projeto será submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFCSPA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abildgaard, A., Elfving, B., Hokland, M., Wegener, G., & Lund, S. (2017). Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. *Psychoneuroendocrinology*, 79, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.02.014>
- Adilah, Z. N., Liew, W. P. P., Redzwan, S. M., & Amin, I. (2018). Effect of High Protein Diet and Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota Supplementation in Aflatoxin B1-Induced Rats. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9568351>
- Aksenov, M. Y., & Markesbery, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- Astrup, A., Ryan, L., Grunwald, G. K., Storgaard, M., Saris, W., Melanson, E., & Hill, J. O. (2000). The role of dietary fat in body fatness: Evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies. *British Journal of Nutrition*, 83(SUPPL. 1), 1545–1552. <https://doi.org/10.1017/s0007114500000921>
- Banting, W. (1863). *Letter on Corpulence, Addressed to the Public* (3rd ed.).
- Bernardis, L. L. (1970). Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. *Experientia*, 26(7), 789–790. <https://doi.org/10.1007/BF02232553>
- Bizot, J. C., Chenault, N., Houzé, B., Herpin, A., David, S., Pothion, S., & Trovero, F. (2007). Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacology*, 193(2), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0781-4>

- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1990). Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14(4), 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80068-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80068-5)
- Blundell, J. E., Goodson, S., & Halford, J. C. G. (2001). Regulation of appetite: Role of leptin in signalling systems for drive and satiety. *International Journal of Obesity*, 25, S29–S34. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801693>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/71/1/012004>
- Buettner, R., & High-fat, L. C. B. (2007). High-fat Diets : Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. 15(4).
- Buzaleh, A. M., Maria, A., & Battle, D. C. (2005). Glutathione depletion and anaesthesia in mice alter heme and drug metabolising enzymes. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.01.007>
- Carnevali, L., Montano, N., Statello, R., & Sgoifo, A. (2017). Neuroscience and Biobehavioral Reviews Rodent models of depression-cardiovascular comorbidity : Bridging the known to the new. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.11.006>
- Carnevali, L., Statello, R., & Sgoifo, A. (2018). The Utility of Rodent Models of Stress for Disentangling Individual Vulnerability to Depression and Cardiovascular Comorbidity.
- Ceolin, P., DE FRANÇA, S. A., Froelich, M., Dos Santos, M. P., Pereira, M. P., Queiroz, T. S., Da Silva, F. H. S., Lisboa, P. C., Andrade, C. M. B., Baviera, A. M., & Kawashita, N. H. (2019). A low-protein, high carbohydrate diet induces increase in serum adiponectin and preserves glucose homeostasis in rats. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(2), 1–12. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180452>

- Chen, J., Wang, R., Li, X. F., & Wang, R. L. (2012). Bifidobacterium adolescentis supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *The British Journal of Nutrition*, 107(10), 1429–1434. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004491>
- Cocchetto, D. M., & Bjornsson, T. D. (1983). LITERATURE SURVEY Methods for Vascular Access and Collection of Body Fluids from the Laboratory Rat.
- Cunnane, S. C. (2005). Origins and evolution of the Western diet: Implications of iodine and seafood intakes for the human brain [1]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 483. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.2.483>
- Dias, Vera Junn, Eunsung Mouradian, M. M. (2008). Reward Mechanisms in Obesity: New Insights and Future Directions. *National Institute of Health*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.016.Reward>
- Egecioglu, E., Skibicka, K. P., Hansson, C., Alvarez-Crespo, M., Anders Friberg, P., Jerlhag, E., Engel, J. A., & Dickson, S. L. (2011). Hedonic and incentive signals for body weight control. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 12(3), 141–151. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9166-4>
- El-Khadragy, M. F., Al-Olayan, E. M., Elmallah, M. I. Y., Alharbi, A. M., Yehia, H. M., & Abdel Moneim, A. E. (2019). Probiotics and yogurt modulate oxidative stress and fibrosis in livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2406-3>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>

- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & De Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes and Nutrition*, 6(3), 209–240. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0229-7>
- H. Aebi. (1984). Catalase invitro. *Methods Enzymol.*, 6, 105–121.
- Holzapfel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35(2–3), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00171-5)
- Jacka, F. N., Cherbuin, N., Anstey, K. J., Sachdev, P., & Butterworth, P. (2015). Western diet is associated with a smaller hippocampus: A longitudinal investigation. *BMC Medicine*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0461-x>
- Kaprinay, B., Lipták, B., Slovák, L., Švík, K., Knezl, V., Sotníková, R., & Gáspárová, Z. (2016). Hypertriglyceridemic Rats Fed High Fat Diet as a Model of Metabolic Syndrome. *Physiol. Res*, 65, 515–518. www.biomed.cas.cz/physiolres
- Kiple, K. F., & Ornelas, K. C. (Eds.). (2000). *The Cambridge World History of Food*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CHOL9780521402149>
- Kitada, M., Ogura, Y., Monno, I., & Koya, D. (2019). The impact of dietary protein intake on longevity and metabolic health. *EBioMedicine*, 43, 632–640. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.005>
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., & Zilmer, M. (2003). Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 90(2), 449–456. <https://doi.org/10.1079/bjn2003896>
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., & Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics.

- International Journal of Food Microbiology, 72(3), 215–224.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00674-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00674-2)
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1406–1420.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.05.007>
- Lin, M., & Chang, F. (2000). Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(8), 1617–1622.
- Longland, T. M., Oikawa, S. Y., Mitchell, C. J., Devries, M. C., & Phillips, S. M. (2016). High protein exercise caloric restriction promotes greater lean mass gain and fat mass loss. *Am J Clin Nutr*, July, 738–746.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.115.119339.Hypoenergetic>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase * Autoxidation of. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–1175.
- Morris, M. C., & Tangney, C. C. (2014). Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiology of Aging*, 35(SUPPL.2).
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.038>
- Mukherjee, S., Joardar, N., Sengupta, S., & Sinha Babu, S. P. (2018). Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 111–128. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.010>

- Neag, M. A., Catinean, A., Muntean, D. M., Pop, M. R., Bocsan, C. I., Botan, E. C., & Buzoianu, A. D. (2020). Probiotic bacillus spores protect against acetaminophen induced acute liver injury in rats. *Nutrients*, 12(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu12030632>
- Nelson, David L.; Cox, M. M. (2014). *Princípios de bioquímica de Lehninger* (Artmed (Ed.); 6a edição).
- Park, D. Y., Ahn, Y. T., Park, S. H., Huh, C. S., Yoo, S. R., Yu, R., Sung, M. K., McGregor, R. A., & Choi, M. S. (2013). Supplementation of *Lactobacillus curvatus* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059470>
- Plaut, A. (1968). Transference phenomena in alcoholism. *Technique in Jungian Analysis*, 200–216. <https://doi.org/10.4324/9780429480898>
- Psaltopoulou, T., Hatzis, G., Papageorgiou, N., Androulakis, E., Briasoulis, A., & Tousoulis, D. (2017). Socioeconomic status and risk factors for cardiovascular disease: Impact of dietary mediators. *Hellenic Journal of Cardiology*, 58(1), 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2017.01.022>
- Rezin, G. T., Gonçalves, C. L., Daufenbach, J. F., Carvalho-Silva, M., Borges, L. S., Vieira, J. S., Hermani, F. V., Comim, C. M., Quevedo, J., & Streck, E. L. (2010). Effect of chronic administration of ketamine on the mitochondrial respiratory chain activity caused by chronic mild stress. *Acta Neuropsychiatrica*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2010.00500.x>
- Rickman, C., Iyer, A., Chan, V., & Brown, L. (2010). Green Tea Attenuates Cardiovascular Remodeling and Metabolic Symptoms in High Carbohydrate-Fed Rats. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(8), 881–886. <https://doi.org/10.2174/138920110793261980>

- Roberts, R. O., Roberts, L. A., Geda, Y. E., Cha, R. H., Pankratz, V. S., O'Connor, H. M., Knopman, D. S., & Petersen, R. C. (2012). Relative intake of macronutrients impacts risk of mild cognitive impairment or dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, 32(2), 329–339. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120862>
- Silva, V. de O., Foureaux, R. de C., Araujo, T. S., Peconick, A. P., Zangeronimo, M. G., & Pereira, L. J. (2012). Effect of probiotic administration on the immune response: A systematic review of experimental models in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(5), 685–694. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000500007>
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., & Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols*, 7(6), 1235–1246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>
- Travers, M. A., Florent, I., Kohl, L., & Grellier, P. (2011). Probiotics for the control of parasites: An overview. *Journal of Parasitology Research*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/610769>
- Türkan, H., Bukan, N., Sayal, A., Aydin, A., & Hakan Bukan, A. M. (2004). Effects of Halothane, Enflurane, and Isoflurane on Plasma and Erythrocyte Antioxidant Enzymes and Trace Elements. *Biological Trace Element Research*, 102.
- Ubeda, C., Djukovic, A., & Isaac, S. (2017). Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clinical and Translational Immunology*, 6(2), e128-10. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.2>
- Westerterp-Plantenga, M. S., Lejeune, M. P. G. M., Nijs, I., Van Ooijen, M., & Kovacs, E. M. R. (2004). High protein intake sustains weight maintenance

- after body weight loss in humans. *International Journal of Obesity*, 28(1), 57–64. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802461>
- WHO. (2020). Non-communicable diseases. In *World Health* (Issue Oct). https://doi.org/10.5005/jp/books/11410_18
- Yadav, H., Jain, S., & Sinha, P. R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 23(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.002>
- Yesilkaya, A., Ertug, Z., Yegin, A., Melikoglu, M., & Baskurt, O. K. (1998). Deformability and Oxidant Stress in Red Blood Cells under the Influence of Halothane and Isoflurane Anesthesia. *Gen. Pharmac*, 31(1), 33–36.
- Zapata Posada, Á. P. (2020). Dietas hiperproteicas y la función renal en deportistas. <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/153320>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em
medicina regenerativa**

Orientadora: Prof^ª Dr^a Márcia Rosângela Wink

Alunos

Thaís Casagrande Paim - Doutoranda, UFCSPA

Isadora Bertaco dos Santos- Iniciação Científica, UFCSPA

Março, 2021

RESUMO

Metais biodegradáveis têm sido propostos para aplicações cardiovasculares e é esperado que eles se degradem por corrosão após providenciar o suporte estrutural pelo tempo necessário para que ocorra a regeneração do tecido doente. Um destes metais é o ferro, o qual é naturalmente encontrado no organismo e tem propriedades mecânicas adequadas para o uso em stents biodegradáveis. Uma vez que o excesso de ferro pode trazer danos ao organismo é importante verificar as consequências dos produtos de degradação de uma prótese feita de ferro moldado por injeção a nível molecular e celular. Por isso, buscamos entender como as células endoteliais se comportam em contato com o ferro, bem como elucidar se as ectoenzimas do sistema purinérgico são afetadas, uma vez que os nucleotídeos têm importante papel na resposta a processos inflamatórios crônicos como o decorrente da aterosclerose e também na agregação plaquetária. O trabalho será desenvolvido em duas fases. Na primeira etapa do trabalho será avaliado *in silico* a expressão gênica das ectoenzimas e receptores do sistema purinérgico em células HUVECs cultivadas na presença de diferentes biomateriais. Na segunda etapa serão realizados ensaios *in vitro* com as HUVECs isoladas de tecido humano de descarte hospitalar, para avaliar a possível citotoxicidade após contato indireto com o ferro e a capacidade das células em hidrolisar o ATP, ADP e AMP a fim de avaliar possível alteração na expressão das enzimas CD39 e CD73.

Palavras-chave: Biomateriais, Células Endoteliais, Biocompatibilidade, Sinalização Purinérgica.

1. INTRODUÇÃO

1.1 METAIS BIODEGRADÁVEIS

Metais biodegradáveis têm sido propostos para aplicações cardiovasculares e ortopédicas e é esperado que eles desapareçam por corrosão após providenciar o suporte estrutural pelo tempo necessário para que ocorra a regeneração do tecido. No entanto, é imprescindível que os contaminantes de todas etapas de produção sejam identificados, bem como os produtos de degradação liberados no organismo (MANTOVANI; WITTE, 2013; RYU; SEO; ROGERS, 2021).

Os metais biocorrosíveis são promissores candidatos ao uso em stents, pois propiciam um arcabouço provisório para o vaso e evitam problemas clínicos a longo prazo (BOWEN *et al.*, 2016). Um stent biodegradável ideal deve garantir a integridade dinâmica funcional do vaso durante a sua degradação e ter propriedades mecânicas semelhantes ao aço inoxidável 316L, considerado o padrão ouro (HERMAWAN; DUBÉ; MANTOVANI, 2010).

Stents feitos com ferro têm sido propostos para uso temporário no sistema vascular, uma vez que esse material é biodegradável e naturalmente presente no organismo (FRANCIS *et al.*, 2015; SCARCELLO; LISON, 2019). As propriedades mecânicas destes são semelhantes aos tradicionais stents de aço. Outra vantagem é que o ferro é rádio-opaco, não se fazendo necessário o uso de marcadores de fluorescência para acompanhar a endoprótese (AUERBACH; BALLARD, 2010).

A maioria dos metais para implantação cirúrgica são fabricados por moldagem e métodos de tratamento termomecânico (HERMAWAN *et al.*, 2008; MORAVEJ; MANTOVANI, 2011). Recentemente, novos processos de produção estão sendo explorados, visando o sucesso terapêutico e também a redução de custos para a manufatura. A Moldagem De Pós Metálicos Por Injeção (MMI) é uma dessas técnicas, mas ainda há escassos estudos utilizando essa metodologia para a fabricação de stents (MARIOT *et al.*, 2016).

Stents de ferro, produzidos por técnicas diferentes da MMI, têm sido experimentados em animais, apresentando potencial uso médico. No entanto, não foram realizados ensaios clínicos e a literatura carece de mais dados que verifiquem a segurança e eficácia destes dispositivos (PEUSTER, M. *et al.*, 2001; PEUSTER, Matthias *et al.*, 2006; WAKSMAN *et al.*, 2008). Apesar de ser fundamental para as funções biológicas, o excesso de ferro leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode causar danos teciduais, por isso a necessidade de estudar as consequências dos produtos de degradação de uma prótese feita de ferro a nível molecular, celular e tecidual (KOHGO *et al.*, 2008).

1.2 CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)

As células endoteliais vasculares organizam-se em uma monocamada celular, o endotélio, que reveste o lúmen de todos os vasos sanguíneos. Ele atua no controle de trocas gasosas a nível pulmonar, regula o fluxo de células sanguíneas circulantes e moléculas bioativas. O modelo clássico para o estudo dos diferentes aspectos das funções e alterações do endotélio utiliza as Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVECs). Elas são importantes no estudo da toxicidade e trombogenicidade dos stents cardiovasculares, uma vez que atuam na endotelização do vaso após a implantação da prótese (BAUDIN *et al.*, 2007).

1.3 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Entre os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), a molécula adenosina trifosfato (ATP) desenha um papel central na sinalização durante condições injúria ou dano celular por ser liberada no meio extracelular por células ativadas ou danificadas. No espaço extracelular, o ATP atua como uma molécula sinalizadora de perigo, também denominado com sinal de “*find me*”, desencadeando a cascata da sinalização purinérgica, o qual é composto por receptores purinérgicos e ectoenzimas. Os receptores purinérgicos são divididos em receptores metabotrópicos P1 (A1, A2A, A2B e A3) associados à adenosina (ADO), receptores ionotrópicos P2X (P2X1-7) e receptores metabotrópicos P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11-14) (BERTONI *et al.*, 2020). A hidrólise dos nucleotídeos ocorre principalmente pela ação das ectoenzimas E-NTPDase1/CD39 (catalisa a hidrólise de ATP e adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP)) e da ecto-5'-nucleotidase/CD73 (catalisa a hidrólise de AMP em ADO) (GACHET; HECHLER, 2020). Neste contexto, o aumento da expressão dessas enzimas e receptores podem ser utilizados como marcadores precoces de dano ou injúria tecidual e também afetar a agregação plaquetária que são fatores importantes no processo de aterosclerose e remodelação do vaso após a inserção do stent (MÜLLER; BAQI; NAMASIVAYAM, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Cada vez mais diferentes biomateriais estão sendo propostos para uso vascular, porém poucos estudos avaliam como o sistema purinérgico pode ser afetado pelos elementos que compõem esses materiais. Como o Ferro é um dos metais propostos para uso em stents cardiovasculares é importante estudar como as células endoteliais se comportam em contato com ele, buscando elucidar se o sistema purinérgico é afetado, uma vez que ele tem importante papel na resposta a processos inflamatórios crônicos como o decorrente da aterosclerose e também atua na agregação plaquetária.

O material a ser testado, o ferro moldado por injeção, resulta de uma parceria com o Laboratório de Transformação Mecânica da UFRGS que trabalha no desenvolvimento de um protótipo de stent cardiovascular feito de ferro puro. Esse ferro tem uma variação no método de produção que nunca foi publicado na literatura para fins médicos. O projeto é a continuação de um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo, ao qual analisamos e comparamos a biocompatibilidade do ferro com purezas 99,5% e 99,95% P.A (Pureza Absoluta) e encontramos que o ferro com maior pureza é mais biocompatível (PAIM *et al.*, 2020).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento das células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), após contato com ferro puro proposto como biomaterial para uso em stents cardiovasculares.

Objetivos específicos que deverão ser alcançados pelo bolsista

1. Adquirir habilidades para trabalhar em equipe, fazer revisão bibliográfica em busca de dados relevantes ao projeto;
2. Entender o funcionamento de bancos de dados da plataforma GEO do NCBI e a partir dela avaliar a expressão gênica das ectoenzimas e receptores do sistema purinérgico em células HUVECs cultivadas na presença de diferentes biomateriais.
3. Isolar, caracterizar e cultivar células endoteliais da veia umbilical humana;
4. Avaliar a viabilidade das HUVECs após cultivo indireto com o ferro moldado por injeção.
5. Analisar o potencial de hidrólise de ATP, ADP e AMP nas HUVECs tratadas com o extrato de ferro por atividade enzimática

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Análise de Banco de Dados: Para realizar análise da expressão gênica das ectoenzimas e receptores do sistema purinérgico em células HUVECs cultivadas na presença de diferentes biomateriais, serão utilizados bancos de dados públicos disponíveis na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO) do NCBI disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Será realizada pesquisa por palavras-chave como [(“HUVECs” ou “endothelial cell”) and “biomaterial”] e selecionado tipo de estudo com perfil de expressão por microarray, RNAseq e por RT-qPCR. Após pesquisar por bancos de dados que se encaixem nessas características será feito download e a análise dos níveis de expressão serão organizados em planilhas de Excel, e posteriormente, a análise estatística desses dados será realizada pelo software Graphpad.

4.2 ANÁLISE *IN VITRO*

Materiais: Amostras de ferro moldadas por injeção, serão fornecidas pelo Dr. Diego Wermuth, pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto, fomentado pelo Programa de Pesquisa para o SUS, consiste no desenvolvimento e estudo de intervenções endovasculares produzidas por MMI.

Cultura Celular: Cordões umbilicais serão obtidos de partos a termo realizados na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre com o consentimento das mães através da assinatura do TCLE (CEP- UFCSPA: 3.214.091 e CEP - ISCMPA: 3.029.141). Após a coleta do cordão que seria descartado, a extração das HUVECs será realizada conforme protocolos de isolamento já descritos na literatura (BAUDIN *et al.*, 2007; LOY *et al.*, 2017). Resumidamente, a veia umbilical será lavada com PBS, as células serão tripsinizadas gerando uma suspensão celular que será cultivada. As HUVECs serão mantidas em meio 199 contendo fatores de crescimento e 20% de SFB. As células isoladas serão caracterizadas por imunofluorescência com os anticorpos contra CD31 e fator de von Willebrand, marcadores típicos de células HUVEC. As células serão usadas até a quinta passagem (BAUDIN *et al.*, 2007; LOY *et al.*, 2017).

Análise da citotoxicidade in vitro: O extrato para os ensaios de citotoxicidade in vitro serão obtidos conforme a ISO 10993 que guia os ensaios para análise da biocompatibilidade de materiais para uso em dispositivos biomédicos. As amostras de ferro serão autoclavadas e imediatamente incubadas com o meio padrão para células na proporção de 0,2g/ ml de meio por 24 e 72 h à 37 ± 0.1 °C e 5% CO₂. O extrato obtido será usado como tratamento para as células endoteliais. (BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES - PART 5: TESTS FOR IN VITRO CYTOTOXICITY (ISO 10993-5:2009), 2009).

Análise da viabilidade celular - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT)

O ensaio de MTT será utilizado para determinar a viabilidade das células submetidas ao contato indireto com o ferro. O ensaio será conduzido conforme já descrito pelo nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 2019). As HUVECs serão submetidas ao extrato de ferro nas concentrações de 100, 50, 10 e 1%. O controle receberá o meio padrão para as células. Após 24 e 72 h, procede-se a incubação com o MTT por 3 h a 37°C. Nesse período, o sal da reação é reduzido na mitocôndria das células vivas à cristais de formazan. Logo, essa redução será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. A solução de MTT será removida, adicionado dimetil sulfoxido (DMSO) e a densidade óptica determinada. Os resultados serão expressos em porcentagem e calculados estatisticamente em comparação ao controle (Células tratadas com meio padrão para as células) . O procedimento será realizado em triplicata com pelo menos 5 repetições.

Hidrólise de nucleotídeos: Para avaliar a funcionalidade das enzimas, será realizada análise do potencial de hidrólise de ATP, ADP e AMP nas HUVECs tratadas com o extrato de ferro por atividade enzimática conforme descrito por (WINK *et al.*, 2003). As células serão cultivadas em microplacas de 24 poços até a confluência e lavadas três vezes com meio de incubação contendo NaCl 120 mM, KCl 5 mM, 10 mM glicose, Hepes 20 mM e CaCl₂ 2 mM (para ATP e ADP) ou MgCl₂ 2 mM (para AMP) em pH 7,4. A reação será iniciada pela adição de 200 µL do meio de incubação contendo ATP, ADP ou AMP (1 mM) por 30 min a 37 ° C. Para interromper a reação, será transferida uma alíquota do meio de incubação celular (150 µL) para um tubo contendo ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 5% (p / v). A produção de fosfato inorgânico (Pi) será medida usando o método do verde malaquita. Para determinar a hidrólise espontânea dos nucleotídeos durante a incubação, o meio será incubado com seu respectivo nucleotídeo sem células. Para correção proteica, as células nas microplacas

de 24 poços serão secas e solubilizadas com 100 µL de NaOH 1 N e a proteína medida pelo método do azul de Coomassie, usando albumina de soro bovino como padrão. A hidrólise de ATP, ADP e AMP serão expressas como nmol Pi / min / mg de proteína.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

No desenvolvimento de habilidades com a plataforma GEO serão utilizados bancos de dados disponibilizados publicamente. Os ensaios *in vitro* fazem parte de objetivos do projeto intitulado “Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa” que foi aprovado pelos CEPs da UFCSPA, sob número 3.214.091, e da ISCMPA, sob número 3.029.141.

5. ORÇAMENTO

O Laboratório de Biologia Celular da UFCSPA possui os equipamentos científicos necessários para o desenvolvimento do projeto, como estufa com CO₂, cabine de fluxo laminar, geladeira, freezer, sistema de destilação e deionização de água, bem como a maioria dos reagentes necessários para realização do cultivo celular e atividade enzimática. Os incrementos dos recursos físicos (material de consumo) estão previstos na tabela abaixo e serão financiados por FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 – PPSUS (17/2551-0001) e CNPq MS-SCTIE-Decit/CNPq no 12/2018 (441575/2018-8).

Material de Consumo	Valor
Meio de Cultura, soro e fatores de crescimento, Tripsina e antibióticos para cultura de células	R\$ 2.000,00
Insumos para os ensaios de viabilidade celular	R\$ 2.000,00
Reagentes para atividade enzimática	R\$ 3.500,00
Total	R\$ 7.500,00

6. CRONOGRAMA

Atividades/Descrição	Ago/Set	Out/Nov	Dez/Jan	Fev/Mar	Abr/Mai	Jun/Jul
1 Habilidade de busca e discussão de artigos pertinentes ao tema	X	X	X	X	X	X
2 Desenvolvimento de habilidade com a plataforma GEO do NCBI	X	X	X	X	X	X
3 Desenvolvimento de habilidades no laboratório/ Preparo de reagentes			X	X	X	
4 Desenvolvimento de habilidades em isolamento, caracterização e cultivo de HUVECs			X	X	X	
5 Realização do ensaio de viabilidade celular			X	X		
6 Realização de atividade enzimática				X	X	
7 Preparação para a apresentação dos resultados			X	X	X	X

7. REFERÊNCIAS

- AUERBACH, M.; BALLARD, H. Clinical use of intravenous iron: administration, efficacy, and safety. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, [s. l.], v. 2010, p. 338–347, 2010.
- BAUDIN, B. *et al.* A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. **Nature protocols**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 481–485, 2007.
- BERTONI, A. P. S. *et al.* Biochemical analysis of ectonucleotidases on primary rat vascular smooth muscle cells and in silico investigation of their role in vascular diseases. **Life sciences**, [s. l.], v. 256, p. 117862, 2020.
- Bertoni APS, de Campos RP, Tamajusuku ASK, Stefani GP, Braganhol E, Battastini AMO, Wink MR. **Biochemical analysis of ectonucleotidases on primary rat vascular smooth muscle cells and in silico investigation of their role in vascular diseases**. Life Sci. 2020 Sep 1;256:117862.
- BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES - PART 5: TESTS FOR IN VITRO CYTOTOXICITY (ISO 10993-5:2009). [S. l.: s. n.], 2009.
- BOWEN, P. K. *et al.* Biodegradable Metals for Cardiovascular Stents: from Clinical Concerns to Recent Zn-Alloys. **Advanced healthcare materials**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 1121–1140, 2016.
- FRANCIS, A. *et al.* Iron and iron-based alloys for temporary cardiovascular applications. **Journal of materials science. Materials in medicine**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 138, 2015.
- GACHET, C.; HECHLER, B. Platelet Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. **Hamostaseologie**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 145–152, 2020.
- HERMAWAN, H. *et al.* **Iron–manganese: new class of metallic degradable biomaterials prepared by powder metallurgy**. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1179/174329008x284868>
- HERMAWAN, H.; DUBÉ, D.; MANTOVANI, D. **Developments in metallic biodegradable stents**★. [S. l.: s. n.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.006>
- KOHGO, Y. *et al.* **Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload**. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0120-5>
- LOY, C. *et al.* **A planar model of the vessel wall from cellularized-collagen scaffolds: focus on cell–matrix interactions in mono-, bi- and tri-culture models**. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6bm00643d>
- MANTOVANI, D.; WITTE, F. Acta Biomaterialia Special Issue: 4th Biometal 2012, Maratea, Italy: August 27-September 1, 2012. **Acta biomaterialia**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 8474, 2013.
- MARIOT, P. *et al.* **An investigation on the properties of injection-molded pure iron potentially for biodegradable stent application**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.042>

MORAVEJ, M.; MANTOVANI, D. Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 4250–4270, 2011.

MÜLLER, C. E.; BAQI, Y.; NAMASIVAYAM, V. Agonists and Antagonists for Purinergic Receptors. **Methods in molecular biology**, [s. l.], v. 2041, p. 45–64, 2020.

PAIM, T. C. *et al.* Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility of iron produced by powder metallurgy. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, [s. l.], v. 115, p. 111129, 2020.

PEUSTER, M. *et al.* A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. **Heart**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 563–569, 2001.

PEUSTER, M. *et al.* Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. **Biomaterials**, [s. l.], v. 27, n. 28, p. 4955–4962, 2006.

RODRIGUES, C. *et al.* Bioglass 45S5: Structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, [s. l.], v. 103, p. 109781, 2019.

RYU, H.; SEO, M.-H.; ROGERS, J. A. Bioresorbable Metals for Biomedical Applications: From Mechanical Components to Electronic Devices. **Advanced healthcare materials**, [s. l.], p. e2002236, 2021.

SCARCELLO, E.; LISON, D. Are Fe-Based Stenting Materials Biocompatible? A Critical Review of and Studies. **Journal of functional biomaterials**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2019.
Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jfb11010002>

WAKSMAN, R. *et al.* Short-term effects of biocorrodible iron stents in porcine coronary arteries. **Journal of interventional cardiology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 15–20, 2008.

WINK, M. R. *et al.* Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. **Cancer letters**, [s. l.], v. 198, n. 2, p. 211–218, 2003.

Imunopatogenia da COVID-19: avaliação do perfil imune inflamatório e de subpopulações celulares e suas correlações com a gravidade e desfechos clínicos

Projeto submetido ao Edital nº 01/2020 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA como requisito para ingresso no Curso de Mestrado

Candidata: Paula Coelho Teixeira

Orientador: Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Resumo

Desde o surgimento dos primeiros casos de COVID-19 na China, a doença se espalhou pelo mundo infectando milhares de pessoas, causando profundos impactos na sociedade em decorrência do grande número de mortes e adoecimento físico e mental. No momento não se dispõe de medicamentos efetivos e seguros e os estudos em andamento com vacinas e/ou medicamentos ainda estão em fase inicial. Apesar da maioria dos infectados pelo SARS-CoV-2 apresentarem quadro clínico leve ou assintomático, milhares de casos necessitarão de internação e podem evoluir a óbito. Conhece-se muito pouco sobre as consequências do SARS-CoV-2 sobre o sistema imune, marcadores de evolução clínica e possíveis sequelas, incluindo imunossupressão e dano pulmonar grave. De modo geral, a mortalidade e gravidade da doença estão relacionadas a uma hiperinflamação, linfopenia, disfunção na imunidade inata e adaptativa. Neste sentido, este estudo busca elucidar aspectos da imunopatogenia da COVID-19 através da caracterização da resposta inflamatória sistêmica, prospecção de novos biomarcadores e frequência e fenótipo de subpopulações de monócitos de pacientes com diferentes evoluções e desfechos clínicos.

Palavras chaves: COVID 19, inflamação, mediadores inflamatórios, monócitos

Equipe:

- Dr. Pedro R T Romão - Coordenador
- Dra. Ana Maria Sandri – Infectologista - Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
- Dr. Gilson Pires Dorneles – Lab de Imunologia celular e molecular da UFCSPA
- Dr. Paulo Renato Petersen Behar – UFCSPA/Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
- Paula Coelho Teixeira (Candidata ao Mestrado)

Projeto aprovado no CEP/UFCSPA: CAAE 31052720.6.0000.5345

Porto Alegre – Maio de 2020

Introdução:

Coronavírus são vírus de RNA altamente diversificado, pertencentes à família *Coronaviridae*, divididos em quatro gêneros: alfa, beta, gama e delta que causam doenças variando de suave a grave em humanos e animais (Drosten et al., 2003; Woo et al., 2010). Os primeiros coronavírus (CoV) descritos foram o vírus da bronquite infecciosa (IBV) que causa doenças respiratórias em galinhas, e os coronavírus humanos CoV-229E e CoV-OC43 causadores de doença semelhante à gripe ou pneumonia leve (Lim et al., 2016; Milek et al., 2018). Coronavírus causadores da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) foram responsáveis por doenças respiratórias graves ou fatais em 2002 e 2012, respectivamente (de Wit et al., 2016; Hilgenfeld and Peiris, 2013).

A partir de dezembro de 2019, ocorreram relatos de pacientes com pneumonia viral grave na cidade de Wuhan, China (Zhu et al., 2020). O sequenciamento rápido do vírus identificou um novo CoV como agente causador (Zhu et al., 2020). O novo CoV 2019 (2019-nCoV) foi identificado como sendo um betacoronavírus, distinto de SARS-CoV e MERS-CoV (WHO, 2020; GISAID, 2020), nomeado síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). A doença causada por SARS-CoV-2 foi nomeada doença de coronavírus (COVID-19). Em janeiro de 2020, a OMS declarou que o surto do novo coronavírus constituía uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional e em março de 2020 como pandemia. Até 22 de maio havia o registro de mais de 5,2 milhões de casos confirmados em 188 países, com mais de 337.000 mortes (<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>). O Brasil já confirmou mais de 330 mil casos da doença e o sistema de saúde de vários estados já está em colapso com falta de leitos e vagas em unidades de terapia intensiva.

Diante da pandemia é fundamental estudar os aspectos imunopatogênicos da doença, tendo em vista o impacto do SARS-CoV-2 sobre o sistema imune, a ausência de vacinas e medicamentos com eficácia clinicamente comprovada. Nossa proposta irá investigar biomarcadores inflamatórios sistêmicos ainda não avaliados nos estudos publicados, pois acreditamos que possam ter impacto na patogênese, bem como a relação entre frequência de subpopulações de monócitos

e seus marcadores de ativação ou inibição em relação à gravidade e desfechos clínicos.

Em pacientes com COVID-19 as principais alterações descritas incluem: linfopenia e tempestade de citocinas associadas à gravidade e óbito (Xu et al., 2020; Wan et al., 2020), alterações na frequência e fenótipo de células T CD4+, com desregulação na expressão intracelular de IL-17 e na via de sinalização interferon-MAPK (Giamarellos-Bourboulis et al., 2020; Huang et al., 2020), aumento de T CD4+ de memória central e redução na razão células virgens/memória (Wen et al., 2020; Chen et al., 2020), aumento da expressão de CD38 e HLA-DR em células T CD4+ e CD8+ (Thevarajan et al., 2020). Por outro lado, a frequência estável de linfócitos T CD8+ pode estar relacionada à proliferação de células T CD8+ de memória efetora e efectoras terminais, sugerindo que T citotóxicas tem papel na eliminação de SARS-CoV-2 (Wen et al., 2020). Além disso, a expressão de marcadores de exaustão (PD1 e TIM3) é maior em células T CD8+ de pacientes COVID-19 internados em UTI comparados a casos moderados ou controles saudáveis (Diao et al., 2020).

Um menor corpo de evidências sobre o perfil de monócitos circulantes foi identificado até o momento. A infecção por MERS-CoV foi associada a uma produção elevada de diversas citocinas pró-inflamatórias, sobretudo IL-8, CCL2 e RANTES, por monócitos circulantes (Fehr et al., 2017; Zhou et al., 2014). Um estudo utilizando um modelo de camundongo infectado com SARS demonstrou que a rápida cinética de replicação de SARS-CoV e baixa sinalização de interferon tipo I promoveu uma acumulação de monócitos pró-inflamatórios (Channappanavar et al., 2016). De fato, análise do tipo *single cells* revelaram um aumento na frequência de monócitos CD14+ expressando IL-1 β e IFN tipo I em pacientes COVID-19, sugerindo possível ativação da via do inflamossoma (Wen et al., 2020). De modo interessante, é proposto que o perfil pró-inflamatório exacerbado de monócitos circulantes pode ser uma boa estratégia de avaliação do perfil de macrófagos broncoalveolares, uma vez que a expressão gênica de ambas as células apresentaram alta similaridade em pacientes COVID-19 (Liao et al., 2020). Neste sentido, uma baixa frequência periférica de monócitos intermediários CD14+CD16+ em uma paciente diagnosticada com severidade moderada de COVID-19 foi associada com aumento do efluxo deste subtipo de monócito para o sítio de infecção (Thevarajan et al., 2020). Por outro lado, pacientes com COVID-19 grave em UTI apresentaram alta frequência periférica de monócitos intermediários

CD14+CD16+ e não-clássicos CD14-CD16+ em comparação a pacientes de casos moderados e controles saudáveis (Zhou et al., 2020). No entanto, o estado de ativação de monócitos parece estar desregulado, uma vez que Giamarellos-Bourboulis et al (2020) identificaram uma expressão moderada de HLA-DR em monócitos CD14+, estando em um estágio intermediário entre pacientes com sépsis e controles saudáveis. A baixa ativação monocitária é confirmada através da incubação de células mononucleares de pacientes com hiperativação imunológica (identificados com alto HLA-DR+) com o plasma de pacientes COVID-19, sendo reportado uma inibição significativa na expressão de HLA-DR em células CD14+. Por outro lado, o bloqueio do receptor de IL-6 com tocilizumab, restaurou parcialmente a expressão de HLA-DR em pacientes com COVID-19 (Giamarellos-Bourboulis et al., 2020). Nossa proposta buscará identificar alterações na frequência e fenótipo de subpopulações de monócitos em pacientes COVID com diferentes evoluções e desfechos clínicos.

Níveis elevados de neutrófilos no sangue são um indicativo precoce de infecção pelo SARS-CoV-2, podendo prever doença respiratória severa e desfechos mais graves (Zhang et al., 2020; Song et al., 2020). As redes extracelulares de neutrófilos (NETs) produzidas em excesso tem o potencial de iniciar e agravar a inflamação, especialmente nas vias aéreas (Porto e Stein, 2016). Dessa forma, a liberação exagerada de NETs durante a infecção por SARS-CoV-2 pode piorar o quadro da doença. De fato, a análise do soro de pacientes com COVID-19 revelou altos níveis de DNA, complexos mieloperoxidase (MPO)-DNA e histona H3 citrulinada (cit-H3). Assim, a análise da presença de NETs no soro de pacientes com COVID-19 e sua relação com a gravidade da doença é de extrema importância para o melhor entendimento da patogênese da COVID-19.

Estudos com pacientes criticamente doentes tem indicado que a morte está associada a escores de falência múltipla de órgãos e choque (Zhou et al., 2020; Li et al., 2020), sugerindo o papel da sepse viral na patogênese da doença. Neste sentido, tendo em vista a ação moduladora da nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) sobre a resposta inflamatória (para revisão ver Gavioli & Romão 2011), e os achados de níveis sistêmicos elevados de N/OFQ em pacientes que morreram de sepse bacteriana em comparação com sobreviventes (Williams et al., 2008) ou em fase de recuperação (Thompson et al., 2013), nossa hipótese é que o sistema

nociceptina-receptor NOP também possa estar envolvido na hiper inflamação, falência múltipla de órgãos e mortalidade de pacientes com COVID-19.

Como nossa intenção nesta proposta é explorar mecanismos imunopatogênicos ainda não avaliados na COVID-19, iremos focar em mediadores inflamatórios ainda não estudados, mas que são comuns em processos inflamatórios diversos e envolvidos na patogênese de inúmeras doenças, incluindo os mediadores lipídicos, leucotrieno B₄ (LTB₄) e prostaglandina E₂. O LTB₄ além de ser pró-inflamatório e envolvido na fisiopatogênese de doenças pulmonares, pode modular respostas imunes antibacterianas e antivirais (Le Bel et al., 2014), como demonstrado frente a influenza A através de mecanismos dependentes da ativação de NOD2 (Le Bel & Gosselin, 2015). Logo, o papel deste mediador na COVID-19 não parece ser tão previsível, não podendo ser negligenciado.

Com relação as prostaglandinas (PGs), além de ser pró-inflamatórias são potentes mediadores da comunicação intercelular. PGE₂ dependendo do tipo de receptor que atua inibe células Th₂, mas pode contribuir para diferenciação de Th₁ (EP₂/EP₄) e geração de Th₁₇ (EP₂/EP₄) juntamente com citocinas chaves como IFN-gama/IL-12 (para Th₁) e IL-23 (para Th₁₇) (Chengcan & Shuh, 2019). Em pacientes com COVID-19 não se conhece nada a respeito da modulação de prostaglandinas seja como mediadora do processo inflamatório ou inibindo subpopulações de monócitos/macrófagos ou células T, o que poderia ser associado a disfunção da imunidade adaptativa.

Por outro lado, infecções virais como SARS-CoV, vírus sincicial respiratório (RSV) e ebola causam doenças debilitantes, que levam à ativação do eixo HPA e secreção de cortisol (Thompson, 2003). Nos pacientes com COVID-19, assim como em pacientes com RSV e ebola, a linfopenia e alterações na atividade do sistema imune pode estar relacionada à ativação desse eixo. *Nossa hipótese é que mediadores inflamatórios lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) e cortisol induzido por ativação do eixo HPA podem modular a resposta inflamatória ao SARS-CoV-2, de citocinas e subpopulações de monócitos.*

Esta proposta se diferencia por investigar uma assinatura de mediadores inflamatórios sistêmicos, incluindo mediadores não avaliados tais como: nociceptina, LTB₄, PGE₂, além da avaliação de subpopulações de monócitos e perfil de neutrófilos em pacientes com diferentes graus de gravidade da COVID-19.

Justificativa

A caracterização das alterações imunológicas associadas à evolução clínica de pacientes com COVID-19, especialmente comparando os perfis imunes de pacientes com diferentes quadros clínicos/desfechos é fundamental para o conhecimento não só da imunopatogenia mas para proposição de abordagens vacinas/terapêuticas.

Este projeto será executado prioritariamente com pacientes do SUS atendidos na ISCMPA. De modo geral este estudo irá contribuir para caracterização do perfil inflamatório, subpopulações celulares/perfil migratório e de ativação e identificação de marcadores de gravidade considerando dados laboratoriais, evolução clínica (tempo de internação, dias na UTI, causa da morte, falência múltipla, sepse, etc). A definição de fatores prognósticos para gravidade através de análise multivariada contribuirá para tomada de decisão clínica, compreensão da imunopatogenia, fornecendo dados para abordagens farmacológicas/imunológicas futuras de acordo com o alvo identificado. A avaliação da frequência e fenótipo celular (ativação, atividade pró-inflamatória, regulatória, etc) e sua correlação com desfechos clínicos/gravidade permitirá avaliar o papel destas subpopulações na proteção (assintomáticos, casos leves) ou gravidade (pacientes críticos), permitindo caracterizar melhor a imunopatogênese da doença; Os achados clínicos mais frequentes e sua associação com marcadores imunológicos possibilitará entender a relação entre os sinais clínicos, alterações imunes e evolução do quadro dando subsídios para identificação de marcadores para uso no SUS.

Objetivo geral: Investigar os mecanismos imunopatogênicos da COVID-19 através da identificação de marcadores imunológicos relacionados à gravidade e óbitos em pacientes com diferentes quadros clínicos e desfechos

Objetivos específicos

- Quantificar as concentrações de citocinas (GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, TNF- α , TNF- β) no plasma de pacientes com COVID-19 (grupos doença assintomática ou casos leves, moderados e grave) e indivíduos controles não infectados;

- Determinar os níveis sistêmicos de nociceptina, prostaglandinas, leucotrieno B4 e cortisol no plasma de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados;
- Avaliar a expressão de NF- κ B em monócitos e a frequência periférica de monócitos CD14+CD16- (clássicos), CD14+CD16+ (intermediários), CD14-CD16+ (não-clássicos), CD14+CD16-/HLA-DR+ /CD69+ (estado de ativação celular) de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados;
- Analisar a produção de NETs no soro de pacientes e a expressão de CXCR2 em neutrófilos e de CCR2 e CXCR2 em monócitos de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados (parâmetro de capacidade migratória para sítios de injúria/inflamação);
- Avaliar apoptose, potencial de membrana mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio em monócitos de pacientes com COVID e controles saudáveis;
- Avaliar as principais alterações laboratoriais através dos exames complementares de pacientes internados e correlacionar com gravidade e biomarcadores imunológicos e de inflamação;
- Avaliar a associação entre a gravidade da doença, idade, presença de comorbidades e desfecho clínico (sepse, falência múltipla de órgãos, óbito) com biomarcadores imunológicos e de inflamação através de estudos de correlação e regressão multivariada.

Material e métodos

Considerações éticas: Este projeto de pesquisa atenderá a Resolução 466/12, e já teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (CAAE 31052720.6.0000.5345) e está sendo avaliado pelo CEP da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Biossegurança: Conforme o boletim epidemiológico da secretária de vigilância em saúde/Ministério da saúde, os Coronavírus são agentes infecciosos classificados como nível de biossegurança 2 (NB2) (Ministério da Saúde, COE 01, Janeiro de 2020). Os estudos dos biomarcadores da infecção pelo coronavírus serão realizados no lab de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA, observando-se

todas as recomendações de biossegurança para o trabalho com amostras humanas de pacientes com o novo coronavírus (OMS, 2020; OPAS/BRA/COVID-19/20-011). Todos os procedimentos experimentais serão realizados por profissionais com treinamento específico para o trabalho com SARS-COV-2, obedecendo as medidas de biossegurança para COVID-19. O sangue será transportado das unidades de coleta (setor de infectologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre), devidamente acondicionados, conforme as diretrizes de biossegurança laboratorial para o manuseio e transporte de amostras associadas ao novo coronavírus 2019 (OPAS/BRA/COVID-19/20-011). O setor de infectologia da Santa Casa situa-se em prédio próximo ao prédio 3 da UFCSPA onde localiza-se o lab de Imunologia. Em todos os procedimentos serão utilizados os EPIs recomendados pelas diretrizes da WHO, OPAS, ANVISA Ministério da Saúde), as manipulações serão feitas em cabine de segurança biológica classe II, utilizando máscaras N95, touca, óculos de proteção, capacete de proteção, jaleco descartável e luvas cirúrgicas. O descarte será feito em saco de lixo dentro da própria cabine de biossegurança/sala de cultura. Todo o material de descarte será autoclavado antes de serem descartados e recolhidos pela empresa Ambientuus responsável pela coleta e incineração de resíduos dos laboratórios da UFCSPA.

Delineamento do estudo: Trata-se de um projeto de pesquisa do tipo caso-controle onde amostras de sangue periférico serão obtidas de indivíduos diagnosticados com infecção pelo SARS-CoV-2 e um grupo controle não infectado pareado por idade e sexo.

População e amostra: Serão incluídos na amostra pacientes com diagnóstico de COVID-19 (casos assintomáticos ou leves: sem pneumonia e com sintomas leves (n=32), moderados (com pneumonia e sem falha respiratória, n=32) e grave (ventilação mecânica/falência múltipla, n=32) atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e com idade superior a 18 anos). Para pacientes que farão parte do grupo grave, o consentimento deverá ser obtido em etapa anterior da doença, antes de evoluírem para o quadro mais grave (ventilação mecânica/internação UTI). É importante salientar que um dos próprios médicos da equipe irá obter este consentimento. Alternativamente, preparamos o TCLE para responsáveis para os casos nos quais o próprio paciente não consiga dar o consentimento em decorrência do agravamento do quadro.

O grupo controle incluirá indivíduos com diagnóstico negativo para COVID-19 pareados por sexo e idade (n=32). Este grupo será composto por indivíduos moradores da cidade de Porto Alegre ou região metropolitana que não possuam doenças agudas respiratórias, metabólicas, cardiovasculares, ou tumorais (todas por autodeclaração), sendo que o recrutamento será feito através da divulgação de flyers e anúncios em jornais, facebook (Documento em anexo).

O cálculo amostral apontou um n de 128 sujeitos (Grupos COVID e controle), tendo como base o estudo de Giamarellos-Bourboulis e colaboradores (2020), tamanho de efeito de 0.90 para o desfecho de linfócitos T e tamanho de efeito de 0.74 para o desfecho de níveis de IL-6, com um poder de 85% e nível de significância de 5%.

CrITÉRIOS de exclusão: Serão excluídos da amostra indivíduos com infecção aguda e sintomática por outro patógeno que não SARS-CoV-2 (no momento da coleta da amostra), transplantados e pessoas com câncer ou em uso de imunossupressor (autodeclaração) nos últimos 15 dias.

Coleta de dados de controles e pacientes: Para indivíduos do grupo controle, logo após a leitura e assinatura do TCLE, será solicitado que responda a ficha de dados cadastrais para o projeto onde constam perguntas pessoais, doenças anteriores e uso de medicamentos, além de informações que serão colhidas do prontuário (ficha em anexo). Logo após será feita a coleta de sangue descrita no item a seguir. O tempo para preenchimento das informações e coleta de sangue levará em torno de 10-15 minutos. Quanto à leitura e assinatura do TCLE, o voluntário terá o tempo que achar necessário para sua livre decisão em querer ou não participar.

Para os pacientes com diagnóstico de COVID-19, na unidade hospitalar, os dados serão coletados da mesma forma no momento da entrada no estudo. Na impossibilidade de responder (casos graves) as informações serão colhidas do prontuário médico ou responsável pelo paciente. Para estes pacientes a coleta de sangue preferencialmente ocorrerá conforme a rotina da unidade e no mesmo momento de coleta de outras amostras para uso hospitalar (5-10 minutos a mais da rotina).

Obtenção de sangue, plasma e células mononucleares do sangue periférico: Serão coletados 3 a 4 tubos de sangue contendo EDTA e 4 mL em tudo sem

anticoagulante (dependendo das condições clínicas) para obtenção de células para avaliação de marcadores e atividade funcional por citometria. Serão feitas coletas nos momentos de entrada (após diagnóstico), no 14º dia de internação e na fase de alta hospitalar. Não há necessidade de jejum e a coleta poderá ser feita em qualquer horário, de acordo com a dinâmica do setor de infectologia da Santa Casa, por enfermeiro ou coletador do próprio serviço devidamente paramentado para evitar contaminação. A coleta de sangue de voluntários COVID-negativos (controles, teste rápido negativo) será realizada uma única vez, na sala de coleta da UFCSPA – anexa ao lab 214 (Análises clínicas da UFCSPA), por profissional habilitado para coleta de sangue, devidamente paramentado para evitar contaminação). Ao final da coleta será ofertado lanche (tipo box), além do auxílio transporte para pagamento de seu deslocamento conforme orçamento.

O sangue coletado em tubos contendo EDTA será utilizado para separação de células mononucleares periféricas utilizando-se Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, EUA) conforme descrito por Bicalho et al (1980). Resumidamente, o sangue será diluído em uma solução fosfato-salina (PBS 1x) e sobreposto em camadas sobre 3 mL de Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, EUA) em cabine de segurança biológica classe II. As amostras serão centrifugadas a 1500 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, células mononucleares periféricas serão coletadas por aspiração e lavadas duas vezes, primeiro com PBS 1x e em seguida com meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 2% glutamina, 100 U/mL de penicilina/ 0.1 mg/mL de estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Coleta de dados clínicos e de exames complementares de pacientes com COVID-19: Os pacientes que obedecerem aos critérios de inclusão serão convidados a participar do estudo. Os pacientes que concordarem deverão assinar o TCLE. Os dados referentes à baixa hospitalar (quando ocorrer) e de evolução do quadro, além de dados referentes a sinais e sintomas, e de exames complementares ficarão registrados na ficha clínica COVID-19 da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Dados obtidos da ficha clínica de pacientes COVID

- a) Informações gerais: Idade, sexo, contato com paciente com COVID-19 (sim ou não), viagem (sim ou não), início súbito (sim ou não), número de comorbidades, data do PCR SARS-CoV-2 e resultado, exame anti-HIV, leito,

posto, data da entrada hospitalar, data da transferência para UTI, data da alta da UTI, data da alta do hospital.

- b) Sinais e sintomas: sensação de frio, arrepios, calafrios leves, febre ($^{\circ}\text{C}$), mialgias, artralrias, cefaleia, dor retroocular, anorexia, indisposição, mal esta, prostração, tosse improdutiva, tosse produtiva, dispneia, anosmia/hiposmia, ageusia, coriza, espirros, náusea, vômito, diarreia, desconforto abdominal, organomegalia, sinais de Insuf. Ventilat. Outro - qual? (estima-se que o paciente poderá ficar por até 4 semanas em hospitalização)
- c) Exames complementares: Rx Tórax: consolidações, Rx Tórax: infiltrado interst., TC Tórax vidro fosco mult., ECG, Sat O_2 - oximetria < 94 , paO_2 - Gasometria Art. $<$, PCR > 10 , Ferritina > 2.000 , VSG $>$, Anemia: Hb < 9 , Leucopenia < 4.000 , Leucocitose > 10.000 , Linfopenia < 1000 , Plaquetopenia < 100.000 , Tempo Protrombina, LDH, D-dímeros, Fibrinogênio < 200 , Procalcitonina, TGO $>$, TGP $>$, Creatinina $> 1,20$, K^+ , Na^{++} , Mg^{++} alterados
- d) Intervenções: O_2 L/min óculos nasal, VM Invasiva, Hidroxicloroquina, Azitromicina, Dexametasona, Heparina, Antibióticos - quais?
- e) Desfecho: cura ou óbito

Imunofenotipagem de monócitos e neutrófilos: Células sanguíneas totais frescas ou mononucleares (células descongeladas) serão marcadas com anticorpos monoclonais específicos contra os marcadores pretendidos conforme descritos nos objetivos em um procedimento de marcação associada a fluorocromos específicos. A expressão intracelular de NF- κB será avaliada monócitos. Os dados de imunofenotipagem serão adquiridos utilizando BD FACSDiva em FACSCanto II.

Quadro. Subpopulações celulares identificadas para o estudo:	
CD14+CD16-	Monócitos clássicos
CD14+CD16+	Monócitos intermediários
CD14-CD16+	Monócitos não clássicos
CD14+CD16-/+HLA-DR+/-CD69-/+	Monócitos ativados
CD14+CCR1-/+CCR2-/+	Monócito expressando receptores de quimiocina
CD16+CXCR1-/+CXCR2-/+	Neutrófilo expressando receptores de quimiocina

As células serão incubadas com 5 μL de cada anticorpo em tubos específicos por 30 minutos a 4°C . Após a incubação, as células serão ressuspensas em 0,5 mL de PBS 1x e analisadas através de citometria de fluxo. Adicionalmente, a expressão intracelular de NF- κB , um fator de transcrição principal

na resposta inflamatória, em monócitos CD14⁺ será avaliada por citometria de fluxo. As células serão fixadas e permeabilizadas com kit específico seguindo recomendações do fabricante (Ebioscience, Invitrogen, EUA), centrifugadas (8 min, 300 g) e ressuspendidas em solução tampão específico. A marcação será realizada com anti-phospho-p65 (NF- κ B) – PE.

Avaliação de apoptose: Monócitos (1×10^6 células) serão incubados com 5 μ L de Anexina-V e iodeto de propídio ((PI - Sigma – Aldrich®) EUA) 50 μ g / mL a 37 ° C por 15 min. A seguir, cada amostra de cada paciente será completada com 400 μ L de PBS e um total de 20.000 eventos serão adquiridos e analisados por citometria de fluxo.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio em monócitos: A análise do potencial de membrana mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio em células monócitos de pacientes com COVID-19 será quantificada através da rodamina 123 e 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) respectivamente, por citometria de fluxo.

Quantificação de DNA livre de células (cell-free DNA) e histona H3 citrulinada: o DNA livre de células e cit-H3 serão quantificados no soro dos pacientes usando o kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) e o kit Citrullinated Histone H3 ELISA Kit (Cayman), respectivamente.

Análise de citocinas, nociceptina e outros mediadores inflamatórios: As concentrações sistêmicas de citocinas e quimiocinas (GM-CSF, IFN- α , IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, TNF α , TNF β) (Thermo-Fisher, EUA) serão determinadas pela metodologia Bio-Plex utilizando Software 3.1 Xponent (Luminex Corp., EUA) em um Luminex 200 System (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA). As concentrações sistêmicas de cortisol, prostaglandina E2, nociceptina e leucotrieno B4 serão avaliadas pelo método de ELISA seguindo recomendações dos fabricantes.

Análise estatística: A normalidade dos dados será testada pelo teste de Kolgomorov-Smirnov e os dados serão apresentados através de média $\pm$ desvio

padrão. O teste t-Student para dados independentes será adotado para a comparação entre grupos. Correlações serão testadas através do coeficiente de correlação de Pearson. Associações entre idade, presença de comorbidades, gravidade da doença e desfechos clínicos com os marcadores imunológicos serão verificados através de uma Análise de Regressão Multivariada. Um nível de significância de $p < 0,05$ será adotado e o programa SPSS 20.0 será utilizado em todos os testes.

Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Principais resultados esperados

- a) Geração de conhecimento: o projeto permitirá conhecer melhor a imunopatogenia da infecção, uma vez que os vários parâmetros aqui avaliados e ainda não estudados serão comparados em relação a gravidade da infecção/desfecho morte ou sobrevivência;
- b) Formação de recursos humanos: Farmacêuticos, Enfermeiros, Médicos, Imunologistas e alunos de Pós-Graduação estarão envolvidos no desenvolvimento, discussão dos resultados desta pesquisa, fortalecendo a relação Universidade-SUS na busca do avanço científico;
- c) Produção de artigos científicos a serem publicados em revistas indexadas e internacionais de alto impacto;
- d) Impacto social: grande relevância ao gerar conhecimentos sobre marcadores imunológicos relacionados a gravidade de infecção.

CRONOGRAMA

Meses	1-6	7-12	13-18	19-24
Submissão a CEP/CONEP (já aprovado)	x			
Recrutamento de pacientes/voluntários controles e coleta de material biológico	x	x	x	
Coleta de dados clínicos e de exames complementares de pacientes com COVID-19 da ficha clínica COVID e dados eletrônicos do sistema da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre	x	x	x	
Tabulação de banco de dados clínicos e de exames complementares	x	x	x	
Avaliar a expressão de NF- κ B e a frequência periférica de monócitos CD14+CD16- (clássicos), CD14+CD16+ (intermediários), CD14-CD16+ (não-clássicos), CD14+CD16-/+HLA-DR+ /CD69+ (estado de ativação celular) de pacientes e controles não infectados	x	x	x	
Analisar a produção de NETs no soro de pacientes e a expressão de CXCR2 em neutrófilos e de CCR2 e CXCR2 em monócitos de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados (parâmetro de capacidade migratória para sítios de injúria/inflamação)	x	x		
Avaliação de apoptose, ROS, disfunção mitocondrial	x	x	x	
Análise de Citocinas			x	x
Determinação dos níveis de cortisol, prostaglandinas, leucotrienos, nociceptina			x	x
Avaliar as principais alterações laboratoriais através dos exames complementares de pacientes internados e correlacionar com gravidade e biomarcadores imunológicos e de inflamação	x	x	x	x
Avaliar a associação entre a gravidade da doença, idade, presença de comorbidades e	x	x	x	x

desfecho clínico (sepse, falência múltipla de órgãos, óbito) com biomarcadores imunológicos através de estudos de correlação e regressão multivariada.				
Análise estatística – resultados	x	x	x	x
Redação de artigos/envio para publicação			x	x
Relatórios para CEP		x		x
Preparo da dissertação e defesa				x

ORÇAMENTO

CUSTEIO	QTD	Valor unit	Valor
Luva de látex (caixa)	5	40,00	200,00
Jaleco descartável	50	7,00	350,00
Propé (pt com 100 und)	1	18,00	18,00
Máscara (pct 100)	1	165,00	165,00
Óculos de proteção	1	20,00	20,00
Touca descartável (pct 100 ucd)	1	18,00	18,00
Protetor facial com viseira	1	36,00	36,00
Álcool 70%	20 L	7,00	140,00
Pacote de tubos falcon de 15 mL (pct 100 und)	1	52,00	52,00
Ponteiras 200 µL (pct 1000)	4	16,00	64,00
Ponteiras 10 µL (pct 500)	2	30,00	60,00
Ponteiras 1000µL (pct 1000)	4	16,00	64,00
Tubos criogênicos pct com 50 unid	1	60,00	60,00
Microplaca de cultivo celular 24 poços	10	6,80	68,00
Tubos de polipropileno 2 mL (500 unid/cap)	1	40,00	40,00
Tubos de citometria pct c/100	1	4,00	400,00
Solução hemoton spec citometria	1	150	150,00
Ficoll Histopaque-1077	1	600,00	600,00
Soro bovino fetal	1	900,00	900,00
Tubos colega sangue EDTA c/100	2	60,00	120,00
Tubos coleta de sangue sem anticoagulante	2	60,00	120,00
Anticorpos e reagentes para citometria e dosagem de citocinas			20.000,00
Kit ELISA para prostaglandina E2, leucotrieno B4, cortisol, nociceptina,			15.000,00
kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	1	3.600,00	3.600,00
Citrullinated Histone H3 (Clone 11D3) ELISA Kit	1	2.500,00	2.500,00
TOTAL			44.745,00

Esta proposta faz parte de um projeto maior para a qual se solicitou apoio financeiro a CAPES e CNPq. Grande parte dos reagentes a serem utilizados neste projeto já se encontra disponível no Lab do Coordenador do Lab de Imunologia da UFCSPA. A FAPERGS também autorizou usar parte dos recursos do Edital Pesquisador Gaúcho vigente para projetos com COVID-19. O Orientador também submeterá o projeto ao edital interno da ProPPG-UFCSPA.

Referências bibliográficas

Bicalho HM, Gontijo CM, and Nogueira-Machado JA. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *Journal of Immunological Methods* (1981); 40: 115-116, 1981.

Channappanavar R, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 2016; 19: 181-193.

Chazotte B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb Protoc* (2011); 2011: 892-894.

Chen G, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. [epubaheadofprint].

Chengcan Yao, Shuh Narumiya. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br J Pharmacol*. 2019 Feb; 176(3): 337–354. Published online 2018 Dec 18. doi: 10.1111/bph.14530

de Wit, E, et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2016, 14,523-524.

Diao B, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). medRxiv. 2020.

Drosten, C.; Gunther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H.R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R.A.; et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acuterespiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 1967–1976.

Fehr AR, et al. Middle East Respiratory Syndrome: Emergence of a Pathogenic Human Coronavirus. *Annu Rev Med.* 2017; 68: 387-399.

Gavioli EC, Romão PR. NOP Receptor Ligands as Potential Agents for Inflammatory and Autoimmune Diseases. *J Amino Acids.* 2011;2011:836569. doi: 10.4061/2011/836569.

GISAID. Newly discovered betacoronavirus, Wuhan 2019-2020. GISAID EpiFlu - Global Initiative on Sharing All Influenza Data. [Online] January 2020. <https://platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223>.

Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Complex immune dysregulation in covid-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host & Microbes.* 2020 [epubahedofprint].

Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res.* 2013 Oct;100(1):286-95. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.08.015.

Huang L, et al. Blood single cell immune profiling reveals the interferon-MAPK pathway mediated adaptive immune response for COVID-19. medRxiv. 2020.

Le Bel M, Brunet A, Gosselin J (2014) Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. *J Innate Immun* 6: 159–168. 10.1159/000353694

Le Bel M, Gosselin J. Leukotriene B4 Enhances NOD2-Dependent Innate Response against Influenza Virus Infection. *PLoS One.* 2015 Oct 7;10(10):e0139856. doi: 10.1371/journal.pone.0139856.

Liao M, et al. The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. medRxiv. 2020.

Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q, Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020 Apr;92(4):424-432. doi: 10.1002/jmv.25685.

Lim, Y.X.; Ng, Y.L.; Tam, J.P.; Liu, D.X. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases* 2016, 4.

Milek, J.; Blicharz-Domanska, K. Coronaviruses in Avian Species-Review with Focus on Epidemiology and Diagnosis in Wild Birds. *J. Vet. Res.* 2018, 62, 249–255.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim epidemiológico 01. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública | COE-nCoV. Infecção Humana pelo Novo Coronavírus (2019-nCoV). COE 01 | Jan. 2020

Organização Mundial da Saúde. OMS | Guia para Regulação do Transporte de Substâncias Infeciosas 2019-2020. Organização Mundial da Saúde. Janeiro de 2019. [Citado: 28 de janeiro de 2020.] <https://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2019.20/es/>.

Organização Pan Americana de Saúde. OPAS. Organização Mundial de Saúde. OMS. Diretrizes provisórias de Biossegurança Laboratorial para o Manuseio e Transporte de Amostras Associadas ao Novo Coronavírus 20191 (COVID-19). OPAS/BRA/COVID-19/20-011 8 de Janeiro de 2020. file:///D:/CORONAVIRUS/OPASBRACOV1920011_por.pdf

Porto BN, and Stein RT. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front Immunol.* 2016;7:311.

Song C-Y, Xu J, He J-Q, and Lu Y-Q. COVID-19 early warning score: a multi-parameter screening tool to identify highly suspected patients. 2020:2020.03.05.20031906.

Thevarajan I, et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. *Nature Medicine*. 2020; 26: 453-455.

Thompson B.T. Glucocorticoids and acute lung injury. *Crit Care Med*. 2003;31:S253–S257.

Thompson JP, Serrano-Gomez A, McDonald J, Ladak N, Bowrey S, Lambert DG. The Nociceptin/Orphanin FQ system is modulated in patients admitted to ICU with sepsis and after cardiopulmonary bypass. *PLoS One*. 2013 Oct 4;8(10):e76682. doi: 10.1371/journal.pone.0076682.

Wan S, et al. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *British Journal of Haematology*. 2020 [epubaheadofprint].

Wen W, et al. Immune Cell Profiling of COVID-19 Patients in the Recovery Stage by Single-Cell Sequencing. *medRxiv*. 2020.

Williams JP, Thompson JP, Young SP, Gold SJ, McDonald J, Rowbotham DJ, Lambert DG. Nociceptin and urotensin-II concentrations in critically ill patients with sepsis. *Br J Anaesth*. 2008 Jun;100(6):810-4. doi: 10.1093/bja/aen093.

Woo, P.C.; Huang, Y.; Lau, S.K.; Yuen, K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2010, 2, 1804–1820.

World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). Interim Guidance. February 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331138/WHO-WPE-GIH-2020.1-eng.pdf>

World Health Organization. (2020). Laboratory testing of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 17 January 2020. World Health Organization

Xu L, Liu J, Lu M, Yang D, Zheng X. Liver injury during highly pathogenic human coronavirus infections. *Liver Int*. 2020 Mar 14. doi: 10.1111/liv.14435.

Zhang B, Zhou X, Zhu C, Feng F, Qiu Y, Feng J, et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. 2020:2020.03.12.20035048.

Zhou J, et al. Active Replication of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus and Aberrant Induction of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Human Macrophages: Implications for Pathogenesis. *J Infect Dis*. 2014; 209: 1331-1342.

Zhou Y, et al. Aberrant pathogenic GM-CSF+ T cells and inflammatory CD14+CD16+ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus. *bioRxiv*. 2020.

Zhou, P., Yang, X., Wang, X. *et al*. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med*. 2020.

ANEXOS

DADOS CADASTRAIS, DADOS DA FICHA CLÍNICA COVID-19 (ISCOMPA) E DADOS LABORATORIAIS IMUNOLOGIA

DADOS CADASTRAIS DOS PARTICIPANTES			
Nome:			
Data Nascimento:	Sexo:	Idade:	
Telefone contato:	Data início sintomas:		
Data exame COVID-19:	Resultado Pos: () Neg: ()		
Sintomas: Sim () Não ()	Data início sintomas:		
Classificação COVID na entrada do estudo	() COVID negativo (grupo controle)		
	() Assintomático/quadro leve		
	() Moderado		
	() Grave		
Outras doenças: Sim () Não ()	Uso imunossupressor: Sim () Não ()		
() Respiratórias: asma, bronquite, () Diabetes, () Doenças cardíacas, () Tumor () Doença autoimune, () Outras _____			
Uso medicamentos nos últimos 15 dias: Sim () Não ()			
Transplantado: Sim () Não ()			
Datas coleta sangue:	1ª:	2ª:	3ª:
FICHA CLÍNICA COVID-19 – ISCMPA			
Nome:	Sexo:	Contato COVID confirmado Sim/Não	Viagem Sim/Não
Início Súbito Sim/Não	No de comorbidades:		
DATA PCR SARS-COV-2 E RESULTADO:			
Leito:	Posto:		
Data baixa:	Data transf. UTI:		
Data alta UTI:	Data alta hospitalar:		
Sinais e sintomas:			
Sensação de frio			
Arrepios			
Calafrios leves			
Febre (°C)			
Mialgias			
Artralgias			
Cefaleia			
Dor retroocular			
Anorexia			
Indisposição			
Mal estar			
Prostração			
Tosse improdutiva			
Tosse produtiva			
Dispneia			
Anosmia/hiposmia			
Agelsia			
Coriza			
Espirros			
Náusea			
Vômito			
Diarreia			
Desconforto abdominal			
Organomegalia			
Sinais de Insuf. Ventilat.			

Exames complementares			
Rx Tórax: consolidações			
Rx Tórax: infiltrado interst.			
TC Tórax vidro fosco mult.			
ECG			
Sat O ₂ — Oximetria < 94			
paO ₂ — Gasometria Art. <			
PCR ≥ 10			
Ferritina > 2.000			
VSG >			
Anemia: Hb < 9			
Leucopenia < 4.000			
Leucocitose > 10.000			
Linfopenia < 1000			
Plaquetopenia < 100.000			
Tempo Protrombina			
LDH			
D-dímeros			
Fibrinogênio ≤ 200			
Procalcitonina			
TGO >			
TGP >			
Creatinina > 1,20			
K ⁺ , Na ⁺ , Mg ⁺⁺ — alterados			
Intervenções complementares			
___ O ₂ L/min óculos nasal			
VM Invasiva			
Hidroxicloroquina			
Azitromicina			
Dexametasona			
Heparina			
Antibióticos — quais?			
DESFECHO	C: Cura	O: Óbito	Falência múltipla/seps

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre Coronavírus. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre o objetivo da pesquisa, **caso você aceite em participar, deverá assinar este documento, ficando com uma via do mesmo devidamente assinada pelo pesquisador responsável.**

Se aceitar participar, suas dúvidas poderão ser esclarecidas diretamente pelo seu médico ou pelo pesquisador responsável Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão, via e-mail (pedror@ufcspa.edu.br) ou telefones: (51) 3303-8746, (51) 98621-3105 (pode ligar a cobrar). Para tirar dúvidas sobre seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá ainda entrar em contato com um dos Comitês de Ética em Pesquisa: **1)** Comitê de Ética em Pesquisa – UFCSPA - situado na Rua Sarmento Leite, 245, Fone (51) 3303-8804. Email: cep@ufcspa.edu.br, **2)** Comitê de Ética em Pesquisa Pesquisa-Adulto - Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - Fone (51) 3214.8571. Email: cep@santacasa.tche.br

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa **"Imunopatogenia da COVID-19: avaliação do perfil imune inflamatório-oxidativo e de subpopulações celulares e suas correlações com a gravidade e desfechos clínicos"** será realizada por médicos pesquisadores da Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre e da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

O objetivo da pesquisa é **entender como o seu organismo tenta se defender e destruir este vírus (SARS-CoV-2)** que vem infectando um grande número de pessoas em todo o mundo. Nós iremos estudar as alterações nas células de defesa que se encontram no sangue das pessoas infectadas, comparando com as de pessoas não infectadas. Para tanto, precisaremos consultar dados do prontuário médico e obter amostras de sangue de pessoas maiores de 18 anos que aceitem participar da pesquisa e que tenham:

- teste positivo para o coronavírus;
- pessoas saudáveis sem o vírus (com teste negativo para COVID-19).

Outra condição importante para participar do estudo é não estar com infecção aguda e sintomática por outro patógeno (vírus, bactéria, parasita) que não SARS-CoV-2 (no momento da coleta da amostra), ter sido transplantado, ou em tratamento do câncer ou em uso de imunossupressor nos últimos 15 dias.

A participação na pesquisa envolve:

- Seu aceite em participar, assinando o documento e recebendo uma via assinada pelo pesquisador;
- Responder a um questionário sobre informações pessoais como nome, idade, sexo, e doenças prévias e uso de medicamentos (cadastro na pesquisa);
- Sua permissão para que o pesquisador acesse os dados de seu prontuário médico, contendo informações relativas à sua saúde geral, exames que fará e medicamentos que irá usar;
- Sua permissão para a coleta da amostra de sangue, sendo esta, realizada por um profissional técnico especializado no local de atendimento hospitalar (enfermeiro, biomédico ou técnico especializado na coleta) ou na UFCSPA (voluntários negativos para o vírus);
- Sua permissão para que os dados gerados a partir da coleta sanguínea e de dados de seu prontuário médico possam ser utilizados na produção de artigos científicos a serem publicados em revistas indexadas nacionais/internacionais, bem como em eventos científicos, sendo respeitado e garantido o absoluto sigilo de sua identidade.

De acordo com sua condição clínica será coletado 12 mL de sangue venoso através de punção da veia antecubital ao acesso em tubos sem anticoagulante (1 tubo pequeno de 4 mL) e 2 tubos pequenos contendo EDTA (total 8 mL). No mínimo serão coletados 8 mL de sangue (em tubos com e sem anticoagulante). Serão feitas coletas nos momentos de entrada (após diagnóstico), no 14º dia de internação e na fase de alta hospitalar. Não há necessidade de jejum.

Neste projeto a doença está sendo chamada de leve, moderada ou grave (Seu médico que fará esta classificação). No caso do Sr. ou Sra. necessitar ficar neste hospital, seu sangue será coletado em três momentos como citado acima. Se aceitar, você está dando consentimento para coleta de sangue mesmo que esteja classificado como grave, usando respirador ou numa UTI. É importante dizer que estas coletas não lhe prejudicarão e só serão feitas com recomendação da equipe médica.

Este sangue servirá para a realização de testes que avaliarão as células de defesa do seu organismo, bem como marcadores bioquímicos (de inflamação, hormonal) que podem auxiliar na compreensão da doença. O tempo total para responder as informações do cadastro e para coleta de sangue será de aproximadamente 10-15 minutos. Os demais procedimentos médicos e de exames se referem ao seu tratamento normal na Santa Casa e não sofrerão mudanças.

Desconfortos e riscos potenciais: *os riscos das coletas de sangue são desconforto, dor no local da picada, e formação de hematomas (manchas roxas) no local da coleta e tonturas, provenientes da punção venosa, que serão acompanhados pela equipe de coleta, conforme procedimentos de rotina. Havendo estas reações adversas você receberá todos os cuidados necessários dos pesquisadores e equipe de saúde deste projeto.*

Benefícios que poderão ser obtidos: você não receberá qualquer benefício direto participando deste estudo, nem haverá custos para você. As informações obtidas a partir desta pesquisa poderão beneficiar o sistema de saúde de uma forma geral, pois possibilitará um melhor entendimento dos fatores envolvidos no controle da doença. Assim, esta pesquisa contribuirá no desenvolvimento de futuras vacinas e/ou tratamentos específicos, pois irá avaliar o comportamento da doença.

Descontinuação do Estudo:

Você poderá deixar de participar deste estudo a qualquer tempo, sem que haja prejuízo ao seu atendimento hospitalar, bem como o pesquisador poderá retirá-lo do estudo, se julgar oportuno (tendo você o direito de ser informado quanto ao motivo). Além disso, o pesquisador e/ou o Comitê de Ética em Pesquisa poderão decidir pelo término do estudo, caso seja necessário.

Esclarecimentos dados sobre garantias do Participante da pesquisa:

1. Você terá a garantia, a qualquer tempo de que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida.
2. Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação a qualquer tempo. A participação é voluntária e a recusa em participar não envolverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Recusa ou descontinuação não irá de nenhuma forma colocar em risco seu direito de receber tratamento agora ou no futuro.
3. Seu médico e os demais investigadores desse estudo tratarão sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Você terá garantias de sigilo de sua participação. Seus registros permanecerão confidenciais.
4. Os investigadores podem pedir para rever seus registros sem que seu nome seja revelado e estes somente serão liberados sem permissão escrita, se exigido por lei.
5. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.
6. Todos os procedimentos referentes à sua participação neste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica não relacionada com este estudo será de sua responsabilidade.
7. Caso você tenha algum desconforto emocional e/ou constrangimento durante a coleta de material biológico você tem liberdade para se recusar a participar da coleta ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação no estudo.
8. Você terá direito de pleitear indenização (reparação a danos imediatos ou futuros), garantida em lei, decorrentes da sua participação na pesquisa em caso de danos comprovadamente decorrentes da pesquisa.
9. Armazenamento e uso de material biológico coletado e dados obtidos exclusivamente para os fins previstos no protocolo da pesquisa (Resolução CNS 347/05).

10. Os dados gerados poderão ser usados/apresentados na produção de artigos científicos a serem publicados em revistas indexadas nacionais/internacionais, bem como em eventos científicos.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Eu, _____

RG/CPF/ _____ n° de prontuário _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **“Imunopatogenia da COVID-19: avaliação do perfil imune inflamatório sistêmico, oxidativo e de subpopulações de células imunes e suas correlações com a gravidade da infecção e desfechos clínicos”** como participante voluntário”. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Nome do Participante: _____

Assinatura do Participante: _____

Nome do Pesquisador Responsável: _____

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Se você tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa e seus direitos enquanto participante, entre em contato com:

Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Pesquisador

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- Porto Alegre-RS. Telefone: (51)3303-8746 / 3303-8908.

ANEXO

CARTAZ DE DIVULGAÇÃO DA PESQUISA PARA RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS PARA O GRUPO CONTROLE

Seleciona-se indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que não tiveram a COVID-19, para se estudar o comportamento do sistema imunológico envolvido na doença.

Para participar, você deve atender os seguintes critérios:

- Morar na cidade de Porto Alegre ou região metropolitana.
- NÃO possuir doenças como asma, bronquite, enfisema, doença respiratória obstrutiva crônica, câncer, diabetes, insuficiência cardíaca, ter sofrido enfarto, acidente vascular cerebral e autoimunidade (lúpus, artrite reumatoide).

O que será realizado?

- Nos indivíduos que aceitarem participar da pesquisa, será realizada uma colheita de sangue para confirmar se o participante é COVID-19 negativo e também para avaliar o sistema imune de pessoas consideradas saudáveis.
- O tempo necessário para participar da pesquisa é de aproximadamente 5 a 10 minutos.

Caso tenha interesse em participar, entre em contato por
telefone: (51) 3303-8908 ou email: pedror@ufcspa.edu.br

Desenvolvimento de estratégias baseadas em microamostragem: da síntese de materiais avançados à aplicação nas análises toxicológicas

1. EQUIPE

Proponente

- Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/0040291517754373>
Súmula curricular – **Anexo I**

Pesquisadores Associados com Bolsa de Produtividade

- Helena Maria Tannhauser Barros, *PQ Nível 1B*, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/1930793797454956>
- Mauricio Yonamine, *PQ Nível 1D*, USP, SP.
<http://lattes.cnpq.br/2665536223113975>
- Claudio Martin Pereira de Pereira, *PQ Nível 2*, UFPel, RS.
<http://lattes.cnpq.br/5722353488752184>
- José Luiz da Costa, *PQ Nível 2*, UNICAMP, SP.
<http://lattes.cnpq.br/9846018023731358>
- Sabrina Arcaro, *PQ Nível 2*, UNESC, SC.
<http://lattes.cnpq.br/9093700941137829>
- Oscar Rubem Klegues Montedo, *PQ Nível 2*, UNESC, SC.
<http://lattes.cnpq.br/2197900618750184>

Pesquisadores Associados nível Doutorado

- André Valle de Bairros, UFSM, RS.
<http://lattes.cnpq.br/9350662167425345>
- Fábio de Souza Barbosa, PPG-CS, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/7176835899005154>
- Monique Deon, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/6021445976296111>
- Sarah Eller, PPG-CS, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/5065573051212675>
- Tiago Bender Wermuth, UNESC, SC.
<http://lattes.cnpq.br/5435614410548167>

Pesquisadores Associados nível Mestrado

- Daniel Scolmeister, DPL-IGP, RS.
<http://lattes.cnpq.br/0675742044754836>
- Letícia Birk, PPG-CS, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/7316019063526836>
- Patrícia de Souza Schwarz, PPG-CS, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/7316019063526836>
- Josiane Fátima de Paula, PPG-CS, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/7316019063526836>

2. INSTITUIÇÕES

Instituições de Ensino Superior

- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, RS.
- Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS.
- Universidade Federal de Pelotas, UFPel, RS.
- Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, SC.
- Universidade de São Paulo, USP, SP.
- Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, SP.

Instituição de Segurança Pública

- Departamento de Perícias Laboratoriais, Instituto-Geral de Perícias, DPL-IGP, RS.

3. RESUMO

A análise laboratorial de novas substâncias psicoativas (NPS) representa um desafio constante devido ao dinamismo como estas substâncias surgem, a ampla variedade de estruturas possíveis e a complexidade das matrizes biológicas permissíveis à sua detecção. Diante do exposto, esta proposta multicêntrica visa o desenvolvimento de novos materiais e a subsequente aplicação de metodologias de microamostragem associadas à métodos de espectrometria de massas na determinação de NPS em diferentes amostras biológicas. Serão sintetizados e caracterizados materiais para interações sólido-líquido que incluem nanopartículas de sílica (sólida e mesoporosa), hidroxiapatita, zeólitas e magnetita, assim como, solventes de hidrofiliabilidade comutável para interações

líquido-líquido. Assim, verifica-se que a proposta está embasada em conceitos modernos envolvendo a Química Verde, preconizando o uso de quantidades reduzidas de solventes, redução do impacto ambiental e, ao mesmo tempo, proporcionando extrações eficientes. Após a completa validação, as metodologias propostas serão aplicadas em amostras de “casos reais” fornecidas pelo DPL-IGP, conferindo ampla relevância social ao projeto, uma vez que se caracteriza a prestação de serviço direto a população e o fortalecimento de ações de segurança pública que podem minimizar o obscurantismo quanto ao consumo de drogas.

4. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O consumo e a dependência de substâncias psicoativas clássicas são apontados como importantes moduladores de parâmetros de saúde pública, contribuindo para mudanças nos padrões de morbidade e mortalidade, como um reflexo do aumento das ocorrências de patologias e injúrias, incluindo manifestações neuropsiquiátricas e overdoses [1-3]. Entretanto, a dimensão do consumo e os padrões de uso de novas substâncias psicoativas (NPS) ainda não são claros, representando uma ameaça emergente. A padronização e categorização oficial das NPS é recente, incluindo nove classes de substâncias, sendo elas as triptaminas, catinonas sintéticas, canabinoides sintéticos, substâncias vegetais, piperazinas, fenetilaminas, substâncias do tipo fenciclidina, aminoindanos e outras substâncias, que podem incluir compostos como benzodiazepínicos sintéticos [4-6].

Diferentes NPS continuam surgindo, com algumas se estabelecendo no mercado e outras desaparecendo após um curto período [4]. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a Polícia Federal produziu, em 2016, cerca de 163 laudos referentes à apreensão de NPS, sendo detectadas feniletilaminas (42% dos laudos), canabinoides sintéticos (20% dos laudos) e catinonas sintéticas (17% dos laudos). Concomitantemente, foram identificadas as catinonas sintéticas metilona, etilona, dibutilona, n-etilpentilona, 4- MEAPP e 4-fluoro-PHP, sendo as últimas três substâncias detectadas pela primeira vez em território brasileiro [7]. Adicionalmente, foi detectado por nosso grupo de pesquisa, em 2020, as substâncias 25C-NBOH, 25E-NBOH, 25I-NBOMe, DOB e 4-fluoro-PHP em amostras de selos vendidos como LSD no estado do Rio Grande do Sul [8].

A identificação de NPS em amostras biológicas representa um desafio significativo, considerando o grande e crescente número de substâncias potencialmente presentes, bem como a complexidade das matrizes e, frequentemente, a disponibilidade de quantidades limitadas de amostra [9, 10]. Assim, as principais dificuldades observadas no desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de NPS incluem o elevado número de compostos a serem investigados, diversidade de modificações estruturais, a velocidade com que novas drogas surgem no mercado e a falta de padrões analíticos [11].

Neste cenário dinâmico, a utilização da espectrometria de massas (MS) se mostra promissora, sendo particularmente útil para a identificação e inclusão de NPS em bancos de dados específicos [9,12-14]. Apesar da crescente inovação na área instrumental, o preparo de amostras não pode ser descartado, uma vez que representa uma etapa fundamental para a construção do próprio procedimento analítico, especialmente quando se trata de amostras biológicas complexas, que podem conter interferentes e incompatibilidades com os instrumentos analíticos [15]. Vale ressaltar que o preparo de amostra possibilita também a pré-concentração do analito, o que é essencial quando se trabalha com compostos em níveis traço.

Tendo em vista a significativa importância da etapa de preparo de amostras em um procedimento analítico, diversas técnicas, como por exemplo as técnicas miniaturizadas ou de microextração, têm sido desenvolvidas permitindo assim um adequado tratamento da amostra previamente à realização da análise instrumental. As vantagens apresentadas pelas técnicas de microextração incluem o baixo consumo de solventes (ordem de μL) o que faz com que essas técnicas sejam ambientalmente favoráveis, tempo de extração reduzido quando comparadas às técnicas convencionais de extração, alta capacidade de concentração dos analitos e versatilidade para extração de diversos compostos [16, 17]. Dentre as diversas técnicas disponíveis para a microamostragem, dois modelos de interação serão explorados nesta proposta sendo apresentados a seguir.

4.1. Microamostragem baseada em interações sólido-líquido

A técnica mais sugerida para a realização de microamostragem sólido-líquido é a coleta e o armazenamento de sangue em papel-filtro (DBS, do inglês *dried blood spots*). O DBS consiste no depósito de algumas gotas de sangue capilar em um papel filtro, responsável por reter a matriz biológica e os analitos presentes na própria matriz.

Adicionalmente, é feita a secagem do sangue, tornando o papel o meio de armazenamento e transporte da amostra. A posterior análise é realizada selecionando segmentos da mancha, seguido da dessorção dos analitos do papel filtro com o uso de solventes orgânicos ou soluções, conforme descrito na **Figura Suplementar 1. A**. O extrato obtido pode ser diretamente injetado no equipamento analítico ou passar por outras etapas de limpeza, diluição ou evaporação. Além do sangue, outras matrizes podem ser processadas da mesma forma, como o plasma, urina e humor vítreo [18]. No entanto, algumas desvantagens do método de DBS são apontadas como limitações importantes para a sua consolidação nas análises laboratoriais. Entre elas pode-se citar a pequena quantidade de analito contido em um volume de amostra limitado, o que requer métodos instrumentais sensíveis para a correta determinação analítica [19]. Adicionalmente, o principal fator limitante da técnica está correlacionado com a falta de homogeneidade da amostra relacionada com a forma desigual pela qual células e componentes da matriz se dispersam pelos microcanais de celulose do papel. Dessa forma, as concentrações mensuradas podem ser diferentes de acordo com o segmento do papel analisado. Além disso, valores alterados de hematócrito também estão associados a inexatidão dos métodos devido à influência do mesmo na viscosidade sanguínea, modulando o tamanho da gota e o volume de amostra depositada, podendo assim, influenciar parâmetros analíticos como o efeito matriz e a recuperação [20, 21].

Para contornar os problemas de heterogeneidade da amostra e outras desvantagens apresentadas pela técnica de DBS, uma nova estratégia de coleta foi desenvolvida e denominada de microamostragem volumétrica absorviva (VAMS). Entre as principais vantagens da técnica destaca-se a absorção de um volume pré-determinado de amostra. Essa absorção é feita através de um material polimérico poroso disposto na haste de um dispositivo plástico que entra em contato direto com a matriz biológica. Para a posterior realização da análise, o material sorvente é inteiramente imerso em solvente orgânico promovendo a dessorção dos analitos e garantindo a homogeneidade da amostra, conforme o ilustrado na **Figura Suplementar 1. B**. As variações no hematócrito são consideradas de menor importância quando comparadas ao DBS, visto que não alteram significativamente o volume de amostra absorvido [22, 23]. O dispositivo de VAMS é compatível com o acoplamento a sistemas de automação laboratorial, que tornam os métodos menos propensos a erros operacionais tornando-os mais reprodutíveis e precisos [24].

Apesar dos avanços da aplicação do VAMS em diversas áreas, o uso da técnica ainda é inteiramente baseado em dispositivos comerciais. No entanto, o desenvolvimento de novos dispositivos é passível de conceptualização e otimização utilizando o fundamento das extrações baseadas em sorventes. Diversas modificações e miniaturizações da técnica original podem ser propostas e otimizações são recomendadas de acordo com o objetivo da análise. Entre essas otimizações está a avaliação do tipo de sorvente utilizado, considerado um dos pontos cruciais para a robustez do processo em termos de seletividade e eficiência. Diversos sorventes podem ser adquiridos de forma comercial como no caso da amina primária secundária (PSA), octadecilsilano (C18) e sorventes com partículas de sílica modificadas [25 - 27]. Recentemente, consideráveis esforços vêm sendo tomados em relação a tornar os procedimentos analíticos compatíveis com os princípios da Química Verde. Entre eles, destaca-se o desenvolvimento de sorventes derivados de compostos naturais como cortiça e algodão, que utilizam sobras da produção agrícola para sua confecção. Esses compostos, chamados de biossorventes, também podem passar por modificações estruturais ou tratamentos específicos, sendo utilizados de maneira versátil e permitindo a construção de dispositivos de baixo custo para serem aplicados à diversos tipos de análise [28, 29].

Paralelamente, nanopartículas sólidas ou mesoporosas podem também ser consideradas para essa aplicação sendo indicados como compostos versáteis dentro da química e ciência dos materiais. Por apresentarem uma alta área superficial, bem como diversidade química de superfície, esses produtos são sugeridos como excelentes fases estacionárias em técnicas de separação e adsorção [30, 31]. Adicionalmente, nanopartículas, em especial de sílica, zeólitas ou hidroxiapatita, apresentam ótima biocompatibilidade e excelente estabilidade química e biológica, o que minimiza riscos associados ao seu uso [32, 33]. Assim, sugestionamos que esses materiais podem ser utilizados como uma alternativa viável para a substituição da extração em fase sólida baseada em cartucho na denominada extração em fase sólida dispersiva (dSPE), onde as partículas são adicionadas diretamente à amostra, conforme o ilustrado na **Figura Suplementar 1. C.** [34]. Os quatro principais sorventes utilizados na dSPE são o sulfato de magnésio, C18, PSA e o carbono funcionalizado, utilizados para a remoção de água, lipídios (e proteínas), ácidos orgânicos e pigmentos, respectivamente [35]. Uma série de métodos de extração e limpeza de amostras por dSPE foram desenvolvidos e publicados [34 - 37]. Entretanto, até o momento, a utilização desta metodologia para a determinação de drogas clássicas ou NPS não foi explorada.

Dessa forma, a substituição da celulose no DBS, a construção de dispositivos de VAMS e a realização de experimentos de dSPE utilizando materiais avançados em detrimento de fases comerciais podem representar um avanço na busca de metodologias mais eficientes para uso nas análises toxicológicas.

2.2. Microamostragem baseada em interações líquido-líquido

Uma classe de solventes tem apresentado destaque nos últimos anos para a construção de metodologias de microamostragem baseada em interações líquido-líquido, sendo denominados de solventes com hidrofiliabilidade comutável (SHS). Os SHS por apresentarem propriedades físico-químicas muito interessantes para serem exploradas em técnicas de microextração e são considerados uma alternativa promissora aos solventes orgânicos comumente empregados na rotina laboratorial. Desta forma, constituem-se como uma ferramenta analítica para serem explorados na chamada microextração líquido-líquido homogênea (HLLME). A HLLME é uma técnica de preparo baseada no processo de separação de fases a partir de uma solução homogênea, sendo compreendida em duas etapas. Primeiramente é realizada a completa miscibilidade da amostra e da fase orgânica, o que fornece uma grande superfície de contato para a extração. A solubilização do solvente orgânico é modulada por suas propriedades químicas ou através da utilização de energia externa, como aquecimento ou ultrassom. Posteriormente, é realizada a separação das fases mediante a adição ou remoção de um reagente específico, o que possibilita a transferência do analito da solução homogênea para um pequeno volume de solvente. Esta separação de fases geralmente é realizada através do efeito *salting out*, mudanças de pH ou por iônico [38, 39].

Os SHS podem ser definidos como solventes que apresentam a propriedade de alternar entre as formas hidrofílicas e hidrofóbicas em soluções aquosas mediante uma mudança no sistema em estudo. Por exemplo, conforme o ilustrado na **Figura Suplementar 2**, com a adição de dióxido de carbono (CO_2), esse solvente passa para a sua forma hidrofílica, tornando-se solúvel em água e formando uma solução monofásica. Com a remoção do CO_2 do sistema, feita através de aquecimento ou introdução de um gás inerte, o SHS retorna para a sua forma hidrofóbica, formando uma solução bifásica novamente [40]. Esse comportamento ocorre devido à reação ácido-base, na qual a

formação de um sal de bicarbonato através da protonação de SHS torna este solvente hidrofílico. Alguns desses solventes, podem ser alternados entre suas formas hidrofóbica e hidrofílica mediante alteração do pH da solução em análise, o que geralmente é realizado com a adição de solução ácida ou básica [41, 42].

O uso desses solventes na HLLME foi denominado microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofiliabilidade comutável (SHS-HLLME). O primeiro SHS reportado por Jessop *et al.* foi a *N,N,N*-tributylpentanamidina, utilizado na extração de azeite proveniente de soja. Esse solvente é uma amidina líquida que não é disponível comercialmente, a reação de síntese é bastante difícil e apresenta elevada instabilidade. Para driblar esses efeitos, esse pesquisador reportou uma série de aminas terciárias que são de fácil preparação e em alguns casos comercialmente disponíveis que podem atuar como SHS, tais como a trietilamina, dietilbutilamina, *N*-etilpiperidina e *N,N*-dimetilciclohexilamina [41]. Entretanto, alguns desses SHS apresentaram alta volatilidade e potencial de inflamabilidade, tornando-os menos desejáveis para o uso. Sendo assim, foram reportados outros compostos baseados em aminas secundárias e terciárias que podem atuar como SHS e que são de fácil preparação e disponíveis comercialmente, e que possuem em comum valores de logP entre 1,2 e 2,5 e de pKa acima de 9,5. Além disso, também foram reportados estudos referentes aos SHS já citados em relação às propriedades, riscos à saúde e impactos ambientais [43].

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa em conjunto com colaboradores realizou um estudo no qual foi possível a utilização de SHS para a determinação de antidepressivos, sendo desenvolvida uma metodologia analítica rápida, barata e facilmente aplicável, onde um dispositivo foi adaptado para a determinação de fluoxetina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina e sertralina em amostras de urina. Neste estudo, foi possível a utilização de *N,N*-dimetilciclohexilamina (DMCHA) e dipropilamina (DPA) como solventes ambientalmente corretos e com excelente desempenho analítico, sendo que limites de detecção na ordem de ng/mL foram alcançados com a utilização de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas [42]. Posteriormente, desenvolvemos um método empregando DMCHA como solvente extrator na técnica de SHS-HLLME para a extração de MDMA, MDA e NBOMes (25B, 25C e 25I) em amostras de sangue *postmortem* e determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas [44].

Através dos estudos brevemente apresentados, abrem-se novas possibilidades para a extração de substâncias de interesse forense, tendo em vista que os solventes avaliados

apresentaram boa estabilidade e desempenho quando empregados em amostras biológicas. Desta forma, esses solventes podem ser explorados como alternativas importantes aos solventes orgânicos convencionais.

5. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

No âmbito de aproximar a sociedade com o ambiente acadêmico, torna-se indispensável que os projetos propostos atendam às reais necessidades da população. Assim, a presente proposta apresenta ampla relevância social uma vez que as metodologias desenvolvidas serão aplicadas para a elucidação de casos reais, colaborando para o mapeamento da ocorrência de NPS e fornecendo dados ao sistema de toxicovigilância para auxiliar a alertar as redes nacionais e internacionais da intensidade de coletas que envolvem NPS e a elaboração de políticas públicas normativas e educativas quanto ao consumo de substâncias psicoativas. Atualmente, o nosso laboratório recebe amostras biológicas, por meio de parcerias científicas do Departamento de Perícias Laboratoriais, Instituto-geral de Perícias (DPL-IGP/RS) que será beneficiado diretamente com a implantação das tecnologias sugeridas. Adicionalmente, a proposta se enquadra na área estratégica de segurança pública, definida pela PORTARIA Nº 1.122 do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações em alinhamento ao Plano Plurianual da União. Nossa proposta se concentra no desenvolvimento de uma nova abordagem analítica rápida, eficaz e de baixo custo, que pode ser utilizada em diferentes equipamentos de espectrometria de massas para a detecção de NPS. O projeto está baseado em conceitos modernos envolvendo Química Verde, nos quais se preconiza o uso de quantidades reduzidas de solventes diminuindo o impacto ambiental e, ao mesmo tempo, proporcionando extrações eficientes de uma diversa gama de compostos com diferentes propriedades físico-químicas. Desta forma, os resultados fornecerão alto potencial tecnológico e científico, sendo compatíveis com a publicação em periódicos e registro de patentes.

6. OBJETIVOS E METAS

6.1. *Objetivo*

Desenvolvimento de novos materiais e a subsequente aplicação de metodologias de microamostragem associadas à métodos de espectrometria de massas na determinação de NPS em diferentes amostras biológicas.

6.2. *Metas*

- i. Promover soluções analíticas modernas para as demandas na rotina das análises toxicológicas;
- ii. Sintetizar e caracterizar novas fases adsorptivas derivadas de nanopartículas de sílica (sólida e mesoporosa), hidroxiapatita, zeólitas e magnetita para a construção de metodologias de microamostragem baseada em interações sólido-líquido;
- iii. Utilizar materiais inovadores para a substituição da celulose na técnica de DBS nas análises de novas drogas de abuso em matrizes biológicas;
- iv. Desenvolver um dispositivo de VAMS que utilize materiais inovadores como constituintes da fase adsorptiva compatível a determinação de novas drogas de abuso em matrizes biológicas;
- v. Utilizar as nanopartículas para a elaboração da técnica de dSPE nas análises de novas drogas de abuso em matrizes biológicas;
- vi. Caracterizar novos SHS para a construção de metodologias de microamostragem baseada em interações líquido-líquido e, subsequentemente, aplicá-los na rotina das análises toxicológicas;
- vii. Validar todas as metodologias propostas seguindo guias internacionais e realizar a transferência de tecnologia para o DPL-IGP, RS;
- viii. Divulgar conhecimentos científicos de ponta para a comunidade externa garantindo o fortalecimento de ações de segurança pública que podem minimizar o obscurantismo quanto ao consumo de drogas;
- ix. Participar de redes de alerta nacionais e internacionais para apontar as semelhanças e disparidades entre regiões geográficas quanto ao consumo de drogas;
- x. Formar recursos humanos altamente especializados por meio do envolvimento de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado no projeto;

- xi. Fortalecer rede de pesquisadores estabelecida quando da realização do estudo, assim como agregar novos pesquisadores com expertise no tema proposto;
- xii. Divulgar os resultados do projeto por meio de publicações científicas de alto impacto (Qualis CAPES A1 e A2).

7. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

7.1. Amostras

Amostras biológicas de rotina (sangue, urina, vísceras) ou de oportunidade (humor vítreo e cabelo) serão disponibilizadas pelo DPL-IGP/RS de casos com suspeita de ocorrência de NPS, passíveis de análises toxicológicas, atendidos pelos Laboratório durante o período de vigência do projeto. Este projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) tendo como coordenador o solicitante da proposta. CAAE: 17996819.7.0000.5345.

7.2. Analitos

A escolha dos grupos de NPS segue em concordância com o perfil epidemiológico no Brasil, assim como com as apreensões realizadas pela Polícia. Dessa forma, serão desenvolvidos métodos para a identificação de 25B-NBOMe, 25C-NBOH, 25C-NBOMe, 25D-NBOMe, 25E-NBOMe, 25G-NBOMe, 25H-NBOMe, 25I-NBOH, 25I-NBOMe, 25-NBOH, 4F-PHP, ADB-FUBINACA, AMB-FUBINACA, catinona, dibutilona, etilona, eutilona, LSD, MDA, MDMA, MDPBP, MDPP, mefedrona, metedrona, pentedrona e U-47700.

7.3. Infraestrutura e equipamentos

O laboratório coordenado por nosso grupo de pesquisa possui uma área de aproximadamente 130 m², assume caráter multiusuário e disponibiliza uma infraestrutura para o preparo de amostras e condução de atividades de ensino, pesquisa e extensão,

capacitando os discentes (graduação e pós-graduação) para a realização de análises toxicológicas. Os seguintes equipamentos são disponibilizados:

- i. *UHPLC-MS/MS*. Sistema de cromatografia líquida, modelo Nexera UFLC acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo LCMS-8045 (Shimadzu, Japão);
- ii. *UHPLC-ESI-QTOF*. Sistema de cromatografia líquida, modelo UFLCXR (Shimadzu, Japão) acoplado ao sistema híbrido com analisadores quadrupolo e TOF (*time-of-flight*) em posição ortogonal modelo micrOTOF-QIII (Bruker Daltonics, USA).
- iii. *HPLC-DAD-FL*. Sistema de cromatografia líquida, modelo Prominence, composto por um detector espectrofotométrico *Photodiode Array*, modelo SPDM20A e detector de fluorescência, modelo RF-20A (Shimadzu, Japão);
- iv. *GC-MS*. Sistema de cromatografia gasosa, modelo GC-2010 A PLUS acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 Ultra (Shimadzu, Japão);
- v. *GC-FID*. Sistema de cromatografia gasosa, modelo GC-2010 A PLUS, com Detector de Ionização de Chama (FID) modelo FID-2010 PLUS (Shimadzu, Japão);
- vi. *Absorção Atômica*. Espectrofotômetro de Absorção Atômica, modelo AA-7000F versão chama (Shimadzu, Japão);
- vii. *FTIR*. Espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier, modelo IR PRESTIGE21(Shimadzu, Japão);
- viii. *DSC*. Calorímetro de Varredura Diferencial, modelo DSC-60 Plus (Shimadzu, Japão);
- ix. *Espectrofluorímetro*. Espectrofluorímetro modelo RF5301PC (Shimadzu, Japão);
- x. *Espectrofotômetro UV*. Espectrofotômetro de absorção molecular na região do Ultravioleta e Visível, modelo UV-1800 (Shimadzu, Japão).

Os demais equipamentos necessários para a síntese e caracterização dos materiais propostos serão disponibilizados pelos pesquisadores associados do projeto. Neste sentido, o laboratório de cerâmica técnica (CerTEC), da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) disponibilizará, dentre outros, os seguintes equipamentos: agitadores mecânicos e magnéticos, moinhos, atomizador (*spray-dryer*), estufas, e fornos, ultrassom e reômetro para a produção das nanopartículas. Equipamentos de análise térmica (DSC/TG), picnômetro a gás hélio, microscópio eletrônico de varredura (MEV)

para caracterização das nanopartículas. Além disso, a estrutura laboratorial do Iparque da UNESCO possui em seus laboratórios equipamentos de interesse à execução desta proposta: análise de área superficial específica e tamanho e volume de poros (BET/BJH), FTIR acoplado às análises térmicas dentre outros.

7.4. Microamostragem baseada em interações sólido-líquido

7.4.1. Materiais para síntese de nanopartículas

Materiais para a síntese de nanopartículas de sílicas: etanol etílico absoluto, ortosilicato de tetraetila (TEOS), hidróxido de amônio (NH_4OH). Materiais para a síntese de nanopartículas de sílicas mesoporosas: ortosilicato de tetraetila, brometo de cetiltrimetilamonio, água destilada, TEOS, surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), hidróxido de amônio (NH_4OH), etanol absoluto e ácido clorídrico. Materiais para a síntese de nanopartículas de hidroxiapatita: carbonato de cálcio (CaCO_3), o ácido fosfórico (H_3PO_4) e água destilada. Materiais para a síntese de nanopartículas de magnetita: nitrato férrico nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) como precursor de ferro, e o ácido cítrico anidro ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) como complexante.). Para a síntese das zeólitas aluminossilicato hidratado ($\text{Al}_4(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_8$) e hidróxido de sódio (NaOH) serão utilizados.

7.4.2. Síntese das nanopartículas de sílica sólidas

Para a realização da síntese das nanopartículas de sílica será utilizado o método de Stöber [45]. Serão preparadas duas soluções que serão nomeadas A e B. Na solução A será misturado 8,11 mL de TEOS com 13,72 mL de etanol absoluto que serão inseridos em um Erlenmeyer com agitação mecânica com um leve aquecimento a 30 °C. A solução B será preparada com 5,3 mL de água e 13,7 mL de etanol e 0,3 mL de NH_4OH e serão inseridos em um béquer. Quando pronta, a mistura B será adicionada ao Erlenmeyer com a solução A com agitação vigorosa por 24 horas a 30 °C.

7.4.3. *Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosas*

A rota para a síntese de sílicas mesoporosas será desenvolvida adaptando o método de Stöber, como base na pesquisa de [46]. Inicialmente, a vidraria a ser utilizada será limpa com uma solução aquosa 2% de ácido fluorídrico para remoção dos resquícios de contaminação. Em um béquer pequeno será pesado 1,0 g de CTAB, e 480 mL de água destilada serão inseridos em uma proveta de 500 mL. Em um erlenmeyer de 1L será adicionado 1,0 g de CTAB e os 480 mL de água. Logo em seguida será adicionado a mistura no Erlenmeyer em agitação mecânica com o auxílio de uma pipeta graduada, 3,9 mL de NH_4OH . A mistura será agitada e aquecida até 80 °C. Posteriormente 5 mL de TEOS serão adicionados a mistura gota-a-gota usando um conta-gotas com velocidade de adição de ~1gota/s. A mistura ficará sob agitação a 80 °C por 2 horas. Após esse período espera-se observar a formação de um precipitado branco. O precipitado será extraído da mistura por centrifugação e lavado com uma mistura contendo 50% água destilada e 50% etanol e posteriormente seco em estufa. Para a remoção do surfactante o material será disperso em 100 mL de solução 0,5 mol L^{-1} de HCl em etanol. O procedimento será realizado sob agitação magnética por 3 horas a ~50 °C. As nanopartículas de sílica mesoporosas serão recolhidas por centrifugação e lavadas 3 vezes com água e etanol e posteriormente secas em estufa a 80 °C.

7.4.4. *Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita*

A síntese da hidroxiapatita será realizada por meio do método reativo carbonato de cálcio/ácido fosfórico, que se faz necessário para formação da composição Ca/P. Para este estudo será utilizado a composição de razão molar de Ca/P de 1,67. O processo de síntese será realizado com a dispersão do pó de carbonato de cálcio (CaCO_3) de água destilada sob agitação mecânica. Posteriormente será adicionado gota a gota, o ácido fosfórico à suspensão. No final desse processo a suspensão será filtrada a vácuo. O pó retido no filtro será recolhido e inserido em moinho atritor para redução de aglomerados. Os pós resultantes serão secos e tratados termicamente para cristalização.

7.4.5. *Síntese de zeólitas*

Inicialmente argilomineral será tratado para a transformação da caulinita presente no caulim em metacaulinita. Posteriormente, a mistura reacional da metacaulinita e do hidróxido de sódio serão realizados em reator de teflon com camisa de aço inox e colocado em estufa a 100 °C para a reação de síntese hidrotermal por mais 24 h. Por fim, o sólido e o sobrenadante serão separados através de centrifugação (900 rpm, 5 min), e o sólido lavado para remover o excesso de hidróxido.

7.4.6. *Síntese de nanopartículas de magnetita*

Inicialmente, os reagentes serão dissolvidos em água deionizada. Em seguida, serão aquecidos a 85 °C. O gel resultante será seco em estufa a 100 °C por 24 h (xerogel). Após a secagem, o xerogel será transferido para um cadinho de alumina e tratado termicamente em diferentes condições de temperatura e tempo. As temperaturas do tratamento térmico serão determinadas por meio de análise térmica.

7.4.7. *Análise estrutural*

As fases cristalinas presentes nos pós obtidos serão determinadas por difração de raios X (DRX). Para tanto, será utilizado um equipamento da PHILIPS (modelo X'Pert MPD), equipado com monocromador curvado de grafite, radiação Cu K α (1,54184 Å) e ânodo fixo de cobre, operando a 40 kV e 40 mA. O intervalo de ângulos 2 Θ analisados será de 10 a 90°. O tamanho médio de cristalito das amostras sintetizadas será calculado utilizando a equação de Scherrer e, para a identificação das fases presentes será utilizado o banco de dados ICDD – JCPDS [47]. O material sintetizado será analisado por espectroscopia Raman, utilizando um equipamento fabricado pela RENISHAW (Invia Spectrometer System), com um laser de comprimento de onda de 532 nm. A exposição será de 20 s utilizando 5% da potência do laser. Com o objetivo de avaliar a formação dos materiais, será realizada uma caracterização por espectroscopia no Infravermelho (FTIR), os materiais serão analisados usando pastilhas de KBr (proporção 1:100 massa/massa do material em relação ao KBr) com auxílio de um equipamento Shimadzu, modelo IRPrestige.

7.4.8. *Análise térmica*

Para determinar os fenômenos associados às reações físico-químicas dos pós sintetizados com o incremento da temperatura, como também determinar a variação associada de massa das amostras, serão realizadas análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TG) (equipamento: SDT Q600 - TG-DSC, TA Instruments e Perkin Elmer – TG-ATD). As análises serão realizadas com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de N_2 , varrendo a temperatura entre 25 e 1000 $^{\circ}\text{C}$.

7.4.9. *Análise morfológica*

Com o objetivo de avaliar as características morfológicas dos materiais sintetizados, serão realizadas imagens em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (EVO MA10, Zeiss). Para a determinação do tamanho de partícula primária, as amostras serão caracterizadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando um microscópio JEM – 1200 Exll (JEOL), com uma intensidade de 80 kV e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM, JEM 2010) a 200 kV para determinação da distância interplanar.

7.4.10. *Análise da distribuição de tamanho e da estabilidade coloidal das nanopartículas*

A distribuição de tamanho das partículas será obtida por espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS90. As amostras para o ensaio de DLS serão suspensões aquosas diluídas contendo 0,5 mg/mL de magnetita. Para melhorar a dispersão das nanopartículas, diferentes quantidades de dispersante e tempos de ultrassom serão utilizadas. Os valores da carga superficial do material serão determinados a partir da utilização do equipamento Nano Z (Malvern). As medidas serão realizadas dispersando 0,1 g de cada composição em 1000 ml de água destilada, usando como eletrólito inerte o KCl ($10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$), HCl e KOH ($10^{-1}\text{ mol L}^{-1}$) para alterar o pH. A partir da curva resultante do ensaio, será possível definir o ponto de carga zero (PCZ), ou seja, o ponto onde as cargas superficiais se anulam e há floculação.

7.4.11. *Análise da área superficial*

Para determinar a área superficial específica (SBET) pelo método Brunauer Emmett-Teller (BET), será utilizado um equipamento Quantachrome Instruments, (modelo: NOVA 1000e, Estados Unidos). O tamanho e o volume de poros serão determinados pelo método BJH (Barrett-Joyner-Halenda).

7.4.12. *Desenvolvimento de metodologias extrativas*

O desenvolvimento de dispositivos DBS será realizado pelo empacotamento dos materiais absorvíveis sintetizados por prensa pneumática de bancada em formatos de pastilha para o acoplamento em placas de 24 poços, conforme o ilustrado na **Figura Suplementar 3.A**. Os dispositivos de VAMS serão confeccionados através do empacotamento de materiais absorvíveis em ponteiros descartáveis, conforme o ilustrado na **Figura Suplementar 3.B**. O dispositivo para empacotamento já está disponível em nosso laboratório e vem sendo utilizado com sucesso para otimização de técnicas com biosorventes. Paralelamente, as nanopartículas sintetizadas serão utilizadas como material dispersor para a elaboração da técnica de dSPE nas análises de novas drogas de abuso em matrizes biológicas, conforme o ilustrado na **Figura Suplementar 1. C**. A composição das fases absorvíveis será otimizada através de métodos estatísticos multivariados como o planejamento simplex-centroide, utilizando o *software* Statistica 8.0 (Statsoft, EUA).

7.4.13. *Desenvolvimento de métodos por UHPLC-MS/MS*

Como forma de avaliar a eficiência das fases absorvíveis desenvolvidas, serão comparados os parâmetros de capacidade de volume de absorção e recuperação absoluta, além de considerar a estabilidade dos analitos. A análise estatística será realizada utilizando análise de variância (ANOVA) para comparação de parâmetros entre diferentes grupos, seguido de teste de Tukey, com nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$). As análises por UHPLC-MS/MS serão realizadas no espectrômetro de massas tipo triplo-quadrupolo com ionização por *electrospray* (ESI) ou ionização química por pressão atmosférica (APCI). A otimização do espectrômetro de massas será realizada pela avaliação da temperatura da fonte, energia do capilar, fluxo de nebulização e fluxo do gás

de dissociação induzida por colisão, além das otimizações de transições MRM para cada analito. Paralelamente, a otimização das condições cromatográficas será realizada avaliando os parâmetros de tipo de coluna, composição e fluxo de fase móvel e temperatura do forno.

7.5. Microamostragem baseada em interações líquido-líquido

7.5.1. Otimização das condições da SHS-HLLME

Primeiramente, será realizada uma seleção do SHS que apresentar o melhor desempenho na extração dos compostos de interesse. Nesse caso em particular, os solventes DMCHA e DPA serão cuidadosamente avaliados por técnicas de planejamento experimental multivariado, utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft, EUA). As seguintes variáveis serão verificadas: tipo e volume de solvente; tipo, volume e concentração da solução responsável pela mudança de hidrofiliicidade (soluções ácidas e básicas); volume e pH da amostra; adição de sal e tempo de extração.

7.5.2. Desenvolvimento de métodos por UHPLC-ESI-QTOF

As análises de massa exata serão realizadas no equipamento UHPLC-ESI-QTOF. Durante a otimização do método serão avaliados parâmetros como: a temperatura da fonte, energia do capilar, fluxo de nebulização, energia do quadrupolo, energia do hexapolo, energia de colisão e frequência de aquisição. As análises serão realizadas em modo positivo e negativo, com o monitoramento de íons monocarregados ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$), multicarregados ($[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$) e possíveis adutos ($[M+H+Na]^+$; $[M+H+K]^+$; $[M+H+NH_4]^+$) sendo o sistema calibrado com uma solução de formiato de sódio (10 mM) com um erro de massas inferior a 5 ppm. Para a otimização do sistema cromatográfico serão avaliados a composição e fluxo de fase móvel e temperatura do forno.

7.6. Validação e aplicação metodológica

Após o desenvolvimento e otimização, as metodologias para amostras biológicas serão validadas de acordo as diretrizes *Guidance for the Validation of Analytical*

Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens [37] e *ANSI/ASB Standard 036 for Method Validation in Forensic Toxicology* [38] estabelecendo parâmetros de seletividade, limite de detecção e quantificação, linearidade, exatidão, precisão intra e inter-ensaio, carryover, efeito matriz, integridade de diluição e estabilidade dos analitos na matriz.

Após a completa validação das metodologias propostas, amostras oriundas de casos reais serão processadas e analisadas para a determinação dos compostos de interesse, colaborando para o mapeamento da ocorrência de NPS e fornecendo dados ao sistema de toxicovigilância para a elaboração de políticas educativas quando ao consumo de substâncias psicoativas.

7.7. Responsabilidades institucionais

O delineamento experimental e desenvolvimento metodológico serão de responsabilidade do proponente e da equipe vinculados à UFCSPA. Colaborações para a caracterização dos materiais sintetizados serão realizadas utilizando infraestrutura da UFPel e UNESCO. As amostras biológicas para aplicação e viabilidade dos produtos gerados serão obtidas pela equipe do DPL-IGP. Paralelamente, os materiais obtidos serão enviados para equipes da UFSM, USP e UNICAMP para aplicação em rotina própria dentro de um contexto de análises toxicológicas interlaboratoriais. Todas as instituições de ensino participantes comprometem-se com a formação de recursos humanos (mestrados e doutorados) vinculados a presente proposta.

8. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTOS EM CT&I

Com a implementação e execução da proposta objetiva-se alcançar os seguintes resultados e produtos em ciência, a tecnologia e a inovação.

- i. Produzir conhecimento inovador na área por meio da utilização de análises laboratoriais de ponta, mas ainda pouco exploradas;
- ii. Implementação de metodologias analíticas utilizando materiais inovadores para determinação de NPS em matrizes biológicas;
- iii. Confeção e subsequente depósito do produto no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) para a avaliação e certificação;

- iv. Fortalecimento de ações colaborativas entre as Instituições de Ensino Superior e a Instituição de Segurança Pública participantes;
- v. Estabelecer e fortalecer rede de colaboração entre pesquisadores de instituições de ensino e pesquisa estaduais e nacionais;
- vi. Propiciar formação qualificada de pesquisadores de diversas áreas da saúde em nível de mestrado, doutorado e pós-doutorado;
- vii. Publicar os principais resultados do projeto em periódicos científicos de alto impacto internacional (Quais A1 e A2).

9. CRONOGRAMA, RISCOS E DIFICULDADES

Potenciais riscos e dificuldades para execução da proposta e que podem impactar no cronograma proposto, incluem:

- i. Dificuldades na importação de insumos;
- ii. Problemas técnicos envolvendo os equipamentos de laboratório;
- iii. Dificuldades na implementação da rotina de análise laboratorial.

Os riscos citados são mitigados pela utilização de fornecedores já utilizados em outros projetos, equipamentos relativamente novos e com contratos de manutenção preventiva vigente que garante assistência periódica. Além disso, a equipe de pesquisadores envolvidos, apresenta alta qualificação e experiência na utilização das técnicas que serão necessárias para a síntese, caracterização e aplicação dos materiais citados.

Cronograma (24 meses)							
	Atividade	Tempo (meses de execução)					
		1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24
1	Reunião com os integrantes do projeto	X	X	X	X	X	X
2	Treinamento da equipe de pesquisadores	X					
3	Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X
4	Renovação orçamentos	X					

5	Compras de reagentes e insumos	X	X				
6	Síntese de nanopartículas de sílica (sólida e mesoporosa), zeólitas e hidroxiapatita e magnetita	X	X	X	X		
7	Desenvolvimento e otimização de dispositivos DBS em placas de 24 poços utilizando nanopartículas empacotas		X	X			
8	Desenvolvimento e otimização de dispositivos de VAMS em ponteiros descartáveis utilizando nanopartículas			X	X		
9	Otimização e confecção de materiais dispersores para elaboração da técnica de dSPE		X	X	X	X	
10	Caracterizar novos SHS para a construção de metodologias de microamostragem baseada em interações líquido-líquido				X	X	
11	Validação das metodologias desenvolvidas		X	X	X	X	
12	Implementação das técnicas desenvolvidas em amostras reais		X	X	X	X	
13	Análises estatísticas dos resultados da determinação de NPS em matrizes biológicas			X	X	X	X
14	Reuniões com a equipe da Instituição de Segurança Pública para análise dos resultados e discussão dos dados obtidos			X	X	X	X
15	Participação de redes de alerta nacionais e internacionais para apontar as semelhanças e disparidades entre regiões geográficas quanto ao consumo de drogas			X	X	X	X
16	Transferência de tecnologia para as instituições parceiras			X	X	X	X
17	Redação resumos para congressos; apresentação			X	X	X	X

18	Redação de artigos para publicação			X	X	X	X
19	Relatórios finais e prestação contas à FAPERGS						X

10. ORÇAMENTO

Orçamento detalhado					
Descrição			Quant.	Valor Unt.	Valor Total
Custeio	Reagentes e insumos	Consumíveis para UHPLC-MS/MS e UHPLC-ESI-QTOF (colunas cromatográficas, vials, inserts e solventes de eluição)	1	13.000,00	13.000,00
		Materiais para a síntese de nanopartículas de sílicas e síntese de nanopartículas de sílicas mesoporosas (etanol etílico absoluto, ortosilicato de tetraetila, hidróxido de amônio, surfactante brometo de cetilmetilamônio e ácido clorídrico)	1	7.150,00	7.150,00
		Materiais para a síntese de nanopartículas de hidroxiapatita (carbonato de cálcio e ácido fosfórico)	1	450,00	450,00
		Materiais para a síntese de nanopartículas de zeólitas (caulim e hidróxido de cálcio)	1	325,00	325,00
		Materiais para a síntese de nanopartículas de magnetita (nitrato férrico nonahidratado e ácido cítrico anidro)	1	920,00	920,00
		Consumíveis plásticos para confecção dos dispositivos de DBS e VAMS (placas de 24 poços e ponteiras)	1	2.500,00	2.500,00
		Consumíveis plásticos para utilização geral nas análises toxicológicas (tubos de 15 ml de polipropileno, tubos criogênicos, tubos eppendorf)	1	1.500,00	1.500,00
	Serviços de terceiros	Análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	20	200,00	4.000,00
TOTAL					R\$ 29.845,00

11. REFERÊNCIAS

- [1] Nutt, D.J. et al. Independent Scientific Committee on Drugs. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet* 376 (2010) 1558-1565.
- [2] Werb, D. et al. A call to prioritise metrics to evaluate illicit drug policy. *Lancet* 397 (2016) 1371-1371.
- [3] NIH, National Institute on Drug Abuse. Drugs, Brains, and Behavior: The Science of Addiction. NIH Pub No. 14-5605 (2020). Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/sites/default/files/soa_2020.pdf>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.
- [4] UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2019 (2020). Disponível em: <<https://wdr.unodc.org/wdr2019/index.html>>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.
- [5] Baumeister, D. et al. Legal highs: staying on top of the flood of novel psychoactive substances. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* 5 (2015) 97-132.
- [6] Weinstein, A.M. et al. Synthetic Cathinone and Cannabinoid Designer Drugs Pose a Major Risk for Public Health. *Frontiers in Psychiatry* 8 (2017) 1-11.
- [7] ANVISA, Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução – RE No 175, de 19 de setembro de 2017. Orientações sobre a classificação de substâncias proscritas por classes estruturais do grupo das catinonas sintéticas. (2017) Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/sngpc/mapainterativo/mapainterativo.html>>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.
- [8] BIRK, L. et al. A low-voltage paper spray ionization QTOF-MS method for the qualitative analysis of NPS in street drug blotter samples. *Forensic Toxicology* 38 (2020) 227-231.
- [9] Ibanez, M. et al. Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances. *Trends in Analytical Chemistry* 57 (2014) 107-117.
- [10] Eller, S. Aplicação da análise multivariada para o mapeamento dos casos de intoxicações agudas atendidos no Centro de Controle de Intoxicações da cidade de São Paulo. 2018. 246 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- [11] Santos, P.F. et al. 2-(4-iodo-2,5-dimetoxifenil)-n-[(2-metoxifenil)metil]etamina ou 25i-nbome: caracterização química de uma designer drug. *Química Nova* 39 (2016) 229-237.
- [12] Kinyua, J. et al. Qualitative screening of new psychoactive substances in pooled urine samples from Belgium and the United Kingdom. *Science of the Total Environment* 573 (2016) 1527-1535.
- [13] Jannetto, P.J. e Fitzgerald, R. L. Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* 62 (2016) 92-98.
- [14] Brown, H.M. et al. The current role of mass spectrometry in forensics and future prospects. *Analytical Methods* 12 (2020) 3974-3997.
- [15] Merib, J. et al. Magnetic ionic liquids as versatile extraction phases for the rapid determination of estrogens in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction

coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 4689-4699.

[16] Kokosa, J. et al. *Solvent Microextraction: Theory and Practice*. 2009, New Jersey: John Wiley & Sons.

[17] Birk, L., et al. Determinations of new psychoactive substances in biological matrices with focus on microextraction techniques: a review of fundamentals and state-of-the-art extraction methods. *Forensic Toxicol* 39 (2021) 350-367.

[18] Wagner, M., et al. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews* 35 (2016) 361-438.

[19] Sadones, N., et al. Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. *Bioanalysis* 6 (2014) 2211-2227.

[20] Jager, N.G.L., et al. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: a review. *Bioanalysis* 6 (2014) 2481-2514.

[21] Daousani, C., et al. Hematocrit effect on dried blood spots in adults: a computational study and theoretical considerations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 79 (2019) 325-333.

[22] Denniff, P., Spooner, N. Volumetric absorptive microsampling: a dried sample collection technique for quantitative bioanalysis. *Analytical Chemistry* 86 (2014) 8489-8495.

[23] Spooner, N., et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* 7 (2015) 653-659.

[24] Protti, M., et al. Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS). *Analytica Chimica Acta* 1046 (2019) 32-47.

[25] Nazario, C.E.D., et al. New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *Journal of Chromatography B* 1043 (2017) 81-95.

[26] Tuzimski, T., Szubartowski, S. Method development for selected bisphenols analysis in sweetened condensed milk from a can and breast milk samples by HPLC–DAD and HPLC–QQ–MS: Comparison of sorbents (Z-SEP, Z-SEP Plus, PSA, C18, Chitin and EMR-Lipid) for clean-up of QuEChERS extract. *Molecules* 24 (2019) 2093.

[27] Trujillo-Rodríguez, M.J., et al. Evolution and current advances in sorbent-based microextraction configurations. *Journal of Chromatography A* 1634 (2020) 461670.

[28] Mafra, G., et al. Returning to nature for the design of sorptive phases in solid-phase microextraction. *Separations* 7 (2020) 2.

[29] Godage, N.H., Gionfriddo, E. Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: a critical review. *Analytica Chimica Acta* 1125 (2020) 187-200.

[30] Gañán, J.; Morante-zarcelo, S.; Pérez-quintanilla, D.; Sierra, I. Evaluation of Bi-Functionalized Mesoporous Silica for Solid-Phase Extraction of Twelve Endocrine Disrupting Compounds from Water. *Mater Lett* 2014, 132, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.06.042>.

[31] Grela, A.; Kuc, J. A Review on the Application of Zeolites and Mesoporous Silica Materials in the Removal of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Antibiotics from Water. 2021.

- [32] Li, Z.; Zhang, Y.; Feng, N. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Classification, Drug Loading, Pharmacokinetics, Biocompatibility, and Application in Drug Delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2019, 16 (3), 219–237. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1575806>.
- [33] Gordienko M, Karakatenko E, Menshutina N, Koroleva M, Gilmutdinova I, Eremin P. Composites Composed of Hydrophilic and Hydrophobic Polymers, and Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Study of Their Biocompatible Properties. *J Funct Biomater*. 2021 Oct 1;12(4):55. doi: 10.3390/jfb12040055.
- [34] Pugliese, J., Boyce, M.C., Lawler, N.G. et al. Dispersive SPE, an alternative to traditional SPE for extraction of 43 doping peptides from equine urine prior to LC–MS screening. *Forensic Toxicol* 38, 365–377 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00524-z>
- [35] Anastassiades M, Lehotay SJ, štajnbaher D (2003) Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. WTQA 2002—18th annual waste testing and quality assurance symposium, Arlington 231–24. Doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.081
- [36] Herrero P, Borrull F, Pocurull E, Marce RM (2014) A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method followed by liquid chromatography–(Orbitrap) high resolution mass spectrometry to determine benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. *J Chromatogr A*. 1339:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.chrom.a.2014.02.081>
- [37] Forsberg ND, Wilson GR, Anderson KA (2011) Determination of parent and substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in high-fat salmon using a modified QuEChERS extraction, dispersive SPE and GC-MS. *J Agric Food Chem* 59:8108–8116. <https://doi.org/10.1021/jf201745a>.
- [38] Ahmar, H., et al. Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Homogenous Liquid–Liquid Microextraction (SHS-HLLME) Combined with GC-FID for the Quantification of Methadone and Tramadol. *Chromatographia* 81 (2018) 1063–1070.
- [39] Lasarte-Aragónés, G., et al. Use of switchable solvents in the microextraction context. *Talanta* 131 (2015) 645–649.
- [40] Jessop, P.G., et al. A solvent having switchable hydrophilicity. *Green Chemistry* 12 (2010) 809–81.
- [41] Vanderveen, J.R., et al. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents. *Green Chemistry* 16 (2014) 1187–1197.
- [42] Oenning, A.L., et al. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography B* 1143 (2020) 122069.
- [43] Jessop, P.G., et al. Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity. *Green Chemistry*, 13 (2011) 619–623.
- [44] Scheid, C., et al. Application of Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction With Switchable Hydrophilicity Solvents to the Determination of MDMA, MDA and NBOMes in Postmortem Blood Samples, *Journal of Analytical Toxicology* bkab100 (2021).

- [45] STÖBER, Werner; FINK, Arthur; BOHN, Ernst. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid And Interface Science* [s. l.], 1968. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- [46] DOADRIO, Antonio L et al. Mesoporous silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, [s. l.], v. 97, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.002>
- [47] P. Scherrer, “Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen,” *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Math. Klasse*, vol. 1918, no. 1916, pp. 98–100, 1918.
- [48] UNODC, *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*, United Nations, Austria, 2009 ISBN 978-92-1-148243-0, Oct 2009.
- [49] AAFS Standards Board 2019, *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, American Academy of Forensic Sciences, http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036_Std_e1.pdf.

ANEXO I. SÚMULA CURRICULAR

O proponente do projeto, Prof. Dr. **Tiago Franco de Oliveira**, possui bacharelado em Ciências Biomédicas (concluído em 2007), doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas (concluído em 2012) e pós-doutorado em Toxicologia (2013-2017). Atualmente é Professor Nível Adjunto I, Classe C, na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), na Área de Conhecimento de Toxicologia Analítica, Ambiental, Forense e Social, tendo tomado posse no dia **19 de setembro de 2017**. Exerce os cargos de Chefe do Departamento de Farmacociências (2019 – atual), vice-coordenador do curso Superior Tecnológico em Toxicologia Analítica (2019 – atual) e membro da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (2018 – atual; área de concentração Farmacologia e Toxicologia; Conceito CAPES 5) da instituição. Adicionalmente, é líder do Grupo de Pesquisa em Espectrometria de Massas (UFCSPA; dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/8091411418737545), integrante do Grupo de Pesquisa em Controle de Qualidade de Medicamentos – Biofarmácia (UFRGS; dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/3384009381526048), Presidente da Sociedade Brasileira de Toxicologia (Biênio 2020 - 2021), membro da *The International Association of Forensic Toxicologists* (2017 - atual) e membro do corpo editorial do periódico *Drug Analytical Research* (2021 – atual). Concentra atividades de pesquisa na área de Espectrometria de Massas aplicada ao desenvolvimento de estratégias de diagnóstico laboratorial. As atividades desenvolvidas são voltadas para o entendimento de vias/mecanismos envolvidos nos processos associados a patologias, assim como nos efeitos tóxicos decorrentes da exposição à xenobióticos. Assim, sua pesquisa tem por objetivo desenvolver procedimentos de espectrometria de massas para quantificação de fármacos, esteróides anabolizantes, drogas de abuso lícitas, ilícitas e seus produtos de biotransformação, além de metabólitos alvos específicos. O proponente apresenta produção científica e tecnológica regular e de qualidade com um total de 328 citações e 41 artigos publicados no quinquênio avaliado (2016 – 2022). No período avaliado o proponente figurou como primeiro ou último autor de 10 trabalhos científicos (10.1038/srep40544; 10.1021/acs.jafc.8b05669; 10.1186/s12989-018-0276-y; 10.3791/59734; 10.1007/s11419-020-00522-1; 10.22456/2527-2616.108853; 10.1016/j.forsciint.2020.110298; 10.1007/s11419-019-00496-9; 10.1007/s11419-020-00558-3; 10.1007/s11419-021-00582-x). Quanto a formação de recursos humanos o

proponente possui no período 5 orientações de mestrado, 10 orientações de trabalho de conclusão de curso e 9 orientações de iniciação científica concluídas. Possui ainda as seguintes orientações em andamento: 1 iniciação tecnológica e inovação, 3 iniciações científicas, 2 trabalhos de conclusão de curso, 7 mestrados, 2 doutorados (sendo um em regime de cotutela internacional com Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal) e 1 pós-doutorado. Além disso, o proponente obteve os seguintes auxílios financeiros no período em projetos sob sua coordenação: Processo 401715/2019-1, Chamada ARC nº 04/2019 - LINHA 2: EVENTOS NACIONAIS OU INTERNACIONAIS – CNPq, valor: R\$ 40.000,00; Processo PAEP-01-20191239646P, Programa de Apoio a Eventos no País (PAEP)-01-2019 – CAPES, valor: R\$ 103.000,00; Edital 07/2020/PROPPG. Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA, valor: R\$ 15.000,00; Edital 04/2021/PROPPG. Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA, valor: R\$ 10.000,00; Edital 01/2021. Auxílio para a Organização de Eventos (AOE) - FAPERGS, valor: R\$ 12.000,00.

ANEXO II. TERMO/PARECER COMITÊ DE ÉTICA

O arquivo foi anexado no Sistema SIGFAPERGS.

ANEXO III. FIGURAS SUPLEMENTARES

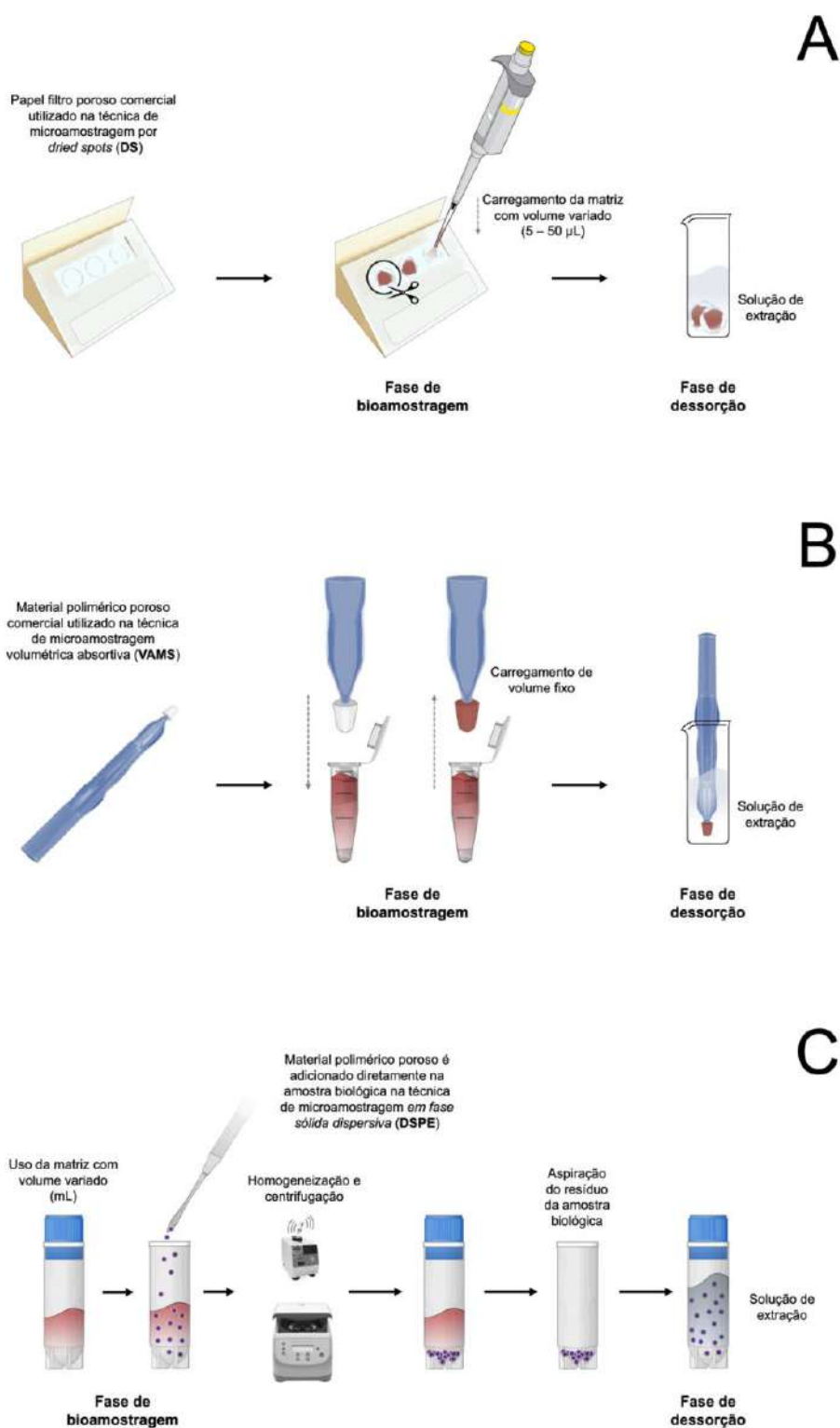


Figura Suplementar 1. A. Dispositivo comercial de DBS e fluxo de preparo de amostras. B. Dispositivo comercial de VAMS e fluxo de preparo de amostras. C. Fluxo de trabalho e preparo de amostras da dSPE.

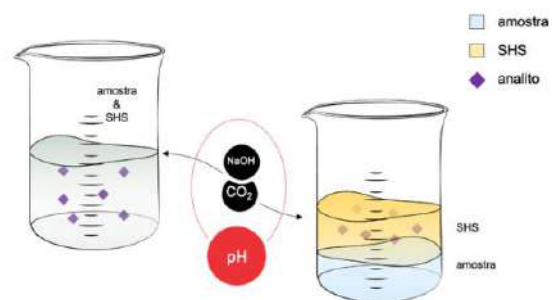


Figura Suplementar 2. Comportamento de um solvente de hidrofilicidade comutável quando ocorre a adição ou remoção de CO_2 .

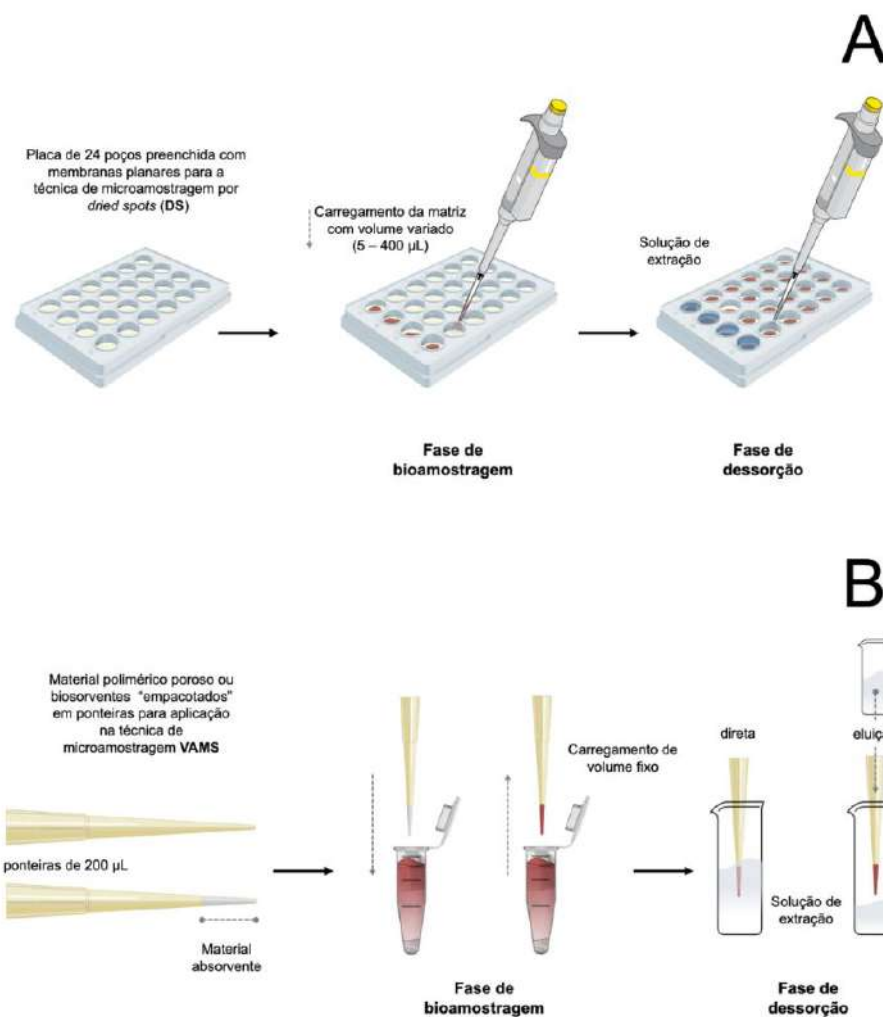


Figura Suplementar 3. A. B. Proposta para o desenvolvimento de dispositivos DBS pelo empacotamento de materiais absorventes por prensa pneumática de bancada em formatos de pastilha para o acoplamento em placas de 24 poços. **B.** Proposta para o desenvolvimento de dispositivos VAMS pelo empacotamento de materiais absorventes em ponteiros descartáveis.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE PORTO ALEGRE

**O IMPACTO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E SALIVAR NO
PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CIRROSE**

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Ângelo Zambam de Mattos

Porto Alegre, maio de 2022

RESUMO

Introdução: o curso clínico da cirrose está relacionado ao desenvolvimento de diversas complicações, as quais têm importante implicação no prognóstico da doença. Recentemente, o reconhecimento da disbiose pela composição da microbiota intestinal e salivar emergiu como um potencial indicador de complicações nesse grupo de pacientes. **Objetivos:** avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar no prognóstico de pacientes cirróticos. **Métodos:** este é um estudo de coorte prospectivo de pacientes consecutivos ambulatoriais e internados com diagnóstico de cirrose no Hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre RS. Serão selecionados pacientes com diagnóstico de cirrose atendidos na enfermaria e nos ambulatórios dos serviços de Gastroenterologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Os pacientes selecionados serão estratificados em um grupo controle (sem hepatopatia), um grupo cirrose ambulatorial (sem descompensação aguda ou doença hepática crônica agudizada), um grupo cirrose com descompensação aguda e sem insuficiência hepática crônica agudizada, um grupo cirrose com insuficiência hepática crônica agudizada e um grupo de pacientes pós-transplante hepático. Os pacientes serão submetidos à coleta de fezes e saliva para análise de microbiota através de sequenciamento de nova geração conduzido na plataforma Illumina MiSeq. O software QIIME versão 1.9.0 será usado para estimar alfa e beta diversidades. Abundância das unidades taxonômicas operacionais será calculada pela métrica da alfa diversidade. Será incluída análise do índice de diversidade de Shannon e Simpson. Para análise da microbiota fecal, também será calculada a razão cirrose disbiose (*cirrhosis dysbiosis ratio*). O desfecho principal será mortalidade em 1, 3 e 12 meses de seguimento. Análises de sobrevida de Kaplan-Meier serão realizadas considerando o tempo até o evento em dias desde a inclusão no estudo até a morte ou transplante de fígado. Análise de regressão de riscos proporcionais de Cox será realizada para avaliar as variáveis associadas à mortalidade.

Palavras-chaves: Cirrose; Microbiota; Mortalidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	4
2. JUSTIFICATIVA:	9
3. OBJETIVOS:	9
3.1 OBJETIVO GERAL:	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	9
4. METODOLOGIA	10
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:	10
4.2 DIVULGAÇÃO:	11
4.3 TIPO DE ESTUDO:	11
4.4 LOCAIS PARA A REALIZAÇÃO DE PESQUISA:	12
4.5 SELEÇÃO DA AMOSTRA, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	12
4.6 ESTIMATIVA DE TAMANHO AMOSTRAL:	14
4.7 EXPOSIÇÃO PRINCIPAL:	14
4.8 COVARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS, MÉDICAS E ODONTOLÓGICAS:	15
4.9 COVARIÁVEIS ODONTOLÓGICAS	16
4.9.1 PERIODONTITE:	16
4.9.2 EXPERIÊNCIA DE CÁRIE (ÍNDICE CPO-D):	17
4.10 DESFECHO PRINCIPAL	17
4.11 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO E ANÁLISE DOS DADOS	17
4.11.1 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO	17
4.11.2 ANÁLISE DOS DADOS	18
5. REPERCUSSÕES DO ESTUDO	19
6. CRONOGRAMA	20
7. ORÇAMENTO	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. INTRODUÇÃO:

A cirrose é o estágio final das doenças hepáticas crônicas e pode resultar de inflamação hepática crônica de qualquer causa. Na sua história natural, a cirrose pode permanecer compensada por um longo período ou evoluir, em uma taxa estimada de 5% ao ano, para um estágio de descompensação. (1, 2)

O curso clínico da doença está relacionado ao desenvolvimento de diversas complicações, como ascite, encefalopatia hepática, icterícia, hemorragia varicosa, infecções, disfunção renal e insuficiência hepática crônica agudizada, denominada em inglês “acute-on-chronic liver failure” (ACLF).(3) Tais complicações podem ocorrer isoladamente ou de maneira associada e têm importante implicação no prognóstico da doença.(1, 4)

A descompensação aguda (DA) representa um divisor de águas na evolução da cirrose, uma vez que, após atingir os estágios de descompensação os pacientes apresentam um incremento significativo na suscetibilidade a infecções e, conseqüentemente, disfunções orgânicas.(3) As infecções representam uma das razões mais importantes de progressão da insuficiência hepática, desenvolvimento de complicações e mortalidade nesses pacientes.(5)

A ACLF é uma complicação caracterizada pela DA da hepatopatia crônica, associada a uma ou mais falências orgânicas e alta taxa de mortalidade a curto prazo.(3) Diferentes definições são propostas para o seu diagnóstico. Uma definição foi proposta pela Associação Ásia-Pacífico para o Estudo do Fígado (Asian Pacific Association for the Study of the Liver – APASL) em 2009.(6) Posteriormente, a criação de um consórcio de

pesquisa pela APASL (APASL ACLF Research Consortium - AARC) permitiu a atualização dos critérios em publicações de 2014 e 2019.(7, 8)

Outra definição de ACLF foi proposta em um estudo multicêntrico prospectivo observacional europeu (estudo CANONIC), publicado em 2013. Tais critérios, propostos pelo Chronic Liver Failure Consortium (CLIF-C), filiado à Associação Europeia para o Estudo do Fígado (European Association for the Study of the Liver – EASL), foram apresentados e possuem alta capacidade preditiva de mortalidade.(9)

Uma terceira definição foi proposta pelo Consórcio Norte-Americano para o Estudo da Doença Hepática em Estágio Terminal (North American Consortium for the Study of End-Stage Liver Disease – NACSELD). Para a definição dos critérios, foram avaliados dados de pacientes hospitalizados com cirrose e infecção.(10) Em 2018, O'Leary *et al.* validaram estes critérios como uma ferramenta confiável para prever a sobrevida em 30 dias de pacientes cirróticos hospitalizados com e sem infecção.(11)

Recentemente, um estudo de coorte prospectivo de nosso grupo, comparando os três diferentes critérios de ACLF, demonstrou que a definição do CLIF-C não apenas permitiu o diagnóstico de um maior número de pacientes com ACLF, como também obteve melhor desempenho em prever mortalidade aos 28 e 90 dias, quando comparada às definições de NACSELD e AARC.(12)

Tradicionalmente, o principal mecanismo fisiopatológico descrito para explicar a DA na cirrose consistia na síndrome circulatória hiperdinâmica.(13) Neste contexto, a vasodilatação arterial periférica que ocorre principalmente na circulação esplâncnica colocaria em risco a volemia efetiva, levando à hipoperfusão de outros órgãos.

De fato, a redução da volemia efetiva provoca a ativação de sistemas vasoconstritores e mecanismos de retenção de sódio e água, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso simpático.(13-15) Isso pode explicar algumas das principais características da cirrose descompensada, como a ascite e a síndrome hepatorrenal. Entretanto, pareciam obscuros os fatores desencadeantes ou agravantes do estado de circulação hiperdinâmica, até que, mais recentemente, um estado inflamatório crônico foi demonstrado nos pacientes com cirrose avançada, fortalecendo ainda mais a plausibilidade dos mecanismos de descompensação aguda através da manutenção do estado circulatório hiperdinâmico e da disfunção de órgãos.(16)

O estado inflamatório crônico da cirrose é demonstrado através do aumento do nível circulante de citocinas pró-inflamatórias. Entre outros fatores, a propagação sistêmica de bactérias e produtos bacterianos, como resultado de uma translocação bacteriana anormal, desempenha um importante papel no aumento desses produtos da imunidade inata.(17)

Um dos mecanismos que contribuem para a manutenção da translocação bacteriana anormal nesses pacientes é a disbiose intestinal.(18, 19) Alguns estudos associaram as alterações na microbiota intestinal com a progressão da doença hepática, potencializando a inflamação sistêmica e piorando o prognóstico da doença.(20, 21)

O microbioma bacteriano intestinal humano é amplamente classificado em múltiplos filos, sendo que os mais relevantes clinicamente na cirrose são os Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacterias.(19) Os táxons autóctones, ou seja, os táxons responsáveis pela homeostase intestinal, consistem principalmente nos Firmicutes.

Essas bactérias são importantes para a síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) a partir de carboidratos.(22) Estes AGCC têm propriedades locais de estabilização da barreira intestinal e servem como nutrientes para as células da parede intestinal. Os táxons autóctones também contêm bactérias que exercem função na conversão de ácidos biliares primários em ácidos biliares secundários.(23) Já os táxons não autóctones são formados por várias outras espécies bacterianas, como as bacterias gram-negativas *Escherichia Coli* e *Klebsiella*, as quais são frequentemente isoladas em infecções espontâneas no cirrótico.(19, 24) Quando ocorre disbiose, os mecanismos homeostáticos descritos acima estão desorganizados, e as bactérias patogênicas tendem a predominar, favorecendo o desenvolvimento de infecções e a manutenção do estado inflamatório. (19, 25)

Assim como a microbiota intestinal, a microbiota oral também parece desempenhar papel no estado inflamatório e no prognóstico dos pacientes com cirrose. (26, 27) A microbiota oral pode ter potencial benéfico ou patogênico e é mantida em equilíbrio pelos mecanismos naturais de defesa da cavidade oral.(28, 29). Evidências recentes sugerem que algumas alterações da microbiota intestinal em cirróticos podem estar associadas à invasão maciça do intestino por bactérias orais.(30)

O microbioma oral é um ecossistema complexo com mais de 700 espécies bacterianas, além de vários vírus e fungos. Este ecossistema é composto por diferentes filos, como Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria e Actinobacteria. Esse microbioma coloniza as superfícies dos nichos biogeográficos orais, como dentes, língua, bochechas, gengiva e os palatos.(31) Uma série de doenças sistêmicas tem sido associadas à disbiose oral,(32-34) assim como à presença de doenças bucais

inflamatórias de origem infecciosa, como periodontite, periodontite apical e perda dentária.(35-40)

Quanto à cirrose, alguns dados demonstram que há evidências de alteração na microbiota salivar desses pacientes, quando comparada àquela de controles saudáveis.(26, 27) Além disso, a disbiose está associada ao aumento da circulação de mediadores inflamatórios sistêmicos e ao número de hospitalizações relacionadas ao fígado em um acompanhamento de 90 dias.(26)

Recentemente, um outro estudo com pacientes de diferentes centros nos Estados Unidos e no México demonstrou diferenças na composição microbiana nas fezes e na saliva de pacientes com cirrose e relatou associação entre as alterações do microbioma e a necessidade de hospitalização em 90 dias, independentemente da dieta ou local de origem.(27)

Os avanços tecnológicos no sequenciamento genômico e na bioanalítica estão revolucionando a compreensão do microbioma dos tecidos em relação às doenças hepáticas. O conhecimento a respeito da microbiota intestinal de pacientes com cirrose tem avançado de modo consistente nos últimos anos. No entanto, do ponto de vista prático, a saliva é mais facilmente acessível para coleta quando comparada à amostragem fecal. Assim, a microbiota salivar também emergiu como um potencial indicador de complicações e prognóstico nos pacientes com cirrose.(41)

Considerando ainda que as estratégias atuais para profilaxia e tratamento da descompensação e falência orgânica na cirrose dependem de medidas destinadas a prevenir ou melhorar as diferentes complicações, o conhecimento atual da base fisiopatológica da descompensação possibilita abordarmos mecanismos até há pouco

tempo desconhecidos e que podem prevenir ou retardar a progressão da doença.(3)
Entre estes mecanismos, está o reconhecimento da disbiose pela composição da microbiota intestinal e salivar.(19)

2. JUSTIFICATIVA:

Dessa forma, considerando o curso clínico da cirrose e o impacto na sobrevivência dos pacientes que apresentam descompensação, há justificativa para testar a hipótese de que a composição da microbiota intestinal e salivar de pacientes ambulatoriais e internados com cirrose tem impacto no prognóstico e pode ser um marcador para prever o desenvolvimento de ACLF e morte.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar no prognóstico de pacientes cirróticos.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar a composição da microbiota intestinal e salivar de pacientes cirróticos ambulatoriais (sem DA ou ACLF) e hospitalizados (com DA ou ACLF), bem como aquela de pacientes cirróticos submetidos a transplante hepático;
- Comparar os índices de disbiose intestinal e salivar entre os grupos controle sem hepatopatia, com cirrose sem DA, com cirrose com DA (mas sem ACLF), com cirrose e ACLF e no grupo pós-transplante;
- Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar na mortalidade em 1, 3 e 12 meses de pacientes cirróticos sem DA ou ACLF;

- Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar na mortalidade em 1, 3 e 12 meses de pacientes cirróticos com DA, mas sem ACLF;
- Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar na mortalidade em 1, 3 e 12 meses de pacientes cirróticos com ACLF;
- Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar na mortalidade em 1, 3 e 12 meses de pacientes cirróticos submetidos a transplante hepático;
- Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar no desenvolvimento de ACLF em pacientes ambulatoriais (sem DA ou ACLF) em 12 meses;
- Avaliar o impacto da composição da microbiota intestinal e salivar no desenvolvimento de ACLF durante a internação hospitalar de pacientes com DA sem ACLF no momento da internação.
- Correlacionar a composição da microbiota intestinal e salivar com parâmetros clínicos e radiográficos de saúde bucal (doenças periodontais, pulpares e periapicais, cárie e perda dentária).
- Avaliar a associação entre os parâmetros de saúde bucal e a mortalidade em 1, 3 e 12 meses nos grupos controle sem cirrose, com cirrose sem DA, com cirrose com DA, mas sem ACLF, e com cirrose e ACLF.

4. METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas:

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Os pacientes

só serão incluídos no estudo, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

Os riscos aos pacientes são considerados mínimos, já que se trata de um estudo observacional, em que nenhuma intervenção será realizada em relação aos pacientes. O tratamento dos pacientes não será modificado em qualquer momento em função da pesquisa. A coleta de material biológico não será invasiva (coleta de fezes e saliva). Os pacientes apenas precisarão dedicar um tempo adicional às coletas de saliva e fezes, além de dedicar tempo adicional para realização de exame clínico odontológico.

Qualquer projeto como este poderia implicar um risco pequeno de exposição de informações pessoais dos sujeitos de pesquisa. Para evitar tal risco, o anonimato dos pacientes será garantido através do uso de códigos específicos do projeto na identificação dos mesmos e de suas amostras de material biológico, respeitando a resolução 466/12. As publicações decorrentes deste projeto tratarão dos dados de maneira conjunta, de modo que nenhum paciente será identificável. Assim, os riscos do estudo são considerados mínimos.

4.2 Divulgação:

Os resultados do estudo serão divulgados em congressos e periódicos médicos, sejam eles considerados favoráveis ou desfavoráveis, sempre respeitando o anonimato dos pacientes. Seguiremos a declaração *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) para condução e divulgação de estudos observacionais.

4.3 Tipo de estudo:

Estudo de Coorte prospectivo

4.4 Locais para a realização de pesquisa:

As coletas de material biológico e de dados clínicos, assim como o exame clínico odontológico, serão realizadas na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, na enfermaria e nos ambulatórios do Serviço de Gastroenterologia. As análises relativas à microbiota intestinal e salivar serão realizadas no laboratório de biologia molecular da UFCSPA.

4.5 Seleção da amostra, critérios de inclusão e exclusão:

Serão selecionados pacientes atendidos de maneira consecutiva na enfermaria e nos ambulatórios dos serviços de Gastroenterologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O diagnóstico de cirrose será considerado pela histologia, evidência radiológica ou elastográfica de cirrose ou evidência endoscópica de varizes no cenário de doença hepática crônica. O diagnóstico de DA será definido de acordo com a presença de um ou mais dos seguintes critérios: desenvolvimento de ascite de grau 2 ou 3 em menos de duas semanas, encefalopatia hepática, hemorragia gastrointestinal ou infecção bacteriana.(9)

A definição CLIF-C será utilizada para o diagnóstico de ACLF, considerando os seguintes critérios: (1) pacientes com falência renal única (creatinina sérica ≥ 2 mg/dL); (2) pacientes com falência de órgão única (hepática, coagulação, circulação ou respiração) com nível de creatinina sérica variando de 1,5 a 1,9 mg/dL e/ou encefalopatia hepática leve a moderada; (3) pacientes com falência cerebral única que apresentem creatinina sérica entre 1,5 e 1,9 mg / dL; e (4) pacientes com duas ou mais falências de órgãos. As definições para cada falência orgânica seguirão os critérios definidos no estudo CANONIC.(9)

Um grupo controle será formado por pacientes atendidos no ambulatório de Gastroenterologia sem o diagnóstico de hepatopatia. Para um segundo grupo serão recrutados prospectivamente pacientes ambulatoriais com cirrose e sem critérios para DA ou ACLF. Em um terceiro grupo serão selecionados pacientes com diagnóstico de cirrose e internados por DA, mas sem critérios para ACLF. Em um quarto grupo, pacientes com cirrose e com critérios para ACLF serão recrutados. Finalmente, o quinto grupo será composto por pacientes com cirrose submetidos a transplante hepático (na quarta semana de pós-operatório). A seleção dos pacientes se dará no período de tempo entre julho de 2021 e dezembro de 2023.

- Critérios de inclusão:

Grupo controle:

- Pacientes sem diagnóstico de hepatopatia.

Grupo cirrose ambulatorial (sem DA ou ACLF):

- Paciente com diagnóstico de cirrose e sem critérios para descompensação aguda.

Grupo cirrose com DA e sem ACLF:

- Pacientes com diagnóstico de cirrose.
- Pacientes hospitalizados por DA (ascite, encefalopatia hepática, hemorragia digestiva ou infecção bacteriana) e que não preencham critérios para ACLF.

Grupo cirrose com ACLF

- Pacientes com diagnóstico de cirrose
- Pacientes hospitalizados por DA (ascite, encefalopatia hepática, hemorragia digestiva ou infecção bacteriana) que preencham critérios para ACLF (conforme os critérios CLIF-C).(9)

Grupo transplantado:

- Pacientes com cirrose na quarta semana pós-transplante hepático.
- Critérios de exclusão:
 - Pacientes menores de 18 anos.
 - Pacientes que recusarem ou foram incapazes de fornecer fezes ou saliva
 - Pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).
 - Neoplasia extra-hepática nos 2 anos anteriores ao estudo.
 - Carcinoma hepatocelular avançado (de acordo com os critérios de Milão).

4.6 Estimativa de tamanho amostral:

A estimativa do tamanho amostral foi realizada utilizando as diferenças de proporções para o desfecho mortalidade apresentadas no estudo CANONIC.(9) Para o cálculo amostral foi utilizado o software G* Power 3.1.9.6, fixando o poder de teste em 80% e α em 0,05. O cálculo amostral resultou em 22 indivíduos por grupo, somando um total de 110 participantes.

4.7 Exposição Principal:

A exposição principal será a composição da microbiota intestinal e salivar, que serão analisadas em amostras de fezes e saliva dos pacientes incluídos no estudo. Para a coleta de saliva, todos os indivíduos serão orientados a enxaguar a boca com 15 ml de solução salina por um minuto conforme protocolo já publicado.(42) Os pacientes internados terão a coleta realizada nas primeiras 24 horas de internação. O material será transportado em temperatura de até 4° C e armazenado em freezer da sala de biologia

molecular da UFCSPA a -20° C, até a realização das análises. Para a coleta de fezes os pacientes serão orientados a coletar fezes em um recipiente plástico descartável, acoplado em vaso sanitário. Os pacientes internados terão a coleta realizada nas primeiras 24 horas de internação. Posteriormente, a amostra será transportada, em recipiente com temperatura de até 4° C, para a sala de biologia molecular da UFCSPA e será mantida a -20° C até a realização das análises.

4.8 Covariáveis sócio-demográficas, médicas e odontológicas:

As variáveis médicas e sócio-demográficas de confundimento serão avaliadas através do prontuário médico e da anamnese. Não serão realizados exames adicionais (além da análise da microbiota intestinal e salivar) com o propósito deste estudo, sendo apenas utilizadas as informações disponíveis nos prontuários, relativas a exames realizados na rotina assistencial dos pacientes e informações coletadas através de um contato telefônico com o paciente durante o seguimento.

Variáveis sócio-demográficas:

Sexo	Idade
Cor de pele	

Variáveis médicas de interesse:

Etiologia da cirrose	Causa da internação atual
Histórico de tabagismo	Uso atual de drogas ilícitas
Histórico de etilismo	Internações prévias
Ascite	Encefalopatia hepática
Diabetes Mellitus tipo 2	Histórico alimentar nas últimas 24 horas da coleta de saliva ou fezes

Uso atual ou nos últimos 30 dias de antibióticos	Uso de antibioticoprofilaxia para peritonite bacteriana espontânea
Uso de Rifaximina	Uso de Lactulose
Uso de Inibidor de bomba de próton	Uso de beta-bloqueadores
Sódio sérico	Razão Normalizada Internacional (RNI)
Albumina sérica	Bilirrubina sérica
Creatinina sérica	MELD score
MELD Na score	Child-Pugh score
CLIF C ACLF score	CLIF C AD score
Índice de massa corporal (IMC)	Presença de carcinoma hepatocelular

4.9 Covariáveis odontológicas

Algumas variáveis odontológicas de confundimento como cárie, número de dentes presentes e a presença de periodontite serão avaliadas através de um exame clínico odontológico. O exame clínico odontológico intra e extra oral, será realizado em todos os pacientes incluídos no estudo, através de palpação, inspeção e sondagem periodontal, buscando identificar a presença de cárie e doenças periodontais, pulpares e periapicais. Os critérios específicos para diagnóstico de cada uma das variáveis são descritos em detalhes a seguir:

4.9.1 Periodontite:

A avaliação clínica periodontal será realizada utilizando-se uma sonda periodontal manual (Newmar, São Paulo, Brasil) por um avaliador previamente calibrado. Para esta avaliação será realizado um exame periodontal avaliando a profundidade de sondagem (PS), presença de sangramento à sondagem (SS) e nível clínico de inserção (NCI). O procedimento supracitado, ocorre com a introdução da sonda periodontal no sulco

gengival livre, não acarretando nenhum dano ao tecido gengival ou estruturas adjacentes. Este é um procedimento de rastreio de doença, não se caracterizando como procedimento terapêutico.

Será mensurado a PS, NCI e SS pelo método simplificado utilizando-se três sítios de sondagem (mesio vestibular, vestibular e disto lingual/palatino) em todos os dentes presentes.(36)

4.9.2 Experiência de Cárie (índice CPO-D):

A experiência de cárie será avaliada pelo índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D),(37) além de avaliar o número de dentes presentes tanto na maxila como na mandíbula.

Para os pacientes internados, esses exames serão realizados no próprio leito hospitalar de forma que não interfira na rotina dos atendimentos do hospital.

Variáveis odontológicas de interesse:

Experiência de Cárie (Índice CPO-D)	Periodontite
Número de dentes	

4.10 Desfecho principal

O desfecho principal será mortalidade em 1, 3 e 12 meses de seguimento. Tal desfecho será verificado através de análise de prontuário ou de ligações telefônicas.

O desfecho secundário será o desenvolvimento de ACLF entre os pacientes cirróticos sem esta condição no momento da inclusão.

4.11 Sequenciamento de alto desempenho e análise dos dados

4.11.1 Sequenciamento de alto desempenho

A confecção das bibliotecas para o sequenciamento será realizada conforme protocolo estabelecido pela Illumina.(38) Após a obtenção das bibliotecas, o

sequenciamento será conduzido na plataforma Illumina MiSeq com o MiSeq Reagent Kit v2, 500 cycles (Illumina®,USA).

4.11.2 Análise dos dados

As variáveis numéricas com distribuição normal serão expressas em média $\pm$ desvio padrão (DP). As variáveis numéricas com distribuição não normal serão expressas em mediana. As variáveis qualitativas serão representadas por frequência (%).

Análise de regressão de riscos proporcionais de Cox será realizada para avaliar as variáveis associadas à mortalidade. Todas as variáveis associadas à mortalidade na análise univariada com p-valor $<0,25$ serão consideradas potenciais confundidoras e serão incluídas nos modelos multivariados, onde o valor para rejeição da hipótese nula será estabelecido em $p < 0,05$. Um teste χ^2 será usado para comparar a mortalidade entre os grupos. Alfa será estabelecido em 0,05.

Também serão realizadas análises de sobrevida de Kaplan-Maier, avaliando o tempo até o evento em dias desde a inclusão no estudo. O transplante ortotópico de fígado (OLT) será considerado um desfecho competitivo. A análise dos dados será realizada por meio do software Statistical Package for Social Sciences TM versão 26.

Quanto às sequências obtidas, estas serão inicialmente avaliadas e trimadas quanto à qualidade usando Mothur v.1.41.1. Após, as sequências remanescentes serão agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) baseando-se na identidade de 97% e serão classificadas utilizando o banco de dados SILVA V1.3.2.(43) O software QIIME versão 1.9.0 será usado para estimar alfa e beta diversidades.(44) Abundância das OTUs será calculada pela métrica da alfa diversidade. Será incluída análise do índice de diversidade de Shannon e Simpson. Para análise da microbiota fecal, também será

calculada a proporção de táxons autóctones para não autóctones através da razão cirrose disbiose (*Cirrhosis Dysbiosis Ratio* - CDR).(25)

Para uma comparação geral de diferenças significantes entre as comunidades bacterianas, será realizada a análise de coordenadas principais (PCoA). Comparações adicionais serão obtidas pelos métodos de agrupamento baseado em Bray-Curtis e correlação de Person. Os resultados dos agrupamentos serão visualizados através de mapas de calor (heatmaps) e dendogramas. Adicionalmente, o teste de Kruskal-Wallis e a análise de discriminantes lineares (LDA) serão realizados para determinar significância estatística. A comparação do perfil funcional de cada população bacteriana será realizada usando o teste PERMANOVA.

5. REPERCUSSÕES DO ESTUDO

Caso seja confirmada a hipótese de associação entre a disbiose intestinal, salivar e parâmetros de saúde bucal e o desenvolvimento de ACLF e morte em pacientes com cirrose, será possível reforçar a necessidade de novas estratégias de correção e prevenção da disbiose, assim como buscar abordagens voltadas à redução dos fatores de risco para as principais doenças bucais.

Além disso, caso os resultados deste estudo clínico observacional confirmem a hipótese da associação pesquisada, estes achados incentivarão a realização de novos estudos clínicos e laboratoriais voltados a elucidar os mecanismos patogênicos que ligam a disbiose intestinal, salivar e as doenças de origem bucal com o desenvolvimento de ACLF e morte.

6. CRONOGRAMA

Meses referente ao ano de 2021

ETAPA/PERÍODO	Mês 01	Mês 02	Mês 03	Mês 04	Mês 05	Mês 06	Mês 07	Mês 08	Mês 09	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Delineamento do Projeto	X											
Elaboração do Projeto	X	X	X	X	X							
Encaminhamento e Aprovação no CEP						X	X	X	X			
Coleta de Dados										X	X	X

Meses referente ao ano de 2022

ETAPA/PERÍODO	Mês 01	Mês 02	Mês 03	Mês 04	Mês 05	Mês 06	Mês 07	Mês 08	Mês 09	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Coleta de Dados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Meses referente ao ano de 2023

ETAPA/PERÍODO	Mês 01	Mês 02	Mês 03	Mês 04	Mês 05	Mês 06	Mês 07	Mês 08	Mês 09	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Coleta de Dados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Meses referente ao ano de 2024

ETAPA/PERÍODO	Mês 01	Mês 02	Mês 03	Mês 04	Mês 05	Mês 06	Mês 07	Mês 08	Mês 09	Mês 10	Mês 11	Mês 12
Análise dos resultados	X	X	X									
Redação dos artigos				X	X	X	X					
Submissão dos artigos para publicação								X	X	X	X	X

7. ORÇAMENTO

Item	Valor (R\$)
E.Z.N.A. Stool DNA Kit, 50 preps, Omega RT	R\$ 1732,00
E.Z.N.A. Stool DNA Kit, 200 preps, Omega RT	R\$ 5984,00
Primers 16S Illumina	R\$ 143,00
Platinum Taq DNA Polymerase Brasil 5U/UL, Invitrogen	R\$ 350,00
dNTP set, 100 mM 4x250 µl - Invitrogen	R\$ 1444,00
Marcador peso molecular Ladder 100pb - Invitrogen	R\$ 392,00
Ultrapure Agarose - 100G - Invitrogen	R\$ 975,00
QUBIT ASSAY TUBES, 500 TUBES - INVITROGEN	R\$ 448,00
QUBIT DSDNA HS ASSAY KIT, 100 ASSAYS - Invitrogen	R\$ 495,00
Etanol Absoluto 500 mL Sigma	R\$ 230,00
Agencourt AMPURE XP 5mL - Part. A63880 – BECKMAN COULTER	R\$ 1515,00
MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles)	R\$11481,00
PhiX Control v3	R\$ 1052,00
Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indexes, 384 samples)	R\$ 9149,00
Ponteiras 10 ul	R\$ 91,50
Ponteiras 200 ul	R\$ 59,00
Ponteiras 1000 ul	R\$ 108,20
Ponteiras 10 ul com barreira	R\$ 172,75

Ponteiras 200 ul com barreira	R\$ 308,50
Microtubos 0,2 mL	R\$ 271,40
Microtubos 1,5 mL	R\$ 90,65
Placa 96 poços (volume 200 ul)	R\$ 532,00
EPI- máscaras (caixa com 100 unidades)	R\$ 30,00
EPI – luvas cirúrgicas descartáveis (caixa com 100 unidades)	R\$ 100,00
EPI- gorro (caixa com 100 unidades)	R\$ 30,00
EPI- óculos de proteção	R\$ 25,00
Gaze (500gr)	R\$ 30,00
Jogo clínico odontológico - material autoclavável (30 unidades)	R\$ 450,00
Sonda Periodontal – material autoclavável (30 unidades)	R\$ 450,00
Frascos para coleta de material biológico (200 unidades)	R\$ 200,00
Soro fisiológico 0,9% frasco com 10 ml (300 Unidades)	R\$ 300,00
Valor total	R\$ 38639,00

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. D'Amico G, Morabito A, D'Amico M, Pasta L, Malizia G, Rebora P, et al. Clinical states of cirrhosis and competing risks. *Journal of hepatology*. 2018;68(3):563-76.
2. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology*. 2006;44(1):217-31.
3. Angeli P, Bernardi M, Villanueva C, Francoz C, Mookerjee RP, Trebicka J, et al. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2018.
4. Nagula S, Jain D, Groszmann RJ, Garcia-Tsao G. Histological-hemodynamic correlation in cirrhosis—a histological classification of the severity of cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2006;44(1):111-7.
5. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1246-56.
6. Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, Chawla YK, Fan ST, Garg H, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). *Hepatology international*. 2009;3(1):269.
7. Sarin SK, Kedarisetty CK, Abbas Z, Amarapurkar D, Bihari C, Chan AC, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2014. *Hepatology international*. 2014;8(4):453-71.
8. Sarin SK, Choudhury A, Sharma MK, Maiwall R, Al Mahtab M, Rahman S, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): an update. *Hepatology international*. 2019;13(4):353-90.
9. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1426-37.
10. Bajaj JS, O'Leary JG, Reddy KR, Wong F, Biggins SW, Patton H, et al. Survival in infection-related acute-on-chronic liver failure is defined by extrahepatic organ failures. *Hepatology*. 2014;60(1):250-6.
11. O'Leary JG, Reddy KR, Garcia-Tsao G, Biggins SW, Wong F, Fallon MB, et al. NACSELD acute-on-chronic liver failure (NACSELD-ACLF) score predicts 30-day survival in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2018;67(6):2367-74.
12. Leão GS, Lunardi FL, Picon RV, Tovo CV, de Mattos AA, de Mattos ÂZ. Acute-on-chronic liver failure: A comparison of three different diagnostic criteria. *Annals of hepatology*. 2019;18(2):373-8.
13. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology*. 1988;8(5):1151-7.
14. Wiese S, Hove JD, Bendtsen F, Møller S. Cirrhotic cardiomyopathy: pathogenesis and clinical relevance. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014;11(3):177.
15. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*. 2006;43(S1):S121-S31.

16. Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, et al. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*. 2016;64(4):1249-64.
17. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: from peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *Journal of hepatology*. 2015;63(5):1272-84.
18. Bajaj JS. The role of microbiota in hepatic encephalopathy. *Gut Microbes*. 2014;5(3):397-403.
19. Acharya C, Bajaj JS. Altered microbiome in patients with cirrhosis and complications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(2):307-21.
20. Bajaj JS, Vargas HE, Reddy KR, Lai JC, O'leary JG, Tandon P, et al. Association between intestinal microbiota collected at hospital admission and outcomes of patients with cirrhosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(4):756-65.
21. Chen Y, Guo J, Qian G, Fang D, Shi D, Guo L, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(9):1429-37.
22. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18:2-4.
23. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:185.
24. Tandon P, Garcia-Tsao G, editors. *Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis* 2008: © Thieme Medical Publishers.
25. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of hepatology*. 2014;60(5):940-7.
26. Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, Heuman DM, Daita K, White MB, et al. Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2015;62(4):1260-71.
27. Bajaj JS, Torre A, Rojas ML, Fagan A, Nandez IE, Gavis EA, et al. Cognition and hospitalizations are linked with salivary and faecal microbiota in cirrhosis cohorts from the USA and Mexico. *Liver International*. 2020.
28. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(3):172-83.
29. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral diseases*. 2012;18(2):109-20.
30. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014;513(7516):59.
31. Moon J-H, Lee J-H. Probing the diversity of healthy oral microbiome with bioinformatics approaches. *BMB reports*. 2016;49(12):662.
32. Tam J, Hoffmann T, Fischer S, Bornstein S, Gräßler J, Noack B. Obesity alters composition and diversity of the oral microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus independently of glycemic control. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204724.
33. Kageyama S, Takeshita T, Takeuchi K, Asakawa M, Matsumi R, Furuta M, et al. Characteristics of the salivary microbiota in patients with various digestive tract cancers. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1780.

34. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature medicine*. 2015;21(8):895-905.
35. Leira Y, Seoane J, Blanco M, Rodriguez-Yanez M, Takkouche B, Blanco J, et al. Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(1):43-53.
36. Bajaj JS, Matin P, White MB, Fagan A, Deeb JG, Acharya C, et al. Periodontal therapy favorably modulates the oral-gut-hepatic axis in cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;315(5):G824-G37.
37. Cotti E, Mercuro G. Apical periodontitis and cardiovascular diseases: previous findings and ongoing research. *Int Endod J*. 2015;48(10):926-32.
38. Segura-Egea JJ, Martin-Gonzalez J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015;48(10):933-51.
39. Leao TS, Tomasi G, Ibrahim MS, Conzatti L, Marrone LP, Reynolds MA, et al. Tooth loss is associated with atherosclerosis and a poorer functional outcome among stroke patients. *Clinical Oral Investigations*. 2020:1-8.
40. Cheng F, Zhang M, Wang Q, Xu H, Dong X, Gao Z, et al. Tooth loss and risk of cardiovascular disease and stroke: A dose-response meta analysis of prospective cohort studies. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194563.
41. Patel VC, Shawcross DL. Salivary microbiota-immune profiling in cirrhosis: Could this be the noninvasive strategy that will revolutionize prognostication in hepatology? *Hepatology*. 2015;62(4):1001-3.
42. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS pathog*. 2010;6(1):e1000713.
43. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*. 2013;41(1):e1-e.
44. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010;7(5):335-6.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: HEPATOLOGIA

DANIELA LUÍSA BORBA E ELISA CAROLINA LANGE

DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO
METABÓLICA (DHGAM) EM ADULTOS: RELAÇÕES ENTRE COGNIÇÃO,
COMPORTAMENTO ALIMENTAR, GRAU DE PROCESSAMENTO DOS
ALIMENTOS E QUALIDADE DE VIDA

Porto Alegre

2021

RESUMO

Introdução: A Doença Hepática Gordurosa Associada ao Metabolismo (DHGAM) é um conjunto de disfunções hepáticas, frequentemente começando como esteatose simples e potencialmente progredindo para Esteato-Hepatite Não Alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A DHGAM é classificada como doença crônica não transmissível (DCNT), sendo de etiologia multifatorial, incluindo fatores genéticos, endócrinos, ambientais, sociais, psicológicos e psiquiátricos. Em função da crescente prevalência, a DHGAM está tornando-se um grande problema de saúde pública, em paralelo com um aumento mundial da taxa de incidência de diabetes, obesidade e síndrome metabólica. Alguns estudos mais recentes apontam uma correlação positiva entre alto consumo de colesterol, ácidos graxos saturados e carboidratos com o aumento do risco de DHGAM. Os padrões alimentares ocidentais, devido ao alto teor de frutose e gorduras saturadas, podem ter efeitos adversos na homeostase dos lipídios e da glicose e aumentar o risco de DHGAM. Por ser doença de cunho cognitivo-comportamental, o tratamento deve envolver, fundamentalmente, mudanças no estilo de vida, dando ênfase à alimentação adequada e à prática regular de exercícios físicos. No entanto, fatores emocionais envolvidos na capacidade de iniciar e de manter essas mudanças têm sido investigados. Vários estudos têm apontado uma correlação entre DHGAM e depressão e ansiedade, com associações comprovadas entre os sintomas da doença hepática e os sintomas de desequilíbrio de humor. A presente proposta apresenta relevância científica frente ao impacto da Terapia Nutricional na prevenção e manutenção da doença frente a qualidade de vida da população acometida, além de reduzir gastos públicos no tratamento clínico e cirúrgico empregados. **Objetivo:** investigar as possíveis correlações do comportamento e consumo alimentar, conforme o grau de processamento dos alimentos, com saúde mental, em indivíduos adultos com DHGAM e o impacto da doença na qualidade de vida e no sono, bem como a classificação do desfecho cognitivo. **Metodologia:** estudo prospectivo transversal, de caráter exploratório, que será realizado em centros de saúde da região metropolitana de Porto Alegre em pacientes adultos com diagnóstico de Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) que são atendidos e fazem acompanhamento com frequência, no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL) e no Ambulatório de Gastroenterologia – Nutrição e Hepatologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), no período de 2022. Serão coletados dados

demográficos, assim como os referentes à composição corporal, parâmetros antropométricos, biópsia hepática e exames laboratoriais e bioquímicos. Para avaliação do consumo e comportamento alimentar, qualidade de vida, saúde mental, desfecho cognitivo e qualidade do sono, serão aplicadas as seguintes ferramentas: Questionário de avaliação do consumo e Frequência Alimentar (QFA); Questionário de Comportamento Alimentar de Três Fatores (*The three factor eating questionnaire (TFEQ-R21)*); Questionário de avaliação de Qualidade de Vida Global e percepção do estado de saúde (*World Health Organizational Quality of Life (WHOQOL-bref)*). Na mesma ocasião também serão aplicados: Questionário de avaliação da Saúde Mental - *Self-Reporting Questionnaire 20 (SRQ 20)*; *Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI)*; *Montreal Cognitive Assessment (MoCA)*. Para a análise de dados a associação será feita a partir dos dados tabulados em excel 2013. A descrição geral dos dados obtidos neste estudo será apresentada por meio de frequências simples e relativas. Serão considerados valores significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Todos os dados serão analisados pelo programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22.0*.

Palavras-chave: fígado gorduroso; síndrome metabólica; saúde mental; perfil de impacto da doença.

1. IDENTIFICAÇÃO

Abaixo as devidas identificações do projeto.

1.1 Instituições onde será realizado o projeto

O projeto será realizado nos endereços abaixo:

Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Endereço: Rua Prof. Anne Dias nº 135 – Independência – Porto Alegre, RS

CEP 90035-077

Fone: (51) 3214-8688

COMPUCRS - Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica

Endereço: Av. Ipiranga, 6690 - 801 - Jardim Botânico, Porto Alegre - RS,

CEP 91530-001

Fone: (51) 3320-5002

1.2 Título do projeto

O título do projeto é: Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) em adultos: Relações entre cognição, comportamento alimentar, grau de processamento dos alimentos e qualidade de vida.

1.3 Pesquisador responsável pelo projeto e demais pesquisadores

Os pesquisadores envolvidos no trabalho são:

a) Cláudio Augusto Marroni: graduação em Medicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1966), mestrado em Farmacologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (1996) e doutorado em Medicina (Gastroenterologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2001). Atualmente é professor associado da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre;

- b) Randhall Bruce Kreismann Carteri: graduação em Educação Física (2010), graduação em Nutrição (2018), mestrado em Ciências do movimento Humano (2013), doutorado em bioquímica (2019);
- c) Daniela Luísa Borba: graduação em Nutrição pela Instituto Metodista de Porto Alegre (2019). Atualmente é mestranda em Hepatologia na Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre;
- d) Elisa Carolina Lange: graduação em Nutrição pela Instituto Metodista de Porto Alegre (2020). Atualmente é mestranda em Hepatologia na Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre.

1.4 Local de pesquisa

O projeto será realizado no Ambulatório de Gastroenterologia – Nutrição e Hepatologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, situado na Rua Prof. Anne Dias nº 135 – Independência - Porto Alegre – RS. CEP 90035-077 Fone 51 3214-8688, e no COMPUCRS - Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica, situado na Avenida Ipiranga, 6690 - 801 - Jardim Botânico, Porto Alegre - RS, CEP 91530-001, Fone: (51) 3320-5002.

2 INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) é uma patologia caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos (TG) nas células hepáticas, quando esse não é causado por consumo de álcool, infecção por hepatite C, doença hepática hereditária ou doença hepática de origem medicamentosa.

Por estar associada à resistência insulínica e outras alterações metabólicas, a Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) pode ser definida, portanto, como uma manifestação hepática da síndrome metabólica. Tal definição desencadeou uma recente discussão acerca da nova nomenclatura da doença, modificando-a de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) para Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) (ESLAM *et al.*, 2020; KUCHAY; MISRA, 2020).

A DHGAM é caracterizada pelo acúmulo de gordura nas células do fígado, os hepatócitos, excedendo 5% do seu peso (CHAVES *et al.*, 2012). É uma doença, muitas vezes silenciosa, ausente de sinais e sintomas, decorrente de fatores primários, secundários ou possivelmente por doenças associadas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA – SBH, 2019). Embora a DHGAM esteja fortemente correlacionada com a presença de obesidade e síndrome metabólica, a doença é considerada fator independente de risco cardiovascular. Idade avançada, obesidade central, diabetes, síndrome metabólica e hipertensão arterial são os fatores de risco de maior impacto para desenvolvimento da doença (ZADEH *et al.*, 2020). Outros fatores de risco associados são fatores genéticos e epigenéticos e alterações na microbiota intestinal (AKHLAGHI; GHASEMI-NASAB; RIASATIAN, 2020; KUCHAY; MISRA, 2020; PLAUTH *et al.*, 2019).

2.1 Prevalência da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM)

Dados epidemiológicos apontam que a DHGAM afeta cerca de 25% da população mundial, sendo mais prevalente nos países ocidentais; no entanto, um crescimento significativo tem sido observado na prevalência entre os países de outras partes do mundo, como no continente asiático (BALAKRISHNAN *et al.*, 2020; DAI *et al.*, 2017). No Brasil, mais especificamente, a prevalência é de 18 a 25% dos habitantes. E 31% na América do Sul. Mas o percentual aumenta em 43,2% em pacientes com síndrome metabólica e 57% a 74% em indivíduos com IMC acima de 30. (BERARDO *et al.*, 2020; YOUNOSSI *et al.*, 2017; FOUAD *et al.*, 2020; CRISPIM, 2016).

A obesidade, principalmente quando acompanhada de gordura visceral, é considerada o principal fator de risco na etiologia da DHGAM, a qual, se não controlada, pode evoluir para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), cirrose podendo progredir para carcinoma hepatocelular. No entanto, a presença de DHGAM também tem sido observada em indivíduos não-obesos, sendo nesses os desfechos mais graves e de mais rápido desenvolvimento. A revisão sistemática desenvolvida por Dai e colaboradores (2017), aponta que 40,8% dos acometidos por DHGNA são não-obesos, mostrando a importância de não se utilizar o índice de massa corporal (IMC) como parâmetro isolado para diagnóstico de DHGAM (AKHLAGHI; GHASEMI-NASAB; RIASATIAN, 2020; DAI *et al.*, 2017, KUCHAY; MISRA, 2020).

2.2 Diagnóstico da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM)

O diagnóstico de DHGAM pode ser feito baseando-se em métodos não-invasivos, como exames de imagem por tomografia, cálculos baseados em circunferência de cintura (CC), IMC e níveis séricos de gama-glutamil transpeptidase (GGT) e níveis elevados de triglicerídeos (TOVO *et al.*, 2017). Boemeke e colaboradores (2019) encontraram em seu estudo uma correlação entre circunferência do pescoço (CP) e alterações metabólicas ligadas ao desenvolvimento de DHGAM. Outro parâmetro sugerido por Marroni e colaboradores (2016) e por Teixeira e colaboradores (2020) é o ângulo de fase (AF), obtido através do aparelho de bioimpedância elétrica (BIA), o qual avalia a integridade, funcionalidade e permeabilidade da membrana celular, sendo um importante marcador prognóstico. Enquanto os demais parâmetros de composição corporal determinados pela BIA, como massa livre de gordura, gordura corporal e volume de água corporal podem sofrer interferência pela presença de distorções corporais próprias da DHGNA, o AF permanece inalterado.

2.3 Biomarcadores da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM)

Para o diagnóstico completo de DHGAM, parte-se da detecção de esteatose hepática em pacientes adultos, seja por exames de imagem, biomarcadores ou por exame de histologia hepática. Para pacientes com sobrepeso ou obesidade, ou diabetes mellitus tipo 2, o diagnóstico de DHGAM é independente de outros fatores clínicos. Já em pacientes com peso normal ou baixo peso, devem estar associados dois ou mais dos seguintes critérios: circunferência abdominal maior ou igual a 102cm em homens e 88cm em mulheres, para indivíduos caucasianos, ou maior ou igual a 90cm em homens e 80cm em mulheres, para indivíduos asiáticos; pressão arterial maior ou igual a 130/85mmHg ou em uso de anti-hipertensivo; triglicerídeos plasmáticos maior ou igual a 150mg/dL ou tratamento com medicamento específico; colesterol HDL menor que 40mg/dL para homens e menor que 50mg/dL para mulheres ou esteja em uso de medicação própria;

pré-diabetes ou glicemia de 2 horas pós-dextrosol entre 140 e 199mg/dL; HOMA score maior ou igual a 2,5; PCR ultrasensível maior que 2mg/L (ESLAM *et al.*, 2020).

Esteatose, esteato-hepatite, cirrose e CHC são os espectros que compõem a doença e sua progressão. O tratamento é diferenciado em cada estágio e está relacionado à mudança de estilo de vida, baseada na regra de ouro do Guia Alimentar para População Brasileira, de 2014, que preconiza o consumo de alimentos *in natura* ou minimamente processados ao invés de alimentos ultraprocessados, seguindo um padrão alimentar com características da dieta mediterrânea (BRASIL, 2014; PLAUTH *et al.*, 2019). Modificação do estilo de vida, envolvendo atividade física, perda de peso, e melhorias na qualidade da alimentação, leva em consideração não somente um balanço energético negativo, como também a composição corporal quanto à distribuição de massa gorda e massa muscular esquelética. Há uma correlação direta entre a quantidade de peso perdido e a melhora significativa da função hepática, sendo que uma perda de 7 a 10% está associada à regressão do quadro de esteatose e melhora dos parâmetros bioquímicos hepáticos e perdas superiores a 10% tem efeitos positivos inclusive sobre a fibrose hepática (MOOSAVIAN; ARAB; PAKNAHAD, 2020; KOUTOUKIDIS *et al.*, 2021, BISCHOFF *et al.*, 2020).

A DHGAM é classificada como doença crônica não transmissível (DCNT), sendo de etiologia multifatorial, incluindo fatores genéticos, endócrinos, ambientais, sociais, psicológicos e psiquiátricos. Entre estes fatores está a alimentação (BIAGIO; MOREIRA; AMARAL, 2020; BRASIL, 2018; PLAUTH *et al.*, 2019). É possível observar que o aumento no número de casos da população acometida por essa doença tem sido associado ao crescimento da venda e do consumo de alimentos ultraprocessados. Em decorrência desse aumento, pesquisas têm evidenciado o impacto negativo na saúde das populações nos últimos anos (BORTOLINI *et al.*, 2019). No Brasil, diversos estudos demonstram que o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados corresponde a um percentual significativo do total calórico diário, estando associado ao sobrepeso e obesidade (BORTOLINI *et al.*, 2019). Está bem estabelecido que o padrão e a qualidade alimentar implicam na qualidade de vida dos indivíduos, impactando tanto na condição física quanto mental do indivíduo (MANNUCCI *et al.*, 2010).

Alguns estudos mais recentes apontam uma correlação positiva entre alto consumo de colesterol, ácidos graxos saturados e carboidratos com o aumento do risco de DHGAM. Enquanto alimentos com alto teor de fibras e antioxidantes podem levar à redução do estresse oxidativo e da resistência à insulina – e, consequentemente, à redução

do risco de desenvolvimento de DHGNA – os padrões alimentares ocidentais, devido ao alto teor de frutose e gorduras saturadas, podem ter efeitos adversos na homeostase dos lipídios e da glicose e aumentar o risco de DHGNA (ZADEH *et al.*, 2020).

Poucos estudos abordam a prevalência de padrões de comportamentos alimentares e de graus de processamento dos alimentos da dieta em pacientes adultos com DHGAM e como estes padrões se relacionam com a cognição, a adesão a dieta e ao tratamento. Analisar e avaliar os padrões de consumo e comportamentos alimentares se faz necessário para condução de um manejo nutricional efetivo de pacientes adultos com DHGAM, visto que, até o momento, a mudança de hábitos de vida, incluindo-se aqui a alimentação saudável, é uma das principais formas de evitar uma hepatopatia crônica, como cirrose e/ou carcinoma hepatocelular, e por fim, o transplante de fígado (BIAGIO; MOREIRA; AMARAL, 2020; PLAUTH *et al.*, 2019; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA – ABESO, 2016).

2.4 Saúde mental

DHGAM é uma doença de cunho cognitivo-comportamental, de modo que o tratamento deva envolver, fundamentalmente, mudanças no estilo de vida, dando ênfase à alimentação adequada e à prática regular de exercícios físicos. No entanto, fatores emocionais envolvidos na capacidade de iniciar e de manter essas mudanças têm sido investigados. Vários estudos têm apontado uma correlação entre DHGAM e depressão e ansiedade, com associações comprovadas entre os sintomas da doença hepática e os sintomas de desequilíbrio de humor, porém ainda não está clara a ordem do surgimento dos sintomas. Parece haver, inclusive, uma associação entre o grau de balonização dos hepatócitos e a gravidade dos sintomas depressivos, e estudos sugerem que os fatores emocionais influenciam na progressão da doença hepática (MACAVEI; BABAN; DUMITRASCU, 2016).

Alguns estudos têm demonstrado que, além de desequilíbrios de humor, outras disfunções do sistema nervoso central (SNC), como comprometimento de memória, da função visuoespacial, do funcionamento social e executivo, déficit de atenção, aumento do risco de desenvolver doença de Alzheimer e demência, são significativamente mais presentes na população com excesso de peso ou obesidade com diagnóstico de DHGAM em relação à população em geral (MACAVEI; BABAN; DUMITRASCU, 2016; COLOGNESI; GABBIA; DE MARTIN, 2020). Filipović e colaboradores (2018),

avaliaram a função cognitiva de pacientes com DHGAM utilizando a ferramenta *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA), e os resultados demonstraram que estes pacientes têm cerca de 4 vezes maior risco de ter um comprometimento cognitivo do que a população em geral. Segundo MARCHESINI e colaboradores, 2005, é fundamental que a terapia cognitivo-comportamental necessária para a mudança de estilo de vida do paciente com DHGAM tenha um programa bem definido e uma equipe bem treinada e composta por médicos, nutricionistas, psicólogos, enfermeiros e especialistas em atividades físicas para acompanhar os pacientes de modo individual ou em grupo em diversas sessões ao longo de vários meses.

2.5 Justificativa

Dados epidemiológicos que englobam a incidência e prevalência da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) na população mundial sugerem uma ampla investigação sobre a existência da relação do consumo de alimentos conforme o grau de processamento e a caracterização do comportamento alimentar. A presente proposta apresenta relevância científica frente ao impacto da Terapia Nutricional na prevenção e manutenção da doença frente a qualidade de vida da população acometida, além de reduzir gastos públicos no tratamento clínico e cirúrgico empregados.

3 HIPÓTESES

As hipóteses levantadas são:

Hipóteses nula (H0)

- O desenvolvimento e o estadiamento da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) está relacionado ao consumo alimentar de acordo com o grau de processamento dos alimentos, ao comportamento alimentar, afetando a qualidade de vida e do sono, causando maior sofrimento mental em adultos.

Hipóteses alternativas (Ha)

- O desenvolvimento e o estadiamento da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) não tem relação com o consumo alimentar de acordo com o grau de processamento dos alimentos, o comportamento alimentar, não afetando a qualidade de vida, do sono e do sofrimento mental em adultos.

4 OBJETIVOS

Os objetivos do projeto se dividem em primário e secundários.

4.1 Objetivo primário

O objetivo primário deste projeto é correlacionar o comportamento e consumo alimentar, conforme o grau de processamento dos alimentos e o impacto na qualidade de vida, na saúde mental, no sono e desfecho cognitivo em adultos com DHGAM.

4.2 Objetivos secundários

São objetivos secundários:

- Verificar a presença e estadiamento da DHGAM/ EHNA na população estudada;
- Descrever o estado nutricional da população estudada;
- Caracterizar o consumo alimentar conforme o grau de processamento dos alimentos, através do Questionário de Frequência Alimentar (QFA);
- Avaliar os tipos de comportamentos alimentares através do Questionário Alimentar de Três Fatores (*The Three Factor Eating Questionnaire-R21 - TFEQ-R21*);
- Analisar a qualidade de vida da população estudada através do instrumento abreviado de avaliação da Qualidade de Vida (*World Health Organization Quality of Life Assessment - WHOQOL- bref*);
- Avaliar a saúde mental da população estudada através do Questionário de Auto-Relato (*Self-Reporting Questionnaire 20 - SRQ 20*);
- Classificar o desfecho cognitivo na população estudada através do uso da ferramenta de Avaliação Cognitiva de Montreal (*Montreal Cognitive Assessment - MoCA*);
- Avaliar a qualidade do sono através da ferramenta autoaplicável Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (*Pittsburgh Sleep Quality Index - PSQI*).

5 METODOLOGIA

Este projeto é um estudo prospectivo transversal, de caráter exploratório, que será realizado em centros de saúde da região metropolitana de Porto Alegre em pacientes adultos com diagnóstico de Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) que são atendidos e fazem acompanhamento com frequência, no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL) e no Ambulatório de Gastroenterologia – Nutrição e Hepatologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), no período de 2022.

O cálculo amostral será não probabilístico e por conveniência. Anualmente é estimado o atendimento de 240 pacientes no COM (PUCRS) e 150 no Ambulatório de Gastroenterologia – Nutrição e Hepatologia (ISCOMPA), totalizando 390 pacientes. Em caso de aceite de 50% dos pacientes, espera-se por um N de 195 indivíduos.

Os pacientes que são atendidos e fazem acompanhamento já possuem os seguintes dados coletados pelos ambulatórios, laboratórios e equipe profissional de ambas as instituições:

Dados demográficos: idade, sexo, raça, filiação, nível educacional, estado civil, emprego e renda;

Composição Corporal: avaliação da composição corporal através de bioimpedância elétrica (BIA). São aferidos peso (Kg); Massa muscular esquelética (MME); Massa de gordura (MG); Massa livre de gordura (MLG); Água corporal total (ACT); Percentual de gordura corporal (PGC); Taxa metabólica basal (TBM); Ângulo de fase (AF); Área de gordura visceral.

Parâmetros antropométricos: circunferência de cintura (CC), circunferência de quadril (CQ), circunferência de pescoço (CP), circunferência abdominal (CA), estatura e Índice de Massa Corporal (IMC). A partir desses dados serão feitas a relação cintura-estatura (RCE), a relação cintura-quadril (RCQ) e o índice de conicidade (IC). Força do aperto de mão dominante (FAM) e medida da espessura do músculo adutor do polegar (MAP)

Biópsia hepática: análise histológica hepática através de biópsia, com análise patológica e classificação de ausência ou presença de DHGAM e grau de estadiamento.

Exames laboratoriais e bioquímicos: hemograma, perfil lipídico e glicídico, transaminases, vitaminas e minerais, GGT, albumina, bilirrubina, lactato desidrogenase e tempo de protrombina, entre outros.

A realização da avaliação antropométrica, bioimpedância e dados pessoais são coletados pela equipe de profissionais de atendimento das instituições envolvidas, pois já é protocolo a obtenção destas informações para a realização do atendimento. Os exames laboratoriais são solicitados pelos médicos responsáveis pelos pacientes e disponibilizados na rede interna de assistência, com acesso através da intranet para os pesquisadores do estudo.

Este estudo está em conformidade com a Lei nº 13.709, de 14 de agosto de 2018 – Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD).

O estudo está dividido em quatro etapas:

Primeira etapa: os participantes realizarão a assinatura do TCLE e uma avaliação inicial, com agendamento para Visita 1 e Visita 2.

Segunda etapa: **Visita 1.** Os participantes realizarão o preenchimento dos seguintes instrumentos:

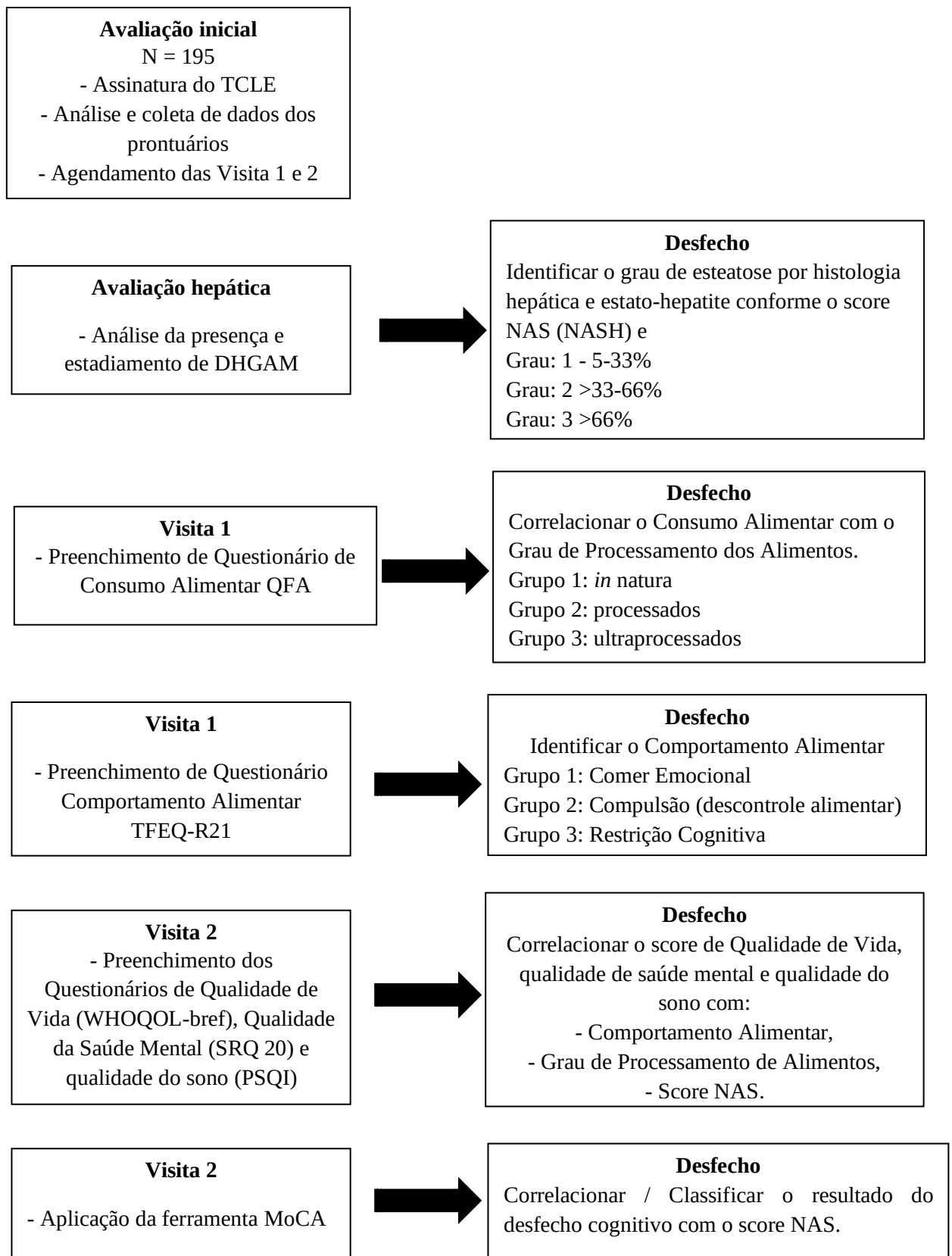
- Questionário de avaliação do consumo e Frequência Alimentar (QFA);
- Questionário de Comportamento Alimentar de Três Fatores (*The three factor eating questionnaire (TFEQ-R21)*).

Terceira etapa: **Visita 2.** Os participantes realizarão o preenchimento dos seguintes instrumentos:

- Questionário de avaliação de Qualidade de Vida Global e percepção do estado de saúde (*World Health Organizational Quality of Life (WHOQOL-bref)*).
- Questionário de avaliação da Saúde Mental - *Self-Reporting Questionnaire 20 (SRQ 20)*.
- Aplicação da ferramenta de avaliação da Qualidade do Sono - Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh (*Pittsburgh Sleep Quality Index - PSQI*).
- Aplicação da ferramenta de Avaliação Cognitiva de Montreal para rastreio de comprometimento cognitivo - *Montreal Cognitive Assessment (MoCA)*.

Quarta etapa: análise dos dados coletados e possíveis correlações.

Todos os procedimentos serão realizados de acordo com as exigências do Ministério da Saúde, com o uso de equipamentos de segurança individuais, máscaras e álcool gel 70% e todos demais cuidados sanitários, preservando a saúde dos pesquisadores e participantes. Um resumo das etapas e desfechos esperados está na figura 1.



a 1. Fluxograma da realização do estudo.

6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão e exclusão estão nos itens 6.1 e 6.2.

6.1 Critérios de inclusão

Pacientes adultos, maiores de 18 anos, até 75 anos, com diagnóstico de DHGAM que estiverem em acompanhamento no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) PUCRS/HSL ou no Ambulatório de Gastroenterologia – Nutrição e Hepatologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).

6.2 Critérios de exclusão

Pacientes que façam uso de medicamentos para auxiliar a perda de peso ou façam acompanhamento em outra instituição, concomitantemente. Pacientes que possuem patologias associadas ao metabolismo (tireoide/HIV/câncer). Pacientes que apresentem distúrbios neurológicos, psicológicos ou emocionais que impeçam o preenchimento dos instrumentos. Diabetes Mellitus não será um fator de exclusão devido a prevalência da doença na população com DHGAM;

7 RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos e benefícios estão nos próximos itens 7.1 e 7.2.

7.1. Riscos

Nesse estudo consideramos que os participantes poderão ter riscos moderados. Consideramos risco moderado riscos de origem psicológica, intelectual ou emocional, tais como: possibilidade de constrangimento, desconforto ou vergonha ao responder os questionários e realizar a avaliação antropométrica. Ainda, consideramos o cansaço ao responder às perguntas como um risco. Para diminuir tais riscos, os questionários serão aplicados por pessoas treinadas (pesquisadores principais) que primeiramente

apresentarão os benefícios da pesquisa e buscarão estabelecer uma relação de confiança com os participantes.

Os instrumentos de questionários não serão aplicados em sequência, sendo também, oferecidos intervalos entre os diferentes questionários nos dias de avaliações e ambiente confortável e apropriado.

7.2. Benefícios

Como benefício, os participantes do estudo receberão todos os resultados obtidos através dos questionários aplicados bem como a avaliação da composição corporal completa. Ainda, a pesquisa tem benefícios diretos, como avançar no conhecimento no que se refere ao desenvolvimento da DHGAM uma vez que a alimentação exerce papel fundamental na etiologia e no tratamento da doença, bem como o impacto na saúde e qualidade de vida dos indivíduos.

8 DETALHAMENTO METODOLÓGICO

A aplicação dos questionários e ferramentas de avaliação serão realizadas nos pacientes nos dias que eles comparecerem para atendimento nos ambulatórios (COMPUCRS e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre) nos quais já fazem acompanhamento, não necessitando auxílio financeiro para o descolamento.

8.1 Avaliação do consumo e frequência alimentar

Para a avaliação do consumo alimentar o Questionário de Frequência Alimentar (QFA) tem como objetivo mensurar a alimentação habitual dos últimos 12 meses, por dia, semana e mês, contabilizando a frequência e quantidade ingerida pelo indivíduo. É um instrumento considerado qualitativo, quantitativo ou semiquantitativo, composto por 115 questões. É possível avaliar o padrão de consumo, valor energético e de macronutrientes. Tempo estimado em 45 minutos de aplicação com a presença do pesquisador. (PEREIRA, R.A; SICHIERI, 2007)

8.2 Avaliação do grau de processamento dos alimentos

A classificação do grau de processamento dos alimentos consumidos pela população estudada seguirá a classificação proposta pelo Guia Alimentar para População Brasileira. Sendo o primeiro grupo classificado como alimentos *in natura* e minimamente processados (exemplo: frutas, verduras, carnes e ovos, raízes e tubérculos). O segundo grupo caracterizado por alimentos da culinária processada ou ingredientes da indústria alimentícia, que são substâncias extraídas de alimentos e utilizadas no preparo e cozimento de pratos compostos (exemplo: açúcar e gorduras). O terceiro grupo sendo considerado produtos alimentícios com a adição de sal, açúcar ou outra substância de uso culinário a alimentos *in natura* para torná-los duráveis e mais agradáveis ao paladar (exemplo: queijos, conservas ou enlatados, bacon, carne seca). O quarto grupo é formado por produtos alimentícios ultraprocessados, que são alimentos prontos para o consumo ou prontos para aquecer, cujo processamento visa a durabilidade, acessibilidade, conveniência e o apelo de ser um alimento pronto para consumo (exemplo: pães, biscoitos, embutidos, refrigerantes, balas, bombons entre outros). (BRASIL, 2014)

8.3 Avaliação do comportamento alimentar

Para avaliação do comportamento alimentar será utilizado o Questionário alimentar dos três fatores (*The three factor eating questionnaire TFEQ-R21*) que tem como objetivo avaliar o fenômeno da capacidade de **restringir** os alimentos, o poder da **desinibição** e o efeito das **emoções** e a sua relação com o comer. Possui escala auto-avaliativa em indivíduos com sobrepeso, obesidade e eutróficos. Composto por 21 questões. (NATACCI, L. C.; FERREIRA JÚNIOR, M., 2011)

Tempo estimado em 8 minutos.

Os três fatores:

- a) Restrição Cognitiva (RC): Tendência consciente de restringir a ingestão de alimentos;
- b) Alimentação Emocional (AE): Consumo excessivo de alimentos em resposta a emoções negativas;
- c) Descontrole Alimentar (DA): Perda do autocontrole e, conseqüente, consumo exagerado de alimentos.

8.4 Avaliação da qualidade de vida

Para avaliar a qualidade de vida dos participantes será utilizado o questionário de avaliação da qualidade de vida global e percepção do estado de saúde (*World Health Organizational Quality of Life WHOQOL-bref*) composto por 26 questões; sendo as perguntas 1 e 2 sobre a qualidade de vida geral mais 24 questões as quais compõem quatro domínios: físico, psicológico, ambiental e relações sociais. Tem caráter psicométrico e as respostas seguem uma escala de Likert (de 1 a 5). Resultado em percentual de 0 a 100, sendo, quanto maior a porcentagem, mais próximo de 100%, melhor é a Qualidade de Vida. (FLECK *et al.*, 2000) Tempo estimado em 13 minutos para a aplicação.

8.5 Avaliação da saúde mental

Para a avaliação da saúde mental dos participantes, será aplicada o Questionário de Avaliação da Saúde Mental - *Self-Reporting Questionnaire 20* (SRQ 20). Este é um teste que analisa o sofrimento mental e é composto por 20 questões a respeito de dores e problemas que possam ter afetado o participante nos 30 dias anteriores à data de aplicação, com resposta objetiva SIM/NÃO. Se o resultado for de 7 ou mais respostas iguais a sim, fica comprovado o sofrimento mental. (SANTOS *et al.*, 2010) Tempo estimado de 10 minutos.

8.6 Avaliação de desfechos cognitivos

Para a avaliação de desfechos cognitivos, será utilizada a ferramenta *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA). O teste MoCA tem como objetivo avaliar cognição global, dividindo-se em 8 oito domínios cognitivos e contemplando diversas tarefas em cada domínio: função executiva, avaliada pelas tarefas “*Trail Making Test B* (adaptado)”, “Fluência Verbal Fonêmica” e “Abstração Verbal”; capacidade visuo-espacial, através das tarefas “Desenho do Relógio” e “Cópia do Cubo”; memória, avaliada pela tarefa “Evocação Diferida de Palavras (5 minutos)”; atenção, concentração e memória de trabalho, avaliados através das tarefas “Memória de dígitos (sentido direto)”, “Memória de dígitos (sentido inverso)”, Tarefa de atenção Sustentada (detecção do alvo)”, “Subtração em série de 7”; linguagem, através das tarefas “Nomeação de 3 animais pouco

familiares”, “Repetição de 2 frases sintaticamente complexas”, “Fluência Verbal Fonêmica (supracitada)”]; orientação temporal e espacial.

A pontuação pode variar entre 0 e 30, de modo que o teste é capaz de fornecer uma estimativa quantitativa da capacidade cognitiva, e não apenas qualitativa (presença ou ausência de déficit cognitivo). (SARMENTO, A. L. R.; BERTOLUCCI, P. H. F.; WAJMAN, J. R., 2007). O tempo estimado é de 20 minutos.

8.7 Avaliação da qualidade do sono

Aplicação da ferramenta de avaliação da Qualidade do Sono - *Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh* (PSQI). O questionário é composto por 19 questões referentes a qualidade e distúrbios de sono no último mês, avaliando 7 componentes do sono: qualidade subjetiva, latência do sono, duração do sono, eficiência do sono, distúrbios do sono, uso de medicamentos e disfunção diária. Cada questão pode ser pontuada de 0 a 3, com um escore total de no máximo 21 pontos. As pontuações acima de 5 pontos indicam má qualidade do sono do indivíduo. (BERTOLAZI *et al.*, 2011) Tempo estimado de 10 minutos.

9 METODOLOGIA DE ANÁLISES DE DADOS

A descrição geral dos dados obtidos neste estudo será apresentada por meio de frequências simples e relativas, adotando-se para a análise a associação entre as variáveis selecionadas. **Para análise de dados categóricos será realizado o teste qui-quadrado e para as variáveis contínuas serão utilizadas correlações paramétricas e não-paramétricas, quando apropriadas.**

Serão avaliadas as distribuições de todas as variáveis para a verificação da normalidade, através do teste de *Shapiro-Wilk*, assumindo uma distribuição normal homogênea, os dados serão comparados em relação ao sexo com o teste *t de Student* para amostras independentes. Caso não haja uma distribuição normal os dados serão analisados através de testes não paramétricos.

As correlações serão avaliadas por teste de Spearman ou Pearson de acordo com a distribuição. Os grupos serão comparados de acordo com estadiamento da doença com ANOVA de Uma Via (ou Kruskal-Wallis quando apropriado) com post

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA – ABESO. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo: ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2016. *E-book*. Disponível em: <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2019/12/Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2020.
- BALAKRISHNAN, M. *et al.* Women have a lower risk of nonalcoholic fatty liver disease but a higher risk of progression vs men: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], 13 jul. 2020.
- BERARDO, C. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: current issues and future perspectives in preclinical and clinical research. **International Journal of Molecular Sciences**, [Suíça], v. 21, n. 24, p. 1-29, dez. 2020.
- BERTOLAZI, A.N. *et al.* Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. **Sleep Med.** Jan;12 (1):70-5. 2011.
- BIAGIO, L. D.; MOREIRA, P.; AMARAL, C. K. Comportamento alimentar em obesos e sua correlação com o tratamento nutricional. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 3, p. 171-178, jul./set. 2020.
- BISCHOFF, S. C. *et al.* ESPEN practical guideline: clinical nutrition in liver disease. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 3533-3562, out. 2020.
- BOEMEKE, L. *et al.* The correlation of neck circumference and insulin resistance in NAFLD patients. **Arquivos de Gastroenterologia**, [São Paulo], v. 56, n. 1, p. 1-6, jan./mar.. 2019.
- BORTOLINI, G. A. *et al.* Guias alimentares: estratégia para redução do consumo de alimentos ultraprocessados e prevenção da obesidade. **Revista Panamericana de Salud Publica**, [s. l.], v. 43, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- CHAVES, G. V. *et al.* Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de lesão/função hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 288-293, jun. 2012.
- COLOGNESI, M.; GABBIA, D.; DE MARTIN, S. Depression and cognitive impairment: extrahepatic manifestations of NAFLD and NASH. **Biomedicine**, [Suíça], v. 8, n. 7, p. 1-16, 2020.

CRISPIM, F. G. S.; ELIAS, M. C.; PARISE, E. R. Dietary intake of patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Comparison between the presence and absence of Nonalcoholic Steatosis and Metabolic Syndrome. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 495-505, jul./ago. 2016.

DAI, W. *et al.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **Medicine**, [s. l.], v. 96, n. 39, p. 1-8, set. 2017.

ESLAM, M. *et al.* A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 202-209, jul. 2020.

FILIPOVIĆ, B. *et al.* Cognitive changes and brain volume reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 2018, p. 1-6, fev. 2018.

FLECK, M. PA, *et al.* Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida “WHOQOL-bref”, **Rev Saúde Pública**, 34(2):178-83. 2000.

FOUAD, Y. *et al.* What's in a name? Renaming ‘NAFLD’ to ‘MAFLD’. **Liver International**, [s. l.], v. 40, n. 24, p. 1254-1261, abr. 2020.

KOUTOUKIDIS, D. A. *et al.* The effect of the magnitude of weight loss on non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **Metabolism**, [s. l.], v. 115, p. 154455, fev. 2021.

KUCHAY, M. S.; MISRA, A. From non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) to metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD): a journey over 40 years. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 695-696, jul./ago. 2020.

MACAVEI, B.; BABAN, A.; DUMITRASCU, D. L. Psychological factors associated with NAFLD/NASH: a systematic review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [Roma.], v. 20, n. 24, p. 5081-5097, dez. 2016.

MANNUCCI, E. *et al.* Clinical and psychological correlates of health-related quality of life in obese patients. **Health Qual Life Outcomes**, [s. l.], v. 23, ago. 2010.

MOOSAVIAN, S. P.; ARAB, A.; PAKNAHAD, Z. The effect of a Mediterranean diet on metabolic parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review of randomized controlled trials. **Clinical Nutrition ESPEN**, [s. l.], v. 35, p. 40-46, fev. 2020.

NATACCI, L. C.; FERREIRA JÚNIOR, M. The three factor eating questionnaire - R21: tradução para o português e aplicação em mulheres brasileiras. *Rev. Nutr.*, Campinas, 24(3):383-394, maio/jun., 2011

PLAUTH, M. *et al.* ESPEN guideline on clinical nutrition in liver disease. **Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 485-521, abr. 2019.

PEREIRA, R.A; SICHIERI, R. Métodos de Avaliação do Consumo de Alimentos. In: KAC, G., SICHIERI, R., GIGANTE, D.P. **Epidemiologia Nutricional**. Rio de Janeiro: Fiocruz/Atheneu, 2007, p.181

SANTOS, K. O. L. *et al.* Avaliação de um Instrumento de Mensuração de Morbidade Psíquica: Estudo de validação do Self-Reporting Questionnaire (SRQ-20), [s. l.], v. 34, n. 3, p.544-560, jul./set. 2010.

SARMENTO, A. L.R.; BERTOLUCCI, P. H. F.; WAJMAN, J.R. MoCA: versão experimental brasileira. São Paulo: UNIFESP; 2007.

SARMENTO, A. L.R.; Apresentação e aplicabilidade da versão brasileira da MoCA (Montreal Cognitive Assessment) para rastreio de Comprometimento Cognitivo Leve. [dissertação]. São Paulo. Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação; 2009

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA – SBH. **Revista Hepato Brasil**, São Paulo, ano 6, n. 4, 2019. Disponível em: <http://sbhepatologia.org.br/wp-content/uploads/2019/11/revista-hepato-Ano-6-n4-2019-internet.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2020.

TOVO, C. V. *et al.* Sarcopenia and non-alcoholic fatty liver disease: is there a relationship? A systematic review. **World Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 326-332, fev. 2017.

TEIXEIRA, J. *et al.* Phase angle and non-alcoholic fatty liver disease before and after bariatric surgery. **World Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1004-1019, nov. 2020.

YOUNOSSI, Z. *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 15, p. 1-10, set. 2017.

ZADEH, S. *et al.* Relationship between Dietary Patterns and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Gastroenterology and Gastrohepatology**, [s. l.], 2020.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Versão 1.2

Abaixo o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) utilizado.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto: Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) em adultos: Relações entre cognição, comportamento alimentar, grau de processamento dos alimentos e qualidade de vida.

Gostaríamos de convidar o(a) Senhor(a) a participar da pesquisa acima, cujo objetivo principal é avaliar como o seu consumo e comportamento alimentar podem influenciar no seu sono, na sua saúde mental, na sua qualidade de vida e na doença hepática gordurosa do seu fígado.

Você responderá seis diferentes questionários, para identificar as possíveis associações entre a sua Doença Hepática Gordurosa no fígado e a sua alimentação, sono, atividades diárias e saúde mental. Faremos perguntas simples, como: Quantas vezes você consome refrigerante ou frutas? Se você come mais ao estar ansioso? Como você avalia a sua saúde? Se você se cansa com facilidade? E será solicitado que você copie ou desenhe alguma figura, entre outras atividades. Todas elas fazem parte de escalas que são usadas mundialmente para avaliar comportamento, consumo alimentar, qualidade do sono e de vida.

Você também irá fazer uma avaliação física e de composição corporal. Essas avaliações serão realizadas em duas etapas que levarão aproximadamente uma hora e serão aplicadas no Ambulatório de Gastroenterologia - Nutrição e Hepatologia da Santa Casa e Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica da PUCRS, nos mesmos dias de suas consultas clínicas.

Ao realizar as etapas deste estudo, talvez você possa sentir cansaço, constrangimento ou desconforto ao responder os questionários e ao realizar a avaliação corporal. Então, você poderá fazer intervalos, poderá deixar de responder alguma pergunta, ou ainda, se retirar em uma das etapas, se necessário.

Como benefício, você receberá todos os resultados obtidos através dos questionários aplicados bem como a sua avaliação da composição corporal completa. Além disso, a sua participação vai auxiliar no desenvolvimento de novos conhecimentos, que poderão eventualmente beneficiar você e outras pessoas no futuro.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: O(a) Sr(a) será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. O(a) Sr(a) é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Sua participação no estudo é voluntária, de forma que, caso você decida não participar, isto não afetará no tratamento que você tem direito. Você não terá custo e não receberá nenhum valor pela sua participação. Este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento se você desistir de participar. Se isso acontecer, você não causará nenhum prejuízo em relação ao pesquisador ou à instituição. Sua identidade será tratada com respeito e os pesquisadores seguirão padrões profissionais de sigilo, assegurando e garantindo o sigilo e confidencialidade dos dados pessoais dos participantes de pesquisa, em conformidade com a Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD)

lei nº 13.709/2018. Seu nome, ou qualquer material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. O(a) Sr(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Uma via (se for impressa) OU cópia (se for digital) assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido ficará na posse do pesquisador e outra será fornecida ao(a) Sr(a). O estudo poderá ser interrompido mediante aprovação prévia do CEP quanto à interrupção ou quando for necessário, para **proteger** o participante da pesquisa.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Eu, _____,
RG _____ fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações para motivar minha decisão, se assim o desejar. As pesquisadoras Daniela Luísa Borba e Elisa Carolina Lange certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e que somente os pesquisadores terão acesso. Também sei que minha participação neste estudo é voluntária, não vou pagar nada e não receberei nenhum valor, e se houver desistência não incidirá em nenhum tipo de prejuízo financeiro ou no meu direito ao tratamento.

Em caso de dúvidas poderei contatar o pesquisador Professor Dr. Claudio Augusto Marroni pelo telefone (51) 99963.8306 ou as pesquisadoras auxiliares Daniela Luísa Borba (51) 99214.3400 e Elisa Carolina Lange (51) 99500.3929, ou ainda pelos comitês:

- Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), e-mail: cep@santacasa.tche fone: (51) 3214.8571, R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer, 6º andar - Centro, Porto Alegre, RS, CEP 90.020-090

- Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, e-mail: cep@pucrs.br, fone: (51) 3320.3500 Ramal: 3345, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 50 - Sala 703 Porto Alegre, RS, CEP 90.619-900

Assinei duas vias deste termo de consentimento livre e esclarecido, o qual também foi assinado pelo pesquisador que me fez o convite e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Uma via deste documento, devidamente assinada foi deixada comigo. Declaro que concordo em participar desse estudo.

Assinatura do participante da pesquisa: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Assinatura do pesquisador auxiliar: _____

Data: __/__/____

ANEXO B – TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL (TAI)

Abaixo o termo de autorização institucional, o TAI, escaneado e assinado pela UFCSPA e COM (HSL - PUCRS).

TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

Prezados (a) Senhor (a):

Solicitamos sua autorização para realização do projeto de pesquisa intitulado Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) em adultos: Relações entre cognição, comportamento alimentar, grau de processamento dos alimentos e qualidade de vida de autoria dos (as) acadêmicos (as) Daniela Luísa Borba e Elisa Carolina Lange e orientados (as) pelo Professor Dr. Claudio Augusto Marroni em sua Instituição.

Este projeto tem como objetivo avaliar/correlacionar o comportamento e consumo alimentar, conforme o grau de processamento dos alimentos e o impacto que estes exercem na qualidade de vida, na saúde mental, no sono e no desfecho cognitivo em adultos com DHGAM.

Serão avaliados pacientes adultos, acima de 18 anos, de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Hepatologia e Nutrição da Santa Casa (ISCOMPA) e Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica (COM PUCRS) em Porto Alegre, portadores da Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica.

O estudo será realizado em três etapas:

A primeira etapa consistirá em uma avaliação dos prontuários das Instituições, seleção e contato com os pacientes portadores de DHGAM para o agendamento das entrevistas.

Na segunda etapa, primeira visita, será aplicado um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e Comportamento alimentar (TFEQ-R21) que avaliará o padrão do consumo e comportamento alimentar.

Na terceira etapa, segunda visita, serão aplicados os Questionário de avaliação da Qualidade de Vida da OMS (WHOQOL-bref) nos pacientes do COM PUCRS e o Questionário de Avaliação da Qualidade da Saúde Mental SRQ 20 e a utilização da ferramenta autoaplicável para avaliar o índice de qualidade do Sono de Pittsburgh (PSQI) nos pacientes do Ambulatório de Gastroenterologia – Nutrição e Hepatologia da Santa Casa.

Ainda na terceira etapa todos os participantes do estudo realizarão o teste de Avaliação Cognitiva Montreal (*Montreal Cognitive Assessment* - MoCA) de triagem breve que avalia uma ampla gama de funções cognitivas.

Ao realizar as etapas que englobam este estudo, os participantes podem sentir cansaço, constrangimento, desconforto ou vergonha ao responder os questionários e ao realizar a avaliação antropométrica. Nestas situações, poderão realizar intervalos ou absterem-se de responder as perguntas. Poderão se retirar em uma das etapas se assim julgarem necessário.

Como benefício, os participantes do estudo receberão todos os resultados obtidos através dos questionários aplicados bem como a avaliação da composição corporal completa.

Qualquer informação adicional poderá ser obtida dos telefones (51) 3303-8804 – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre ou pelos telefones dos pesquisadores Daniela Borba (51) 99214.3400 e Elisa Carolina Lange (51) 99500.3929

A qualquer momento, o senhor (a) poderá solicitar esclarecimentos sobre o trabalho que está sendo realizado. Sem qualquer tipo de cobrança e poderá retirar sua autorização. Os pesquisadores estão aptos a esclarecer estes pontos e, em caso de necessidade, dar indicações para contornar qualquer mal-estar que possa surgir em decorrência da pesquisa ou não.

Os dados obtidos nesta pesquisa serão utilizados na publicação de artigos científicos, contudo, assumimos a total responsabilidade de não publicar qualquer dado que comprometa o sigilo da participação dos integrantes de sua instituição. Nomes, endereço e outras indicações pessoais não serão publicados em hipótese alguma e os bancos de dados gerados pela pesquisa só serão disponibilizados sem estes dados. A participação será voluntária, não fornecemos por ela qualquer tipo de pagamento por esta autorização bem como os participantes também não receberão qualquer tipo de pagamento.

Identificação *(em letra de forma e assinatura)* do Responsável Institucional *(carimbo, caso não há carimbo, deverá ter a identificação do local com CNPJ ou CPF do responsável)*

Professor Responsável

Data

Documento em duas vias; 1º via instituição, 2º via pesquisadores.

**ANEXO C – ANUÊNCIA UNIVERSIDADE FEDERAL CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE (UFSCPA)**

Projeto de Pesquisa

Doença Hepática Gordurosa Associada a Disfunção Metabólica (DHGAM) em adultos:
Relações entre cognição, comportamento alimentar, grau de processamento dos alimentos e
qualidade de vida.

Eu, _____, responsável pelo
setor/Instituição _____, tenho
ciência do protocolo/projeto de pesquisa acima citado, desenvolvido pelo Professor Doutor
Claudio Augusto Marroni, dos objetivos e metodologia a ser utilizada, concordando com a
realização da pesquisa neste local.

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo
setor/instituição

Carimbo

**ANEXO D – ANUÊNCIA CENTRO DA OBESIDADE E SÍNDROME
METABÓLICA (COM PUCRS)**

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitamos que (o) a pesquisador (a) **Dr. Claudio Augusto Marroni**, desenvolva seu projeto de pesquisa “Doença Hepática Gordurosa Associada à Disfunção Metabólica (DHGAM) em adultos: Relações entre cognição, comportamento alimentar, grau de processamento dos alimentos e qualidade de vida”, que está sob a coordenação/orientação do (a) Prof. (a) **Dr. Cláudio Corá Mottin**, cujo objetivo é correlacionar o comportamento e consumo alimentar, conforme o grau de processamento dos alimentos e o impacto na qualidade de vida, na saúde mental, no sono e desfecho cognitivo em adultos com DHGAM) no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica (COM PUCRS).

Esta autorização está condicionada ao cumprimento, pelo (a) pesquisador (a), dos requisitos das Resoluções do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, comprometendo-se em utilizar os dados pessoais dos participantes da pesquisa exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Ciente dos objetivos, métodos e técnicas que serão utilizados nessa pesquisa, concordo em fornecer os subsídios que estiverem ao meu alcance, e que sejam necessários para seu desenvolvimento, desde que seja assegurado o que segue:

- 1) O cumprimento das determinações éticas da Resolução CNS N° 466/2012;
- 2) A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa;
- 3) Que não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação nessa pesquisa;
- 4) No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Hospital São Lucas da PUCRS, em Porto Alegre, ____/____/____.

Dr. Saulo Gomes Bornhorst
Diretor Técnico – HSL PUCRS

Nome/assinatura/**carimbo** do responsável onde a pesquisa será realizada

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

s próximas perguntas se referem aos seus hábitos alimentares.							
01. Com que frequência o(a) Sr(a) costuma comer no refeitório/restaurante (universitário ou não) no horário de trabalho?							
Mais de 3x/dia	2 a 3x/dia	1x/dia	5 a 6x /semana	2 a 4x/semana	1x/semana	1 a 3x/mês	Nunca/quase nunca
02. Com que frequência o(a) Sr(a) costuma comer em restaurantes fora do horário de trabalho?							
Mais de 3x/dia	2 a 3x/dia	1x/dia	5 a 6x /semana	2 a 4x/semana	1x/semana	1 a 3x/mês	Nunca/quase nunca
03. Com que frequência o(a) Sr(a) costuma comer <i>fast food</i> (pizza, esfirra, quibe, coxinha, hamburger, acarajé)?							
Mais de 3x/dia	2 a 3x/dia	1x/dia	5 a 6x /semana	2 a 4x/semana	1x/semana	1 a 3x/mês	Nunca/quase nunca
04. No total, quantas refeições o(a) Sr(a) faz por dia, incluindo os lanches e excluindo cafezinho entre os intervalos?							
_ _ _ refeições							

05. Com que frequência o Sr(a) costuma comer VERDURAS e LEGUMES crus, cozidos ou refogados, sem incluir batatas, mandioca/alpim, inhame e cará?							
Mais de 3x/dia	2 a 3x/dia	1x/dia	5 a 6x /semana	2 a 4x/semana	1x/semana	1 a 3x/mês	Nunca/quase nunca
06. Com que frequência o(a) Sr(a) costuma comer FRUTAS, sem incluir sucos de frutas?							
Mais de 3x/dia	2 a 3x/dia	1x/dia	5 a 6x /semana	2 a 4x/semana	1x/semana	1 a 3x/mês	Nunca/quase nunca

07. O(a) Sr(a) usa adoçante artificial?	
☐ Não	
☐ Sim -----→	08. Qual o tipo?
	☐ Líquido (embalagem transparente)
	☐ Líquido (embalagem opaca)
	☐ Pó
	☐ Stévia
	☐ Forno e Fogão
09. Em sua casa que tipo de ÓLEO/GORDURA é usado no COZIMENTO/PREPARO de refeições? [Marque o óleo de uso mais freqüente].	
☐ óleo soja	
☐ óleo de milho/girassol/canola	
☐ azeite de oliva	
☐ óleo composto (azeite de oliva + óleo de soja)	
☐ azeite de dendê	
☐ margarina	
☐ manteiga	
☐ banha	

☐ não se usa óleo/gordura
☐ não sei
10. Que tipo de ÓLEO/AZEITE o(a) Sr(a) costuma usar em saladas? [Marque o óleo de uso mais frequente].
☐ óleo soja
☐ óleo de milho/girassol/canola
☐ azeite de oliva
☐ óleo composto (azeite de oliva + óleo de soja)
☐ não se usa óleo/azeite
☐ não sei
11. Quando o(a) Sr(a) come CARNE DE BOI/VACA, PORCO ou CARNEIRO, costuma tirar a gordura visível?
☐ nunca/raramente
☐ algumas vezes
☐ sempre
12. Quando o(a) Sr(a) come CARNE DE FRANGO ou OUTRO TIPO DE AVE, costuma tirar a pele?
☐ nunca/raramente

☐ algumas vezes	
☐ sempre	
13. NOS ÚLTIMOS SEIS MESES o(a) Sr(a) mudou seus hábitos alimentares ou está fazendo dieta por algum motivo? Se for o caso, escolha mais de uma resposta.	
☐ Não	
☐ Sim -----→	14. Qual foi o motivo?
	☐ para perda de peso
	☐ para redução de colesterol
	☐ para redução de sal
	☐ dieta vegetariana/redução de carnes
	☐ para ganho de peso
	☐ para diabetes
	☐ por outro motivo. 15. Especifique:

**ANEXO F – QUESTIONÁRIO PSICOMÉTRICO DE ALIMENTAÇÃO DE
TRÊS FATORES, NA VERSÃO TRADUZIDA PARA O PORTUGUÊS *THE
THREE FACTOR EATING QUESTIONNAIRE – R21 (TFEQ-21)***

Esta seção contém declarações e perguntas sobre hábitos alimentares e sensação de fome.

Leia cuidadosamente cada declaração e responda marcando a alternativa que melhor se aplica a você.

1. Eu deliberadamente consumo pequenas porções para controlar meu peso.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
2. Eu começo a comer quando me sinto ansioso.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
3. Às vezes, quando começo a comer, parece-me que não conseguirei parar.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
4. Quando me sinto triste, frequentemente como demais.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
5. Eu não como alguns alimentos porque eles me engordam.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
6. Estar com alguém que está comendo, me dá frequentemente vontade de comer também.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
7. Quando me sinto tenso ou estressado, frequentemente sinto que preciso comer.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes
 - ☐ Falso, na maioria das vezes
 - ☐ Totalmente falso
8. Frequentemente sinto tanta fome que meu estômago parece um poço sem fundo.
 - ☐ Totalmente verdade
 - ☐ Verdade, na maioria das vezes

- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

9. Eu sempre estou com tanta fome, que me é difícil parar de comer antes de terminar toda a comida que está no prato.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

10. Quando me sinto solitário (a), me consolo comendo.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

11. Eu conscientemente me controlo nas refeições para evitar ganhar peso.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

12. Quando sinto o cheiro de um bife grelhado ou de um pedaço suculento de carne, acho muito difícil evitar de comer, mesmo que eu tenha terminado de comer há muito pouco tempo.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

13. Estou sempre com fome o bastante para comer a qualquer hora.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

14. Se eu me sinto nervoso(a), tento me acalmar comendo.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

15. Quando vejo algo que me parece muito delicioso, eu frequentemente fico com tanta fome que tenho que comer imediatamente.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

16. Quando me sinto depressivo(a), eu quero comer.

- ☐ Totalmente verdade
- ☐ Verdade, na maioria das vezes
- ☐ Falso, na maioria das vezes
- ☐ Totalmente falso

17. O quanto frequentemente você evita “estocar” (ou se aprovisionar de) comidas tentadoras?

- ☐ Quase nunca
- ☐ Raramente
- ☐ Frequentemente
- ☐ Quase sempre

18. O quanto você estaria disposto(a) a fazer um esforço para comer menos do que deseja?

- ☐ Não estou disposto(a)
- ☐ Estou um pouco disposto(a)
- ☐ Estou relativamente bem disposto(a)
- ☐ Estou muito disposto(a)

19. Você comete excessos alimentares, mesmo quando não está com fome?

- ☐ Nunca
- ☐ Raramente
- ☐ Às vezes
- ☐ Pelo menos 1 vez por semana

20. Com qual frequência você fica com fome?

- ☐ Somente nos horários das refeições
- ☐ Às vezes entre as refeições
- ☐ Frequentemente entre as refeições
- ☐ Quase sempre

21. Em uma escala de 1 a 8, onde 1 significa nenhuma restrição alimentar, e 8 significa restrição total, qual número você daria para si mesmo?

1	2	3	4	5	6	7	8
Comer tudo o que quiser e sempre que quiser				Limitar constantemente a ingestão alimentar, nunca “cedendo”			

**ANEXO G – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA,
NA VERSÃO TRADUZIDA PARA O PORTUGUÊS *WORLD HEALTH
ORGANIZATION QUALITY OF LIFE (WHOQOL-BREF)***

ANÁLISE DO WHIOQOL-BREF

O módulo WHOQOL-BREF é constituído de 26 perguntas (sendo a pergunta numero 1 e 2 sobre a qualidade de vida geral), as respostas seguem uma escala de Likert (de 1 a 5, quanto maior a pontuação melhor a qualidade de vida). Fora essas duas questões (1 e 2), o instrumento tem 24 facetas as quais compõem 4 domínios que são: FÍSICO, PSICOLÓGICO, RELAÇÕES SOCIAIS e MEIO AMBIENTE.

É UM POUCO DIFERENTE DO WHOQOL-OLD. NESTE INSTRUMENTO TERÁ QUE APARECER O RESULTADO SOMENTE EM MÉDIA (1 A 5) POR DOMÍNIO E POR FACETA.

ATENÇÃO!!!

NESTE INSTRUMENTO É NECESSÁRIO TAMBÉM RECODIFICAR O VALOR DAS
QUESTÕES 3, 4, 26 (1=5) (2=4) (3=3) (4=2) (5=1)

AS PERGUNTAS 1 E 2 DEVERÃO APARECER DA SEGUINTE FORMA.

1 - PERCEPÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA (RESULTADO EM MÉDIA 1 A 5):

2 - SATISFAÇÃO COM A SAÚDE (RESULTADO EM MÉDIA 1 A 5)

CADA FACETA É SÓ SOMAR OS VALORES DA ENTREVISTA (DE 1 A 5) E DIVIDIR PELO NUMERO DE PARTICIPANTES. FAZER UMA MÉDIA ONDE O RESULTADO VAI SER DE 1 ATÉ 5.

ABAIXO ESTÃO OS DOMÍNIOS E SUAS FACETAS CORRESPONDENTES CADA FACETA COM UM NÚMERO IDENTIFICADOR CONFORME O QUESTIONÁRIO JÁ ENVIADO.

Domínios e facetas do WHOQOL-bref.

Domínio 1 - Domínio físico

3. Dor e desconforto
4. Energia e fadiga

AQUI DO LADO VAI APARECER A MÉDIA (RESULTADO) EM CADA FACETA.

10. Song e repouso

15. Mobilidade

16. Atividades

16. Atividades da vida cotidiana
17. Exercícios físicos e recreativos

17. Dependência de medicação ou de tratamentos

18. Capacidade de trabalho

PARA CALCULAR O DOMÍNIO FÍSICO E SO SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 7. (Q3,Q4,Q10,Q15,Q16,Q17,Q18)/7.

MESMO FORMATO DEVE SER FEITO NOS DEMAIS DOMINIOS.

Domínio 2 - Domínio psicológico

5. Sentimientos positivos

6. Pensar, aprender, memória e concentração

7. Auto-estima

11. Imagem corporal e aparência

19. Sentimientos negativos

26. Espiritualidade/religião/crenças pessoais

PARA CALCULAR O DOMÍNIO PSICOLÓGICO É SÓ SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 6. (Q5,Q6,Q7,Q11,Q19,Q26)/6

Domínio 3 - Relações sociais

20. Relações pessoais

21. Suporte (Apoio) social

22. Atividade sexual

PARA CALCULAR O DOMÍNIO RELAÇÕES SOCIAIS É SO SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 3. (Q20,Q21,Q22)/3

Domínio 4 - Meio ambiente

8. Segurança física e proteção

9. Ambiente no lar

12. Recursos financeiros

13. Cuidados de saúde e sociais; disponibilidade e qualidade

14. Oportunidades de adquirir novas informações e habilidades

23. Participação em, e oportunidades de recreação/lazer

24. Ambiente físico: (poluição/ruído/trânsito/clima)

25. Transporte

PARA CALCULAR O DOMINIO MEIO AMBIENTE É SÓ SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 8. (Q8,Q9,Q12,Q13,Q14,Q23,Q24,Q25)/8

TODOS OS RESULTADOS VÃO SER EM MÉDIA TANTO NO DOMINIO QUANTO NAS FACETAS. QUANTO AOS RELATORIOS MESMO FORMATO DO WHIOQOL-OLD. OPÇÃO PARA IMPRIMIR PARA ALUNOS O RELATORIO COMPLETO (COM DOMINIO, AS FACETAS, AS PERGUNTAS UM E DOIS E A CLASSIFICAÇÃO **necessita melhorar** (quando for 1 até 2,9); **regular** (3 até 3,9); **boa** (4 até 4,9) e **muito boa** (5)) E RESUMIDO COM OS RESULTADOS DAS QUESTOES UM E DOIS **necessita melhorar** (quando for 1 até 2,9); **regular** (3 até 3,9); **boa** (4 até 4,9) e **muito boa** (5).

OS DADOS TABULADOS DEVEM SER COMPATIVELIS PARA IMPORTAÇÃO PARA O EXCEL, CASO SEJA NECESSÁRIO.

WHOQOL – ABREVIADO (FLECK et al, 2000) - Versão em Português

Instruções

Este questionário é sobre como você se sente a respeito de sua qualidade de vida, saúde e outras áreas de sua vida. **Por favor responda a todas as questões.** Se você não tem certeza sobre que resposta dar em uma questão, por favor, escolha entre as alternativas a que lhe parece mais apropriada. Esta, muitas vezes, poderá ser sua primeira escolha. Por favor, tenha em mente seus valores, aspirações, prazeres e preocupações. Nós estamos perguntando o que você acha de sua vida, tomando como referência as **duas últimas semanas**. Por exemplo, pensando nas últimas duas semanas, uma questão poderia ser:

	nada	Muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	4	5

Você deve circular o número que melhor corresponde ao quanto você recebe dos outros o apoio de que necessita nestas últimas duas semanas. Portanto, você deve circular o número 4 se você recebeu "muito" apoio como abaixo.

	nada	Muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	–	5

Você deve circular o número 1 se você não recebeu "nada" de apoio.

Por favor, leia cada questão, veja o que você acha e circule no número e lhe parece a melhor resposta.

		muito ruim	Ruim	nem ruim nem boa	boa	muito boa
1	Como você avaliaria sua qualidade de vida?	1	2	3	4	5
		muito insatisfeit o	Insatisfei to	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeit o	muito satisfeit o
2	Quão satisfeito(a) você está com a sua saúde?	1	2	3	4	5

As questões seguintes são sobre o quanto você tem sentido algumas coisas nas últimas duas semanas.

		nad a	muito pouco	mais ou menos	bastant e	extremame nte
3	Em que medida você acha que sua dor (física) impede você de fazer o que você precisa?	1	2	3	4	5
4	O quanto você precisa de algum tratamento médico para levar sua vida diária?	1	2	3	4	5
5	O quanto você aproveita a vida?	1	2	3	4	5
6	Em que medida você acha que a sua vida tem sentido?	1	2	3	4	5
7	O quanto você consegue se concentrar?	1	2	3	4	5
8	Quão seguro(a) você se sente em sua vida diária?	1	2	3	4	5
9	Quão saudável é o seu ambiente físico (clima, barulho, poluição, atrativos)?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre quão completamente você tem sentido ou é capaz de fazer

certas coisas nestas últimas duas semanas.						
		nada	muito pouco	médio	muito	completamente
10	Você tem energia suficiente para seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
11	Você é capaz de aceitar sua aparência física?	1	2	3	4	5
12	Você tem dinheiro suficiente para satisfazer suas necessidades?	1	2	3	4	5
13	Quão disponíveis para você estão as informações que precisa no seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
14	Em que medida você tem oportunidades de atividade de lazer?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre quão bem ou satisfeito você se sentiu a respeito de vários aspectos de sua vida nas últimas duas semanas.						
		muito ruim	ruim	nem ruim nem bom	bom	muito bom
15	Quão bem você é capaz de se locomover?	1	2	3	4	5
		muito insatisfeito	Insatisfeito	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeito	Muito satisfeito
16	Quão satisfeito(a) você está com o seu sono?	1	2	3	4	5
17	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade de desempenhar as atividades do seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
18	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade para o trabalho?	1	2	3	4	5
19	Quão satisfeito(a) você está consigo mesmo?	1	2	3	4	5

20	Quão satisfeito(a) você está com suas relações pessoais (amigos, parentes, conhecidos, colegas)?	1	2	3	4	5
21	Quão satisfeito(a) você está com sua vida sexual?	1	2	3	4	5
22	Quão satisfeito(a) você está com o apoio que você recebe de seus amigos?	1	2	3	4	5
23	Quão satisfeito(a) você está com as condições do local onde mora?	1	2	3	4	5
24	Quão satisfeito(a) você está com o seu acesso aos serviços de saúde?	1	2	3	4	5
25	Quão satisfeito(a) você está com o seu meio de transporte?	1	2	3	4	5

As questões seguintes referem-se a **com que frequência** você sentiu ou experimentou certas coisas nas últimas duas semanas.

		nunca	Algumas vezes	freqüentemente	muito freqüentemente	sempre
26	Com que frequência você tem sentimentos negativos tais como mau humor, desespero, ansiedade, depressão?	1	2	3	4	5

Alguém lhe ajudou a preencher este questionário?

.....

Quanto tempo você levou para preencher este questionário?

.....

Referencias

The Whoqol Group: The word Health Organization Quality of Life Assessment (WHOQOL): Position paper from the Health Organization. Soc. Sci. Med, 1995, 41(10):1403-1409.

Fleck MPA, Louzada S, Xavier M, Chamovich E, Vieira G, Santos L, Pinzon V. Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida "WHOQOL-bref". Revista de saúde pública, 2000, 34(2):178-183

**ANEXO H – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DA SAÚDE MENTAL, NA
VERSÃO TRADUZIDA PARA O PORTUGUÊS SELF-REPORTING
QUESTIONNAIRE 20 (SRQ 20)**

**TESTE: SRQ 20 – SELF REPORT QUESTIONNAIRE.
APLICAR O TESTE SRQ 20 EM TODOS**

Teste: **SRQ 20 – Self Report Questionnaire.**

Teste que avalia o sofrimento mental. Por favor, leia as instruções antes de preencher as questões abaixo. É muito importante que todos que estão preenchendo o questionário sigam as mesmas instruções.

Instruções

Estas questões são relacionadas a certas dores e problemas que podem ter lhe incomodado nos últimos 30 dias. Se você acha que a questão se aplica a você e você teve o problema descrito nos últimos 30 dias responda SIM. Por outro lado, se a questão não se aplica a você e você não teve o problema nos últimos 30 dias, responda NÃO.

OBS: Lembre-se que o diagnóstico definitivo só pode ser fornecido por um profissional.

PERGUNTAS	RESPOSTAS
9.1- Você tem dores de cabeça freqüente?	SIM ☐ NÃO ☐
9.2- Tem falta de apetite?	SIM ☐ NÃO ☐
9.3- Dorme mal?	SIM ☐ NÃO ☐
9.4 Assusta-se com facilidade?	SIM ☐ NÃO ☐
9.5- Tem tremores nas mãos?	SIM ☐ NÃO ☐
9.6- Sente-se nervoso(a), tenso(a) ou preocupado(a)	SIM ☐ NÃO ☐
9.7- Tem má digestão?	SIM ☐ NÃO ☐
9.8- Tem dificuldades de pensar com clareza?	SIM ☐ NÃO ☐
9.9- Tem se sentido triste ultimamente?	SIM ☐ NÃO ☐
9.10- Tem chorado mais do que de costume?	SIM ☐ NÃO ☐
9.11- Encontra dificuldades para realizar com satisfação suas atividades diárias?	SIM ☐ NÃO ☐
9.12- Tem dificuldades para tomar decisões?	SIM ☐ NÃO ☐
9.13- Tem dificuldades no serviço (seu trabalho é penoso, causa-lhe sofrimento?)	SIM ☐ NÃO ☐
9.14- É incapaz de desempenhar um papel útil em sua vida?	SIM ☐ NÃO ☐
9.15- Tem perdido o interesse pelas coisas?	SIM ☐ NÃO ☐
9.16- Você se sente uma pessoa inútil, sem préstimo?	SIM ☐ NÃO ☐
9.17- Tem tido idéia de acabar com a vida?	SIM ☐ NÃO ☐
9.18- Sente-se cansado(a) o tempo todo?	SIM ☐ NÃO ☐
9.19- Você se cansa com facilidade?	SIM ☐ NÃO ☐
9.20- Tem sensações desagradáveis no estômago?	SIM ☐ NÃO ☐
9.21-Total de respostas SIM	
9.22. Este sujeito, de acordo com a pontuação acima, tem sofrimento mental leve:	1[]Sim
2[]Não	

RESULTADO: Se o resultado for ≥ 7 (maior ou igual a sete respostas SIM) está comprovado sofrimento mental.

Use o espaço abaixo para qualquer observação pertinente a esta coleta de dados

ANEXO I – AVALIAÇÃO DO DESFECHO COGNITIVO: FERRAMENTA MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)
Versão Experimental Brasileira

Nome: _____
Escolaridade: _____
Sexo: _____

Data de nascimento: ____/____/____
Data de avaliação: ____/____/____
Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		Pontos		
		Copiar o cubo []	Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos) [] [] [] Contorno Números Ponteiros ____/5	
[]				
NOMEAÇÃO 		[] [] [] ____/3		
MEMÓRIA Leia a lista de palavras, o sujeito deve repeti-las, faça duas tentativas. Evocar após 5 minutos.	Rosto Veludo Igreja Margarida Vermelho 1ª tentativa 2ª tentativa	Sem Pontuação ____/5		
ATENÇÃO Leia a sequência de números (1 número por segundo).	O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta [] 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta [] 7 4 2	____/2		
Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros. [] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B		____/1		
Subtração de 7 começando pelo 100 [] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65 4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto		____/3		
LINGUAGEM Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. []	O gato sempre se esconde embaixo do sofá quando o cachorro está na sala. []	____/2		
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [] _____ (N ≥ 11 palavras)		____/1		
ABSTRAÇÃO Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [] trem - bicicleta [] relógio - régua	____/2		Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS	
EVOCAÇÃO TARDIA Deve recordar as palavras SEM PISTAS	Rosto [] Veludo [] Igreja [] Margarida [] Vermelho []	____/5		
OPCIONAL Pista de categoria Pista de múltipla escolha	[]			
ORIENTAÇÃO [] Dia do mês [] Mês [] Ano [] Dia da semana [] Lugar [] Cidade		____/6		
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman (UNIFESP - SP 2007)		TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade ____/30		

ANEXO J – AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SONO: FERRAMENTA AUTOAPLICÁVEL ÍNDICE DE QUALIDADE DO SONO DE PITTSBURGH (PSQI)

Índice da qualidade do sono de Pittsburgh

As seguintes perguntas são relativas aos seus hábitos de sono durante o último mês somente. Suas respostas devem indicar a lembrança mais exata da maioria dos dias e noites do último mês. Por favor, responda a todas as perguntas.

Nome:

Idade:

Data:

1. Durante o último mês, quando você geralmente foi para a cama a noite?

hora usual de deitar:

2. Durante o último mês, quanto tempo (em minutos) você geralmente levou para dormir a noite?

número de minutos:

3. Durante o último mês, quando você geralmente levantou de manhã?

hora usual de levantar?

4. Durante o último mês, quantas horas de sono você teve por noite? (Esta pode ser diferente do número de horas que você ficou na cama)

Horas de sono por noite:

5. Durante o último mês, com que frequência você teve dificuldade para dormir porque você:

A) não conseguiu adormecer em até 30 minutos

1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana

B) acordou no meio da noite ou de manhã cedo

1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana

C) precisou levantar para ir ao banheiro

1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana

D) não conseguiu respirar confortavelmente

1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana

E) tossiu ou roncou forte

1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana

- F) Sentiu muito frio
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
- G) sentiu muito calor
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
- H) teve sonhos ruins
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
- I) teve dor
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
- J) outras razões, por favor descreva: _____
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
6. Durante o último mês como você classificaria a qualidade do seu sono de uma maneira geral:
- | | | | |
|-----------|-----|------|------------|
| Muito boa | Boa | Ruim | Muito ruim |
|-----------|-----|------|------------|
7. Durante o último mês, com que frequência você tomou medicamento (prescrito ou por conta própria) para lhe ajudar
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
8. No último mês, que frequência você teve dificuldade para ficar acordado enquanto dirigia, comia ou participava de uma atividade social (festa, reunião de amigos)
- | | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 = nenhuma no último mês | 2 = menos de uma vez por semana |
| 3 = uma ou duas vezes por semana | 4 = três ou mais vezes na semana |
9. Durante o último mês, quão problemático foi pra você manter o entusiasmo (ânimo) para fazer as coisas (suas atividades habituais)?
- | | |
|----------------------|--------------------|
| Nenhuma dificuldade | Um problema leve |
| Um problema razoável | Um grande problema |
10. Você tem um parceiro (a), esposo (a) ou colega de quarto?
- A) Não
- B) Parceiro ou colega, mas em outro quarto

- C) Parceiro no mesmo quarto, mas em outra cama
- D) Parceiro na mesma cama

Se você tem um parceiro ou colega de quarto pergunte a ele com que frequência, no último mês você apresentou:

- E) Ronco forte
1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana
- F) Longas paradas de respiração enquanto dormia
1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana
- G) contrações ou puxões de pernas enquanto dormia
1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana
- D) episódios de desorientação ou confusão durante o sono
1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana
- E) Outras alterações (inquietações) enquanto você dorme, por favor descreva: _____
1 = nenhuma no último mês 2 = menos de uma vez por semana
3 = uma ou duas vezes por semana 4 = três ou mais vezes na semana

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

MARCELLO BRAGANÇA FIGUEIREDO

**Caracterização do Infiltrado Inflamatório no Câncer de Mama e sua
relação com a Obesidade**

Porto Alegre

2019

MARCELLO BRAGANÇA FIGUEIREDO

**Caracterização do Infiltrado Inflamatório no Câncer de Mama e sua
relação com a Obesidade**

Projeto apresentado como Plano de Doutorado, requisito parcial para seleção do
Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Orientadora: Profa. Dr^a. Adriana Vial Roehe

Porto Alegre

2019

RESUMO

.O câncer de mama afeta principalmente mulheres a partir dos 40 anos de idade, sendo o segundo tipo mais comum de neoplasia maligna no mundo, correspondendo a 11,6% de todos os cânceres diagnosticados. No Brasil, o câncer de mama é uma das dez principais causas de morte, sendo frequente nas regiões sudeste e sul do país. O carcinoma ductal invasivo é o mais frequente, seguido do tipo lobular.

Através do estudo imunohistoquímico, poderemos categorizar as células tumorais e as células inflamatórias presentes no tecido, pelo seu perfil antigênico. Estudos levantaram a hipótese de que o processo inflamatório poderia aumentar a proliferação celular e o risco de desenvolvimento de câncer.

A obesidade visceral é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer, incluindo o carcinoma mamário. Os mecanismos fisiopatológicos desta associação continuam ainda em estudo. Uma hipótese está relacionada à resposta inflamatória tecidual induzida pela obesidade e pela neoplasia.

Este projeto pretende estudar o processo inflamatório “in-situ” nos tumores e sua relação com a obesidade e progressão da doença, através da análise de amostras de tecido tumoral embocado em parafina de pacientes com carcinoma de mama.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE NEOPLASIAS	5
1.2	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CÂNCER DE MAMA	6
1.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO CÂNCER	7
1.4	CÂNCER DE MAMA E OBESIDADE	8
2	OBJETIVOS	9
2.1	Geral	9
2.2	Específicos	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS	9
4	CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	13
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
	ANEXOS	17

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE NEOPLASIAS

O processo de diferenciação e proliferação celular são controlados por um sistema que mantém a população celular crescendo dentro de limites fisiológicos. Qualquer distúrbio que ocasione mutações em uma única célula e sua progênie clonal, resultará em proliferação celular autônoma, acompanhada de perda ou redução da diferenciação, chamada neoplasia (gr. neo = novo; plasis = formação) (Alison, 2010).

Dos pontos de vista clínico, evolutivo e de comportamento, as neoplasias são divididas em duas categorias: benignas e malignas. As neoplasias benignas e malignas causam transtornos variados, que vão desde um simples problema estético até a morte do hospedeiro (Depinho, 2000).

A neoplasia maligna começa nas células somáticas normais com uma mutação que é fixada por uma proliferação celular e transformação genômica, alterando as respostas das células ao ambiente, tornando-as capazes de multiplicar-se de maneira autônoma. A progressão de um tumor está relacionada com sucessivas modificações na expressão gênica das células. Os tumores sólidos são compostos por populações heterogêneas de células neoplásicas e um conjunto elaborado de células mesenquimais e inflamatórias recrutadas de origem hospedeira que formam o estroma associado ao tumor, a esse coletivo dá-se o nome de microambiente tumoral (Joyce, 2009).

A metástase é o momento mais crítico da tumorigênese, pois 90% da mortalidade do câncer está relacionada com a disseminação metastática. Estudo mostrou que a metástase requer uma estreita colaboração entre as células neoplásicas, inflamatórias e os elementos do estroma tumoral. Entre as células imunoinflamatórias mais frequentemente encontradas no microambiente tumoral, estão os macrófagos (Grivennikov et al. 2010).

O processo inflamatório constante do microambiente tumoral induz a proliferação celular, angiônese e aumento da sobrevivência das células tumorais, porque inibe a apoptose, contribuindo assim para a disseminação e a metástase (Pereira, 2009).

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER DE MAMA

Os tumores na mama são uma das patologias mais prevalentes nas consultas de atenção básica, desde a adolescência até a velhice, causando ansiedade significativa nas pacientes que sofrem e em suas famílias (Axelrod et al, 2008). O câncer de mama é o segundo tipo mais comum de câncer no mundo, com uma estimativa de 2,1 milhões de casos, correspondendo a 11,6% de todos os cânceres diagnosticados. Este tipo de câncer afeta principalmente mulheres a partir dos quarenta anos de idade e apresenta incidência na sexta década de vida (WHO, 2019). No Brasil, o câncer de mama é uma das dez principais causas de morte e de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019) são estimados para o biênio 2018/2019, 59.700 novos casos com estimativa de risco de 56,33 % de casos por 100.000 mulheres. Excluído o câncer de pele não melanoma, é o mais frequente das mulheres na região sul do Brasil (INCA, 2019). Embora as estatísticas o considerem uma doença única, sabe-se que possui várias classificações anatomopatológicas e modelos distintos de carcinogênese, bem como tendências epidemiológicas específicas (Lopez-Garcia ET AL, 2010). Diferentes subtipos histológicos e moleculares possuem diferenças quanto aos aspectos do prognóstico e resposta terapêutica, sendo que os estudos que avaliem as mamas sejam individualizados para cada subtipo (Mann et al, 2008).

Aproximadamente 95% das neoplasias da mama tem origem epitelial, denominada carcinoma, formando lesões in-situ ou invasivas. O carcinoma ductal invasivo é o mais frequente (75%), seguido do tipo lobular (15%) e 10% do subtipo especial. Além disso, através do estudo imunoistoquímico, podemos categorizar o tumor através do perfil imunofenotípico analisando a presença de receptor de estrogênio (ER), da progesterona (PR) e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), de suma importância, marcadores prognósticos e preditivos que vão definir o tratamento e o manejo clínico (Menke et al, 2007).

O conhecimento dos fatores relevantes sobre o comportamento biológico do câncer de mama, as classificações diagnósticas e seu tratamento, tem sido

motivo de crescente preocupação para diversas pesquisas (Anderson et al, 2005).

Com base no seu perfil genômico, a doença pode ser classificada em seis subtipos (A luminal, B luminal, receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), rico em basal, basal, baixo de claudina e normal) (Herschkowitz et al, 2007).

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO CÂNCER

Em 1863, o patologista alemão Rudolf Carl Virchow levantou a hipótese que a relação entre inflamação crônica x neoplasias malignas podem existir, assumindo que a inflamação aumentaria a proliferação celular e o risco do desenvolvimento de tumores (Atsumi et al, 2013). O conhecimento sobre a relação entre inflamação e câncer não é novidade. A progressão tumoral não é apenas governada por alterações genéticas intrínsecas às células malignas, segundo evidências acumuladas. A inflamação também é um fator, e experimentos apoiam a ideia de que o sistema imunológico inato pode promover o desenvolvimento de tumores por meio de mecanismos dependentes da inflamação (Coussens, LM; Werb Z, 2002). Uma produção aumentada de mediadores inflamatórios incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) durante a progressão de tumores malignos em parte do trato intestinal em modelos de camundongos, foi evidenciada em experimento (Clevers, 2004).

O microambiente tumoral é representado pelas células neoplásicas e pelos elementos não neoplásicos do tumor (estroma circundante). O processo inflamatório se destaca como um componente fundamental deste ambiente e influencia diversas células a interagirem de forma autócrina e parácrina para controlar e delinear o crescimento da neoplasia (Grivennicov et al, 2010). O tumor pode direcionar o comportamento da inflamação podendo se prevalecer na promoção do seu crescimento, principalmente quando o tumor já está estabelecido. A inflamação nesta doença é de um tipo crônico, não resolutivo, promovendo a progressão tumoral (Suarez-Carmona et al, 2017).

Segundo, Figueiredo CR (2018) exerce não somente um controle interno sobre o tumor, mas também externo, na influência de recrutar células

circulantes para o seu crescimento e disseminação, podendo várias vezes suprimir por meio de sinalizações os mecanismos de resistência do seu hospedeiro.

1.4 CÂNCER DE MAMA E OBESIDADE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a prevalência de sobrepeso e obesidade está aumentando nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 2000). A obesidade é um distúrbio multifatorial influenciado por fatores genéticos, comportamentais, culturais e ambientais (Dekkers et al, 2004). O excesso geral de gordura, geralmente definido pelo índice de massa corporal (IMC) é reconhecido há muito tempo como fator de risco para várias doenças, inclusive neoplasias (Tchernof A, Despres J P, 2013). As doenças crônicas, incluindo o câncer podem ser conectados através de uma variedade de fatores de risco para as doenças metabólicas, incitando especulações sobre os mecanismos que ligam a adiposidade à resistência à insulina (RI) e resulta na aparição de certos tipos de neoplasias malignas. A obesidade visceral é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento dos chamados “cânceres relacionados à obesidade”, incluindo carcinomas de mama, endometrial, colorretal e pancreático (Renehan et al, 2008). Os mecanismos subjacentes à associação entre adiposidade e câncer ainda permanecem inexplicáveis (Siviero et al, 2008). O ganho de peso ocorre devido a um balanço de peso positivo e à hiperfagia resultando no aumento na ingestão de calorias (Niraula et al, 2012). Além de ser um fator de risco, a obesidade está relacionada a pior sobrevida global e sobrevida específica para pacientes com câncer de mama. A obesidade está associada a doença neoplásica maligna avançada no diagnóstico e consequentemente no prognóstico (Azrad M, Demark-Wahnefried W, 2014). Altos valores de índice de massa corporal geralmente estão associados a maiores concentrações de hormônios sexuais circulantes (estrógeno), insulina e fator de crescimento de insulina e ativação de vias inflamatórias ocorrendo a um desequilíbrio na relação de diferenciação celular e apoptose, com consequente proliferação de células neoplásicas. Porém, o mecanismo não está bem estabelecido (Eichholzer et al, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

A pesquisa terá como objetivo geral estudar no local de ação, o processo inflamatório desencadeado pela neoplasia e sua relação com a obesidade e progressão da neoplasia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Detectar através da reação de imunohistoquímica, a presença de antígenos na neoplasia;
- Avaliar a resposta imune “in-situ” nas lesões;
- Determinar o perfil fenotípico das células inflamatórias, através de imunohistoquímica e sua relação com a obesidade das pacientes, avaliada através do IMC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos de Pesquisa:

Serão analisadas amostras (blocos de parafina) de pacientes com carcinoma de mama, provenientes de estudo previamente aprovado pelo CEP-UFCSPA (Anexo I). Não haverá nova coleta de material. Gostaria de salientar que o protocolo de pesquisa original “CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO” foi construído e aprovado nos termos das diretrizes e normativas vigentes no ano de 2010 (Resolução CNS 196/96). No TCLE (Anexo II), a paciente autoriza a utilização de informações clínicas e material biológico em estudos futuros. Embora não esteja especificado no TCLE, mas pode ser conferido no protocolo de pesquisa*, o estudo engloba análise histopatológica (lâminas HE) e imunohistoquímica de blocos de parafina e análises moleculares (DNA).

* O protocolo de pesquisa original será incluído na Plataforma Brasil juntamente com a documentação do projeto.

Critérios de Inclusão:

A partir do protocolo original anteriormente citado serão incluídas amostras de pacientes femininas com diagnóstico de câncer de mama, que concordaram em participar do estudo.

Critérios de exclusão:

Serão excluídas pacientes que não concordaram em participar do estudo e pacientes do sexo masculino.

Delineamento:

Estudo transversal

Tamanho amostral:

Serão utilizadas 300 amostras (blocos de parafina) do banco de dados pré-existente, proveniente do estudo original, considerando-se os devidos poder e significância estatísticos.

Os blocos de parafina encontram-se armazenados sob a responsabilidade do pesquisador responsável, assim como o banco de dados com as informações clinicopatológicas previamente coletadas, incluindo o IMC.

Local de realização da Pesquisa:

Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA.

3.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Serão examinadas lâminas coradas com hematoxilina e eosina (já existentes) de cada caso incluído no estudo para determinar a resposta imune (infiltrado inflamatório) presente no tecido da neoplasia. Em seguida serão realizadas reações imunohistoquímicas com anticorpos para caracterização do fenótipo das células inflamatórias (CD8, CD20, PDL1).

3.1.2 Exame de imunohistoquímica

Processo de realização do exame

1- Desparafinização dos cortes histológicos em banho de xilol em temperatura ambiente por 20 minutos e novamente em banho de xilol por 10 minutos;

2- Hidratação dos cortes em etanol durante 5 minutos em cada solução: etanol absoluto e soluções a 95% e 70%;

3- Lavagem em água corrente durante 5 minutos e água destilada, 5 minutos;

4- Bloqueio de peroxidase endógena com 3 passagens de 10 minutos cada em solução de água oxigenada 3% em câmara escura;

5- Lavagem em água corrente, água destilada e em tampão fosfato salina (PBS) pH 7.4 por 5 minutos cada lavagem;

6- Incubação com solução de leite desnatado 10% em água destilada por 30 minutos a temperatura ambiente para bloqueio de proteínas inespecíficas;

7- Incubação com o anticorpo primário diluído em albumina bovina (BSA) 1%, “over-night” a 4 C;

8- Lavagem em PBS por 10 minutos e incubação com o anticorpo secundário anti a espécie do animal do anticorpo primário, 30 minutos a 37 C, lavar em PBS e em seguida com o complexo estreptavidina-biotina (DAKO, LSAB K0690);

9- Revelação da reação com 3,3 diaminobenzidina, 45 mg em PBS, acrescido de 1,2 mL de água oxigenada a 3%;

10- Lavagem em água corrente e contracoloração com Hematoxilina de Harris;

11- Desidratação dos cortes em sequência crescente de etanol, xilol e montagem com resina.

3.2 Análise Estatística

Será constituído um banco no software excel, contendo as variáveis em estudo. A normalidade dos diversos parâmetros em estudo será determinada pelo kolmogorov-Smirnov. Para comparar as variáveis com distribuição normal entre os grupos de estudo e controle, serão empregados o teste t de student e a ANOVA um critério. Para aquelas cuja distribuição não for normal serão

empregados os testes U e análise de Kruskal Wallis. No estudo das correlações serão determinados os coeficientes de correlação de Pearson e Spearmann. Os resultados dos exames histopatológicos e imunohistoquímicos serão comparados entre grupos pelo Teste exato de Fisher e Qui-quadrado. Os testes estatísticos serão realizados com auxílio do Software Biostat 5.0. O Nível de significância será de 5%.

3.3 Aspectos Éticos

O presente estudo está em consonância com a Resolução 466/12 do CNS/MS. Não afetará de forma direta os indivíduos participantes, pois será realizada apenas análise de material previamente coletado em estudo anterior. O material encontra-se sob a responsabilidade do pesquisador responsável (Adriana Vial Roehe). Não haverá também discriminação na seleção dos indivíduos, nem a exposição dos mesmos a riscos desnecessários. Serão dadas garantias da preservação dos dados, da confidencialidade e do anonimato dos indivíduos pesquisados. Os dados já coletados serão somente utilizados para realização do protocolo da pesquisa, sendo que os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) para participação da pesquisa já foram obtidos previamente e encontram-se de posse do pesquisador responsável (Anexo II).

Não serão necessárias novas coletas de material e nem de informações clínicas. O presente projeto não envolve a participação direta de indivíduos, somente de material previamente coletado.

A pesquisa só será iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.

CRONOGRAMA

ANO 2019				
ATIVIDADES	SET	OUT	NOV	DEZ
Levantamento Bibliográfico			X	X
Entrega do Projeto CEP			X	

ANO 2020												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAIO	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Seleção das amostras para análise			X	X	X							
Elaboração de banco de dados					X	X	X	X	X	X		

ANO 2021												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAIO	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Realização Reações IHC	X	X	X	X	X							
Análise de resultados						X	X	X	X	X	X	X

ANO 2022												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAIO	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Análise de Resultados	X	X	X									
Discussão Estatística				X	X	X	X	X	X	X	X	
Elaboração da Tese								X	X	X	X	X

ANO 2023												
ATIVIDADES	JAN	FEV	MAR	ABR	MAIO	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Elaboração da Tese	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Entrega da Tese												X

ORÇAMENTO

Material para impressão e de escritório (folhas A4, tonner para impressora, caneta esferográfica): **R\$ 800,00**

O Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA já dispõe da infraestrutura e reagentes necessários para a realização deste estudo.

A fonte de financiamento utilizada para elaboração, execução e análise do projeto será proveniente dos proventos financeiros do pesquisador.

Referências Bibliográficas

Alison, MR, Islam S, Wright NA. Stem cells in cancer: instigators and propagators? J CellSci., 123: 2357-68, 2010.

Anderson BO, Senie RT, Vetto JT, Wong GY, McCormick B, Borgen PI. Improved survival in young women with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005; 2: 407-15.

Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, et al. Amplificador de inflamação: um novo paradigma na biologia do câncer. *Cancer Res*. 2013; 74 (1): 8-14.

Axelrod D, Smith J, Kornreich D, Grinstead E, Singh B, Cangiarella J et al. Câncer de mama em mulheres jovens. *J Am Coll Surg*. 2008; 206 (6): 1193-203.

Azrad M, Demark-Wahnefried W. A associação entre adiposidade e recorrência e sobrevida do câncer de mama: Uma revisão da literatura recente. *Curr Nutr Rep*. 2014; 3 (1): 9-15.

Clevers H. Na encruzilhada de inflamação e câncer. *Cell* 2004; 118: 671 - 674

Coussens LM, Werb Z. Inflamação e câncer. *Nature* 2002; 420: 860 – 867

Dekkers JC, Podolsky RH, Treiber FA, Barbeau P, Gutin B, Snieder H. Desenvolvimento da obesidade geral e central desde a infância até a idade adulta em homens e mulheres afro-americanos e europeus americanos com histórico familiar de doença cardiovascular. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79 (4): 661-8.

Depinho, RA. The age of cancer. *Nature*, 408:248-54, 2000.

Eichholzer M, Huang DJ, Modlasiak A, Schmid SM, Schötzau A, Rohrmann S, et al. Impacto do índice de massa corporal nas características prognósticas do tumor de câncer de mama. *Cuidados com os seios (Basileia)*. 2013; 8 (3): 192-8.

Emaus A, Marit BV, Steinar T, Finstad SE, Selmer R, Furberg A, Bernstein L, Schlichting E, Thune I. Metabolic profile, physical activity, and mortality in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121(3):651-660.

Figueiredo, Cláudia Roberta LV. O paradoxo incomum da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v. 55, n. 3, p. 321-332, junho de 2019.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identificação de características conservadas de expressão gênica entre modelos de carcinoma mamário murino e tumores de mama em humanos. *Genoma Biol* 2007; 8 (05): R76
International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. GLOBOCAN – Global Cancer Observatory. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>
Acesso em 13 nov. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer**. Rio de Janeiro: INCA; 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de->

[cancer/cancer-de-mama>](#). Acesso em: 7 nov. 2019.

Joyce JA & Pollard JW Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252 (2009).

Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010 Aug; 57(2): 171-92.

Mann RM, Hoogeveen YL, Blickman JG, et al. MRI compared to conventional diagnostic work-up in the detection and evaluation of invasive lobular carcinoma of the breast: a review of existing literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107:1-14

Menke CH, Biazús JV, Xavier NL, et al. Rotinas em mastologia. 2ed. Porto Alegre: Artmed; 2007

Niraula S, Ocana A, Ennis M, Goodwin PJ. Tamanho corporal e prognóstico do câncer de mama em relação ao receptor hormonal e ao status da menopausa: uma metanálise. *Tratamento para câncer de mama*. 2012; 134 (2): 769-81.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Obesidade**: prevenção e gerenciamento da epidemia global. Genebra: OMS, 2000 (Série de relatórios técnicos da OMS, nº 184).

Pereira Jr JL. Avaliação da resposta inflamatória como marcador de atividade tumoral em pacientes com câncer colorretal [dissertação]. Juiz de Fora (MG): Universidade Federal de Juiz de Fora; 2009.

Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesidade e câncer: mecanismos fisiopatológicos e biológicos. *Arch Physiol Biochem*. 2008; 114 (1): 71-83.

Siviero-Miachon AA, Spinola-Castro AM, Guerra-Junior G. A detecção de características da síndrome metabólica entre sobreviventes de câncer infantil: um objetivo para prevenir a doença. *Vasc Health Risk Manag*. 2008; 4 (4): 825-36.

Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*. 2017;11: 805-23.

Tchernof A, Despres JP. Fisiopatologia da obesidade visceral humana: uma atualização. *Physiol Rev*. 2013; 93 (1): 359-404.

ANEXOS

Anexo I - Parecer comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
UFCSPA

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

Projeto: 10-641

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

ADRIANA ROEHE

GRASIELA AGNES

CARMELA NICOLINI

BRUNA PEIXOTO DE SOUZA

TALITA HAUBERT CERUTTI

CLAUDIO OSMAR PEREIRA ALEXANDRE

Título: CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO,

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP.

Porto Alegre, 28 de outubro de 2010.



Jose Gerardo Vernet Taborda
Presidente do CEP/UFCSPA

Anexo II – Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente coletado – referente ao projeto do Anexo I.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO

Este texto foi feito para explicar a você um estudo científico que está sendo desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde e no Grupo Hospitalar Conceição (Hospital Fêmina). O texto serve para explicar a você o que será realizado neste estudo. Este trabalho só será iniciado após a aprovação pelos Comitê de Ética em Pesquisa das duas instituições: Universidade Federal de Ciências da Saúde e Grupo Hospitalar Conceição.

As causas dos tumores malignos de mama ainda não são totalmente conhecidas. Sabe-se que existem fatores genéticos associados, principalmente quando ocorrem em pacientes jovens. O objetivo deste estudo é avaliar se houve um aumento no número de pessoas com menos de 40 afetadas pela doença e se estas pessoas possuem fatores de risco diferentes em relação a pessoas mais velhas. Além disto, este estudo irá avaliar se estas pessoas possuem tumores mais avançados no momento do diagnóstico, se eles respondem pior ao tratamento e se eles têm características clínicas e biológicas próprias e diferentes dos tumores de mama que ocorrem em mulheres mais velhas.

A participação neste estudo é voluntária e não implica em qualquer diferença na sua cirurgia e no seu tratamento. Iremos coletar uma amostra de 3 mililitros de sangue venoso para estudo, através da punção de veia, para fazermos análises genéticas, neste estudo e em estudos futuros. Você também responderá a um questionário sobre fatores de risco para câncer e nos autorizará a revisar dados do seu prontuário médico, referentes à sua doença.

Não há qualquer risco extra para você e a participação no estudo não alterará de forma alguma seu tratamento. Você terá acesso a todos os resultados de seus testes e não haverá qualquer custo financeiro adicional.

A recusa em participar do estudo em nada afetará sua assistência médica. Em caso de divulgação científica dos resultados deste estudo, não haverá qualquer identificação individual, sendo garantido sigilo e anonimato dos pacientes participantes. Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar a Dra. Adriana Vial Roehe (pesquisadora responsável) no telefone 33038723, ou no endereço Av. Sarmiento Leite nº 245, sala 10, para qualquer pergunta sobre os

meus direitos com participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar a Dra. Andrea Souto Damin, no telefone, 33145223, (pesquisadora participante), ou o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, na Av. Sarmiento Leite, 245, Anexo 1, Pós-Graduação, telefone 33038804. Finalmente, se você concordar em participar do estudo preencha e assine a declaração a seguir:

Eu, ...(paciente ou responsável) fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Também fui informada que responderei a um questionário e que será revisado o meu prontuário e que todos estes dados serão mantidos confidenciais. Recebi informação detalhada a respeito do tratamento e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar. Fui também informada que caso existam custos adicionais, decorrentes diretamente da pesquisa, estes serão absorvidos pelo orçamento da mesma. Sei que a qualquer momento me recusar a participar da pesquisa sem qualquer prejuízo ao meu tratamento.

A Dra. Andréa Damin certificou-me de que, em caso de publicação dos resultados da pesquisa, será preservada a confidencialidade de minha identidade, bem como o tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei a liberdade de retirar o meu consentimento de participação na pesquisa em qualquer momento

Qualquer dúvida ética poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Ufcspa, pelo telefone 33038804, ou do GHC pelo telefone 33572407.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do paciente

Data __/__/__

Nome:

Assinatura do pesquisador

Data __/__/__

Nome:

Este formulário foi lido para _____ em __/__/__ pelo _____
enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha

Data __/__/__

Nome:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**EDITAL FAPERGS 07/2021
PROGRAMA PESQUISADOR GAÚCHO – PqG
Faixa B**

Projeto de Pesquisa Científica

A proteína Nek1 como alvo de tratamento de glioblastoma

Proponente: Dinara Jaqueline Moura

Palavras chaves: Glioblastoma, Nek1, Mre11, 53BP1, resposta a danos ao DNA, Álcool polivinílico, Microfibras, *Sistema de entrega de drogas*

Porto Alegre, novembro de 2021.

a. Título: A proteína Nek1 como alvo de tratamento de glioblastoma

b. Equipe:

Dra. Dinara Jaqueline Moura (Coordenadora do Projeto): Laboratório de Genética Toxicológica, Professora Adjunta do Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Dr. Guido Lenz: Professor Titular do Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr. Michael Nugent: Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Polímeros, Technological University of the Shannon: Midlands Midwest (TUS), Athlone, Irlanda.

Dra. Elizandra Braganhol: Laboratório de Biologia Celular, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

MSc. Luiza Steffens Reinhardt: Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

MSc. Ana Moira Morás: Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Marco Raabe Argenti: Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

Matheus Bernardes Ferro: Estudante de farmácia e iniciação científica no Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS.

c. Caracterização do problema:

Glioma é um termo amplo que engloba todos os tumores benignos ou malignos que surgem de células gliais¹. Os gliomas são tumores cerebrais primários responsáveis por 28% de todos os tumores cerebrais e 80% de todos os tumores malignos². Embora sua incidência relativa seja baixa, possui um mau prognóstico gerando um impacto negativo na qualidade de vida e função cognitiva dos pacientes, o que torna o manejo deste tumor uma tarefa desafiadora. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas de grau I a IV de acordo com a taxa crescente de diferenciação e natureza maligna. O glioblastoma maligno (GB) de grau IV é o tumor cerebral predominante em adultos³⁻⁶. A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia à base de temozolomida (TMZ) são opções de tratamento fundamentais no manejo clínico. No entanto, a maioria dos gliomas são cirurgicamente irresssecáveis e, quando diagnosticados em estágio avançado, o nível de resistência à quimioterapia convencional aumenta. Além disso, pelo difícil acesso à radioterapia, os gliomas tornam-se um dos cânceres mais difíceis de tratar. Mesmo com a utilização das três medidas terapêuticas e apesar dos recentes desenvolvimentos nas terapias antitumorais, pacientes com GB tem uma sobrevivência média de apenas 14,6 meses a partir do diagnóstico⁷. Neste contexto, o entendimento de mecanismos celulares em células tumorais no reparo de DNA e da expressão de proteínas envolvidas na resistência tumoral são fundamentais para identificar novas estratégias terapêuticas no tratamento de GB.

Nek1 (NIMA-related Kinase 1) é um membro da família das Nek quinases, atuando em mitose e reparo de danos ao DNA¹⁸⁻²¹. A proteína Nek1 é necessária para ativar as vias de resposta a danos no DNA (DDR) por meio da proteína ATR²⁰. A Nek1 também parece interagir com outras proteínas relacionadas a danos ao DNA, incluindo Rad54 e Mre11²¹. Mais recentemente, Higelin et al. demonstraram que o comprometimento do maquinário DDR causado pela mutação NEK1

em motoneurônios de pacientes com esclerose lateral amiotrófica leva ao acúmulo de danos ao DNA e aumento da morte celular²², destacando o papel dessa proteína na DDR. Em um contexto de câncer, Nek1 foi associada à progressão do câncer de próstata²³⁻²⁵, diminuição da sensibilidade à terapia de danos ao DNA no carcinoma de células renais, redução da sobrevida livre de doença no câncer cervical, malignidade e agressividade de cânceres de tireoide e resistência a TMZ em células GB^{16,25-27}. Em células de glioma, Zhu et al. sugeriram que Nek1 pode ser um novo e importante alvo, uma vez que seu papel na malignidade do GB está relacionada à promoção do crescimento celular e imunorresistência¹⁶. Dados do nosso grupo de pesquisa, que teve financiamento pelo Edital PPSUS nº 03/2017, ainda não publicados, reforçam este papel de Nek1 na resposta a TMZ e ao agente radiomimético zeocina, já que o *knockout* de Nek1 (usando o sistema CRISPR) tornou as células de glioblastoma U87 mais sensíveis às drogas, alterando as vias de sinalização de danos no DNA. Tomados em conjunto, esses estudos implicam na importância de inibir a atividade de Nek1 durante as terapias que ativam o DDR.

Outras duas proteínas que têm papéis conhecidos na DDR, mas que ainda são pouco investigadas em relação à interação com Nek1, são Mre11 (meiotic recombination 11) e 53BP1 (p53 binding protein 1). Mre11 desempenha um papel central em um complexo proteico (MRN), que inclui as proteínas RAD50 e NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1), exercendo funções em diferentes níveis para prevenir a instabilidade do genoma²⁰. O complexo MRN, coordenado principalmente por Mre11 possui atividades de exonuclease e endonuclease, atuando na ressecção do DNA, no reparo das lesões de dupla fita do DNA (DSBs: double strand breaks), via mecanismos de reparo por HR ou junção de extremidades não homologas (NHEJ: non homologous end joining), dependente da fase do ciclo celular¹⁸. Outra função desempenhada pelo complexo MRN é a resposta ao checkpoint de danos do DNA. Mre11 desencadeia a ativação das cinases ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) e ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related), que por sua vez irão coordenar cascatas de sinalização em resposta ao estresse replicativo contendo a progressão do ciclo celular, interrompendo a propagação dos erros²⁶. Mre11 tem uma importante função na fase S, suprimindo mecanismos oncogênicos, mantendo a integridade genômica, ativando o reparo de DNA e a transdução de sinal na DDR. Entretanto, algumas lacunas em relação à influência de Mre11 no funcionamento da DDR, bem como mecanismos subjacentes resultantes de sua interação com outras proteínas ainda precisam ser esclarecidos²⁶.

A desregulação de Mre11 e 53BP1 estão intimamente relacionadas ao estresse replicativo das células tumorais e a capacidade proliferativa delas. Em células cancerígenas, algumas funções envolvendo a capacidade de reparo na via DDR na sinalização de Mre11 e 53BP1 são alteradas, facilitando a proliferação da carcinogênese²⁷. Yuan et al.²⁸ verificaram que a superexpressão de Mre11 teve uma associação a um comportamento mais agressivo no câncer de mama em tecidos de pacientes diagnosticados com o tumor, o que também foi mostrado em linhagens de células de câncer de mama *in vitro* superexpressas e com knockdown para Mre11. Como destacado anteriormente, a proteína Mre11 desempenha uma função primordial no reparo de DSBs, portanto, sua alta expressão pode explicar em parte a capacidade da resistência em tecidos cancerígenos frente a tratamentos convencionais como radioterapia e quimioterapia. Resultados semelhantes foram observados em um estudo recente de Sun et al., mas na proteína 53BP1. Neste estudo, foi realizado o silenciamento de 53BP1 em camundongos com deleção de BRCA1, observando como resultado a recuperação da letalidade embrionária e redução da incidência de tumor²⁹, evidenciando o papel funcional da proteína 53BP1 na ativação de vias de oncogênese.

A descoberta de alvos genéticos e proteicos potentes estimulou o desenvolvimento clínico de novas abordagens terapêuticas para tratar pacientes com GB. No entanto, várias dessas abordagens falham em oferecer melhorias no prognóstico dos pacientes. Um dos motivos que justificam o fracasso clínico dessas abordagens pode ser a incapacidade dos vetores convencionais de atingir o local do tumor por meio de tumores altamente disseminados e de atingir alvos oncológicos que estão contribuindo para a resistência do tumor³⁰.

Em meio aos obstáculos da terapia com GB, a barreira hematoencefálica (BBB) e suas estreitas junções celulares capilares restringem a entrega eficaz da droga ao cérebro, contribuindo para a ineficácia da quimioterapia⁸⁻¹². Vários medicamentos não conseguem atingir concentrações terapêuticas no local do tumor, mesmo em concentrações de nível sistêmico tóxico¹³. Portanto, a TMZ ainda está sendo usada como o medicamento quimioterápico padrão por administração oral, uma vez que o uso desse agente alquilante como terapia adjuvante após a cirurgia tem sido amplamente aceito como a opção mais eficaz e bem tolerada^{14,15}.

Para melhorar a eficácia terapêutica da TMZ e diminuir seus efeitos colaterais, como toxicidades hematológicas³¹⁻³⁴, sistemas de entrega de drogas *in situ* (*drug delivery system*; DDS) podem ser administrados para prevenir a recorrência do tumor. Abordagens localizadas e controladas que tratam GB diretamente no local do tumor fornecem uma alternativa para aumentar a eficácia da quimioterapia e reduzir a toxicidade sistêmica³⁵⁻³⁸. Devido à sua biocompatibilidade, os polímeros são um dos recursos mais promissores para o desenvolvimento de DDS³⁹. Vários DDS, como micro e nanosistemas, e wafers foram desenvolvidos para fornecer liberação adequada de drogas no local GB⁴⁰⁻⁴⁷. No entanto, dada a alta pressão intersticial no cérebro, micro e nanopartículas (NP) podem ser facilmente expelidas do local alvo, e essas formulações frequentemente apresentam liberação rápida de drogas carregadas causando neurotoxicidade. Há também limitações relativas a hidrogéis que têm áreas de superfície baixas, resultando na dissolução inadequada e inconsistente da droga⁴⁸.

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com álcool polivinílico (PVA), uma escolha viável para DDS por ser biodegradável e apresentar baixíssima toxicidade^{49,50}. Recentemente, produzimos nanofibras de dacarbazina-PVA para tratar GB, e esta formulação mostrou grandes propriedades mecânicas e de entrega, melhorando a eficácia *in vitro* da dacarbazina⁴⁹.

Dado o papel de Nek1 na DDR e sua expressão aumentada após a exposição a TMZ, com impacto na progressão tumoral, resultando em melhora da resposta a quimioterápicos quando silenciada, este projeto tem como objetivo investigar a proteína Nek1 como alvo no tratamento de glioblastoma, usando duas abordagens principais: (i) investigar o comportamento de duas proteínas, 53BP1 e Mre11, importantes na resposta a danos no DNA, quando a proteína Nek1 está silenciada, buscando entender as vias de sinalização que podem estar alteradas resultando na sensibilidade aumentada das células de GB; (ii) desenvolver e caracterizar microfibras de PVA eletrofiadas (MF) para serem usadas como implantes cerebrais para a liberação controlada de uma co-terapia do inibidor de Nek1 (iNek1) e TMZ. A droga escolhida para ser usada neste projeto é o inibidor de JNK, um inibidor mimético de ATP, que foi previamente descoberto para inibir a atividade de Nek1 em $71,5\% \pm 0,1\%$ a uma concentração de $50 \mu\text{M}$ ⁵¹.

d. Objetivo

d.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é investigar a proteína Nek1 como alvo no tratamento de glioblastoma, usando duas abordagens principais: (i) investigar o comportamento das proteínas Mre11 e 53BP1 na resposta celular a dano ao DNA em linhagem de glioblastoma humano com a proteína Nek1 silenciada e comparar com a linhagem contendo a proteína Nek1 funcional (**parte 1**); (ii) desenvolver e caracterizar microfibras de PVA eletrofiadas (MF) contendo TMZ e o inibidor da proteína Nek1 (iNEK) e investigar o potencial terapêutico destas formulações na modulação negativa do crescimento de gliomas, em modelos *in vitro* e *in vivo* (**parte 2**).

d.2. Metas

d.2.1. Serão metas da parte 1 deste projeto:

- Construir linhagens U87 com a proteína 53BP1 fluorescente, contendo a proteína Nek1 silenciada (U87-NEK1 KO) ou não (U87-WT).

- Avaliar o comportamento por microscopia de fluorescência em tempo real da proteína 53BP1, nas linhagens U87-NEK1 KO e U87-WT, após tratamento com zeocina e TMZ.
- Avaliar o comportamento da proteína Mre11 ao longo de 24 horas de tratamento com TMZ e zeocina, nas linhagens U87- NEK1 KO e U87-WT com a proteína 53BP1 fluorescente.
- Avaliar a formação e reparo de quebras duplas, pela medida de expressão da proteína γ H2AX, ao longo das 24 horas de tratamento com TMZ e zeocina, nas linhagens U87- NEK1 KO e U87-WT com a proteína 53BP1 fluorescente.
- Avaliar a expressão da proteína Nek1 ao longo de 24 horas de tratamento com TMZ e zeocina, na linhagem U87-WT com a proteína 53BP1 fluorescente.
- Propor um mecanismo de resposta aos quimioterápicos envolvendo as proteínas Nek1, Mre11 e 53BP1.

d.2.2. Serão metas da parte 2 deste projeto:

- Desenvolver um nanocarreador de TMZ para ser incorporado nas microfibras.
- Desenvolver formulações do tipo microfibras de PVA, por eletrofiação, contendo TMZ e o iNEK1.
- Avaliar as características destas formulações.
- Determinar a eficiência de encapsulamento de TMZ e iNek1 nestas formulações e avaliar a eficácia de liberação destas drogas.
- Determinar a eficácia destas formulações nas linhagens U87 e C6 após tratamento de 24 horas com as diferentes formulações desenvolvidas neste estudo, pela medida de viabilidade celular e determinação do tipo de morte celular.
- Avaliar a eficácia destas formulações em ratos, após implante de tumor por cirurgia estereotáxica no estriado direito do cérebro, pela medida do tamanho do tumor, após tratamento. Também serão avaliados a quantificação de TMZ no tecido cerebral e parâmetros de toxicidade das formulações nestes animais.

e. Metodologia e estratégias de ação

Serão usadas as seguintes metodologias para o estudo do comportamento das proteínas 53BP1 e Mre11 na ausência de Nek1 (**parte 1**):

Células: nesta etapa será utilizada a linhagem U87, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC), knockout para a proteína Nek1. A linhagem Nek1 knockout (U87 Nek1-KO) foi construída utilizando a metodologia de CRISPR. Brevemente, o plasmídeo PX459 V2.0, expressando a proteína CAS9 e moléculas de RNA guia da proteína Nek1, foi transfectado na linhagem U87. As células silenciadas foram selecionadas pelo fenótipo de resistência à puomicina e, posteriormente, plaqueadas em baixa densidade para produção de colônias, a partir de células únicas. O silenciamento foi confirmado por PCR convencional e western blotting.

Produção das células fluorescentes: as células expressando estavelmente a proteína fluorescente 53BP1 estão sendo produzidas por transdução lentiviral. O plasmídeo Apple-53BP1trunc, expressando a proteína 53BP1 foi adquirido da Adgene. Brevemente, partículas lentivirais do repórter 53BP1trunc-Apple serão produzidas em células Lenti-X 293T (Clontech) seguindo as instruções do fabricante. Uma concentração de 2×10^6 células Lenti-X 293T será semeada em placas e no dia seguinte, as células serão transfectadas com o repórter pLVX 53BP1trunc-Apple usando Xfect (Clontech). Após 6 horas, o meio será alterado para remover os complexos de transfecção. Após 48 horas da transfecção, o meio será coletado e filtrado. As partículas virais serão então concentradas usando o concentrador Lenti-X (Clontech). As células serão semeadas em 50.000 células por placa de 12 poços e no dia seguinte serão transduzidas com partículas lentivirais 53BP1trunc-Apple em meio contendo 4-10 μ g/ml de polibreno. O meio será trocado após 24 horas e as células serão divididas em meio contendo 3 μ g/mL de puomicina para seleção após 48 horas. A expressão do repórter será confirmada por microscopia de fluorescência.

Tratamento: As células serão tratadas com zeocina (25 e 200 µg/mL) e TMZ (100 µM) e avaliadas ao longo das 24 horas, e depois em 48h e 5 dias. Cabe destacar que as concentrações da zeocina e TMZ a serem utilizadas nestes ensaios já estão bem caracterizadas em relação ao fenótipo nas linhagens U87-WT e U87-Nek1 KO e por isso foram escolhidas.

Imagem de células vivas com 53BP1truncada: As linhagens U87-WT e U87-Nek1 KO expressando a proteína 53BP1 truncada serão plaqueadas em uma densidade de 2.000 a 10.000 células por poço (dependendo do número de dias de tratamento com zeocina) em placas de 96 poços para microscopia. Após 24 horas, zeocina (25 e 200 µg/mL) e TMZ (100 µM) serão adicionadas às células. As imagens serão feitas no microscópio In Cell Analyser 2200 (GE Healthcare Life Sciences) equipado com uma objetiva de 40X e uma câmara umidificada 24 horas após a adição de zeocina (bem como 48 horas e 5 dias).

Imagens em células fixadas para análise da proteína Mre11: Para a co-localização com a proteína Mre11 as linhagens U87-WT e U87-Nek1 KO, expressando a proteína 53BP1, após o tratamento por 1, 3, 6, 12 e 24 horas com zeocina (25 e 200 µg/mL) e TMZ (100 µM), serão fixadas com 3,7% de paraformaldeído (v/v) (Merck), permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (v / v) (Merck) em PBS (Thermo Fisher) por 15 min e bloqueadas com 10% de FBS em tampão PBS (v/v) por 1 h. Na próxima etapa, as amostras serão incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo anti-PhosphoMre11 (Thr636), em uma diluição de 1:50 (Merck). Anti-Cy5 antibody (Abcam) a uma diluição de 1:500 será usado como o anticorpo secundário para a coloração de Mre11. As amostras serão colocadas em uma lâmina de vidro e cada lâmina será corada gota a gota com Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific) para visualização dos núcleos das células. As lâminas serão observadas em um sistema de imagem celular (IN Cell Analyzer 2200) e também no microscópio invertido EVOS FL (Thermo Fischer Scientific). Nestas análises também será marcada a proteína γH2AX, um marcador de quebras duplas, utilizando o anticorpo Alexa Fluor 488 Mouse anti-γH2AX (pS-139) (BD Biosciences) em uma diluição de 1:100. Em paralelo, como um controle, na linhagem U87-WT a proteína Nek1 também será marcada com anti-Nek1 (Merck) para acompanhar a dinâmica da presença desta proteína no comportamento das proteínas 53BP1 e Mre11. Anti-Cy5 antibody (Abcam) a uma diluição de 1:500 será usado como o anticorpo secundário para a coloração da Nek1.

Viabilidade celular: A viabilidade celular nestas linhagens U87-WT e U87-Nek1 KO, expressando a proteína 53BP1, será avaliada em paralelo usando a metodologia do vermelho neutro, para confirmação do fenótipo já conhecido. Resumidamente, após o tratamento, as células serão lavadas com 250 µL de PBS antes da adição de 250 µL de corante vermelho neutro (25 µg/mL) dissolvido em meio sem soro e incubado por 3 h a 37 ° C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Depois disso, as células serão lavadas novamente e incubadas 30 min, protegidas da luz, com a solução de desadsorção (ácido acético: etanol: água, 1:50:49). A absorbância será medida a 590 nm no espectrofotômetro SpectraMax i3 Multi-Mode Platform (Molecular Devices). A viabilidade celular será expressa como porcentagem do controle negativo.

Para avaliar a eficácia das formulações contendo TMZ e iNEK1 (**parte 2**) serão usadas as seguintes metodologias:

Preparação de nanocarreadores carregados com temozolomida: Nanocarreadores de ácido esteárico carregados com temozolomida (TMZ NP) serão produzidos pelo método de difusão em solvente de acordo com Hafeez et al.⁵² com pequenas modificações. A TMZ e o ácido esteárico serão suspensos em uma fase orgânica. Em seguida, a fase aquosa será preparada por aquecimento de água destilada (dH₂O) até 70 ° C em agitação contínua. Finalmente, a fase orgânica será vertida e misturada na fase aquosa durante 30 min. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura será sonicada, congelada e liofilizada. Para fins de comparação, os nanocarreadores em branco (NP em branco) serão preparados usando apenas ácido esteárico.

Tamanho de partícula e potencial zeta: As análises de tamanho de partícula e potencial zeta serão realizadas no Beckman Coulter Delsa Nano C (Beckman Coulter, CA, Estados Unidos).

A análise será realizada nas funções de autocorrelação medidas usando o algoritmo de mínimos quadrados não negativos. Para o potencial zeta, a amostra será executada 3 vezes (uma vez que cada corrida é repetida 10 vezes e calculada a média para fornecer o resultado). A voltagem aplicada nos eletrodos da célula será de 60 mV.

Preparação de microfibras: soluções de hidrogel PVA serão produzidas dissolvendo PVA a 10% (p/v) em dH₂O a 90 ° C, sob agitação contínua até sua total solubilização, seguida da adição de etanol (10% v/v). Em seguida, diferentes soluções serão preparadas pela adição de quantidades conhecidas de TMZ ou TMZ e inibidor Nek1 ou TMZ NP ou solução TMZ NP e iNek1, na solução de PVA. As formulações serão submetidas a eletrofiação (Spraybase, Co. Kildare, Irlanda) através de uma agulha de ponta romba de calibre 20, com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/h, uma condutividade de 9 kV e uma distância de 5 cm entre a ponta da agulha e a placa coletora. Para fins de comparação, o Branco MF será preparado usando apenas PVA ou adicionando o Branco NP a uma solução de PVA antes da eletrofiação. Para visualização de fibras fluorescentes, a curcumina (Merck) será utilizada.

Análise de tamanho e morfologia da microfibras: As morfologias das fibras e das partículas serão observadas por meio de microscópio eletrônico de varredura (Tescan Mira XMU SEM, República Tcheca). Para a análise do tamanho da fibra, o software ImageJ (ImageJ 1.53v, National Institute of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos) será usado. Imagens de fluorescência das fibras serão adquiridas usando um microscópio confocal Leica DM 2000 com uma lente de óleo x40 (Leica Microsystems, Ashbourne, Ireland). A aquisição de imagem será obtida usando o software LAS V3.8 (Leica Microsystems, Ashbourne, Irlanda).

NMR de estado sólido: As estabilidades das drogas após o encapsulamento em fibras de PVA ou ácido esteárico NP serão avaliadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). A análise será executada usando um Bruker 400 MHz Avance III HD (Bruker, MA, Estados Unidos) equipado com uma sonda CPMAS H / X de 3,2 mm.

Viscosidade de microfibras (MF): A viscosidade MF será medida por reometria (reômetro Discovery HR-2, TA Instruments, DE, Estados Unidos) pelo método da placa paralela, conforme descrito anteriormente [54].

Determinação da eficiência de encapsulamento de TMZ e iNek1: Para medir a eficiência percentual de encapsulação (EE%) e a quantidade total de TMZ e iNek1 carregados, MF ou NP serão inteiramente dissolvidos em DMSO (Merck) e a quantidade de droga liberada será medida por luz ultravioleta (UV) em um Shimadzu UV 1280 espectrômetro (Shimadzu, Kyoto, Japão) em 328 e 407 nm, respectivamente. As formulações vazias também serão avaliadas.

Estudos de liberação de drogas in vitro: Os estudos de dissolução de drogas foram realizados usando um Distek Model 2500 Dissolution. As amostras serão retiradas em intervalos definidos e medidas por luz ultravioleta em um espectrômetro Shimadzu UV 1280 (Shimadzu). Formulações vazias serão usadas como branco para a leitura do espectrômetro.

Ensaio in vitro: As linhagens celulares C6 e U87, adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro e do banco American Type Culture Collection (ATCC), serão utilizadas para os experimentos. As linhagens serão mantidas conforme condições sugeridas pelo fornecedor. As células serão plaqueadas, tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas e de TMZ (1-100 µM) e inibidor de Nek1 por 24 h.

Viabilidade celular: a viabilidade celular será determinada pelo ensaio de exclusão de Tripán. Após tratamento, 10 uL de suspensão celular será incubado com azul de Tripán na proporção 1:1 e citotoxicidade será determinada pelo sistema Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). O teste será conduzido de acordo com instruções do fabricante. Além disso, a viabilidade será avaliada pelo ensaio de vermelho neutro (VN), conforme descrito anteriormente neste projeto (metodologias da parte 1).

Tipo de morte celular: o tipo de morte será avaliado pela marcação com Anexina V-PE e 7-AAD. Após tratamento, células serão coletadas e incubadas com tampão de ligação, Anexina-PE e 7-AAD, de acordo com recomendações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA).

Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10.000 eventos serão coletados por amostra.

Análise da incorporação das nanopartículas: as células serão submetidas a diferentes tempos de tratamento com a nanopartícula produzida com Rodamina B. Após isso, elas serão fixadas e serão observadas no microscópio de fluorescência (Leica DM2000) no comprimento de onda de 543 nm.

Estudo in vivo: este estudo já foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (número de aprovação: 702/20). Ratos Wistar machos com 60 dias de idade e cerca de 300 g serão obtidos no biotério da UFCSPA e mantidos em laboratório a 22 ± 2 ° C, com água e ração *ad libitum*, e sob fotoperíodo de luz e escuridão de 12h/12h.

Avaliação in vivo: Células de glioma C6 serão cultivadas a aproximadamente 70% de confluência. Após o crescimento 1×10^6 células serão suspensas em 3 µL de DMEM sem FBS. Os animais serão anestesiados com cetamina/xilazina, e a suspensão celular será implantada por cirurgia estereotáxica no estriado direito do cérebro dos ratos a uma profundidade de 6,0 mm (coordenadas em relação ao bregma: 0,5 mm posterior e 3,0 mm lateral). Os animais serão divididos aleatoriamente em cinco grupos com 3 a 8 animais cada: Branco MF (formulação de controle), TMZ MF, TMZ + iNek1 MF, TMZ NP + Branco MF, TMZ NP + iNek1 MF ou intraperitoneal (IP) TMZ (5 mg / kg; uma vez por dia durante cinco dias). Três animais/ grupo de Branco MF, TMZ MF ou TMZ NP + Branco MF serão acompanhados por dois dias (para quantificação de TMZ no cérebro). Os outros animais serão acompanhados até atingirem os critérios de ponto final em até sessenta dias. Todos os animais serão sacrificados por overdose de cetamina e xilazina. Após a eutanásia, o tecido cerebral será rapidamente removido e preservados em solução de formaldeído 3,7% (v / v; pH 7,4) ou lavados em PBS (Thermo Fisher Scientific) e mantidos a -80 ° C. Os tecidos renal e pulmonar serão coletados para avaliação histológica e preservados em solução de formaldeído. Será coletada amostra de sangue da artéria aorta abdominal por punção em tubo de ensaio sem anticoagulantes para obtenção de amostras de soro, seguida de centrifugação imediata a 3000 rpm por 15 min. O soro coletado será preservado a -70 ° C para análise bioquímica.

Análises bioquímicas: Ureia, creatinina, amilase, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamil transferase (GGT), proteína total, lactato e creatina quinase (CK) (Bioclin, MG, Brasil) serão quantificadas em analisador químico BS-120 (Mindray, SP, Brasil).

Extração e quantificação de TMZ do tecido cerebral: A preparação das amostras será baseada em estudos anteriores com pequenas modificações⁵³. Resumidamente, 100 mg de tecido cerebral serão usados para extrair TMZ. O método HPLC-DAD será baseado em estudos anteriores^{54,55} e será realizado em um cromatógrafo Shimadzu Prominence (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma bomba quaternária de mistura de baixa pressão e desgaseificação a vácuo em linha, controlada por um CBM Módulo de interface -20A, um injetor automático (SIL-20A) e detector de arranjo de diodo (SPD-M20A).

Análise estatística: Os dados quantitativos serão expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP) e a análise estatística será obtida pelo teste t não pareado ou ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Curvas de sobrevivência Kaplan-Meier serão geradas para comparar os diferentes grupos de tratamento dos animais (GraphPad Prism 8.0, La Jolla, CA, EUA). O valor de $P < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

e.1. Estratégia de ação

Em relação a etapa 1 deste projeto, cabe destacar que as linhagens U87 Knockout para a proteína Nek1 estão construídas e validadas em termos de fenótipo pelo nosso grupo de pesquisa e a construção das linhagens U87-WT e U87-Nek1 KO com a proteína 53BP1 truncada já está em

andamento. Além disso, a capacidade das proteínas fluorescentes em medir os processos serão validados por metodologias bem estabelecidas de medida destes processos, que já estão em uso nos laboratórios envolvidos neste projeto. No entanto, a inserção no genoma pela transdução lentiviral pode produzir mutagênese insercional. Células serão clonadas e diferentes clones serão comparados para detectar possíveis diferenças entre clones e excluir clones que apresentem uma velocidade de proliferação ou resposta a quimioterápicos diferentes das células não modificadas. Também será realizada uma comparação entre os níveis de indução dos processos a serem estudados nestas células em comparação com métodos tradicionais. A capacidade das proteínas fluorescentes em medir os processos serão validados por metodologias bem estabelecidas de medida destes processos já em uso no laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA e no Laboratório de Sinalização Celular da UFRGS. Uma marcação com o anticorpo anti-53BP1 poderá ser utilizada para comparar os resultados encontrados com a proteína truncada fluorescente, assim como, é possível validarmos os fenômenos celulares observados nesta proposta com o uso de inibidores farmacológicos. Dispomos no laboratório de Genética Toxicológica dos inibidores farmacológicos de Mre11 (Mirim) e de Nek1 (JNK Inhibitor II).

f. Resultados e impactos esperados

Ao longo da história brasileira, o câncer foi visto de diversas formas. De tumor maligno e incurável à neoplasia, de tragédia individual a problema de saúde pública, sua história é marcada pelo incessante esforço da medicina em controlá-lo pela via da prevenção, aliada ao uso das mais modernas tecnologias médicas de tratamento. No entanto, as dificuldades técnicas para a cura de muitas de suas formas, o alto custo das tecnologias empregadas com este objetivo e seu caráter individual mostram-se como limitadores da ação terapêutica, fazendo com que a doença se vincule cada vez mais ao campo da prevenção e da saúde pública. Tumores cerebrais são um grande problema de saúde pública, visto que as estratégias de tratamento (cirurgia, radioterapia e quimioterapia à base de temozolomida) não são eficazes, já que a maioria dos gliomas são cirurgicamente irremovíveis e, quando diagnosticados em estágio avançado, o nível de resistência à quimioterapia convencional aumenta. Além disso, pelo difícil acesso à radioterapia, os gliomas tornam-se um dos cânceres mais difíceis de tratar. Apesar dos recentes desenvolvimentos nestas terapias, atualmente o GBM tem uma sobrevivência média de 14,6 meses a partir do diagnóstico.

Identificar proteínas que possam estar associadas a este tipo tumoral pode ser uma importante ferramenta, especialmente no manejo clínico associado a escolha do tratamento. Nosso grupo de pesquisa vem caracterizando o papel de Nek1 na resposta a tratamentos quimioterápicos em células de glioblastomas, confirmando que esta proteína pode ser um relevante alvo para melhora da resposta a quimioterapia. Entender como o silenciamento desta proteína pode estar influenciando as respostas a danos no DNA tornando as células mais sensíveis aos quimioterápicos poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de glioblastomas. Considerando que as proteínas 53BP1 e Mre11 foram identificadas como parceiras da proteína Nek1, e apresentam um papel relevante no contexto tumoral, a elucidação dos mecanismos celulares de sinalização das moléculas envolvidas neste projeto, agregada a todos os resultados já alcançados até o momento pelo nosso grupo de pesquisa, irá gerar perspectivas sobre novos alvos terapêuticos na etiologia e tratamento do glioblastoma multiforme.

Adicionalmente, com a utilização de uma nova molécula que tem como alvo a proteína Nek1, diminuindo sua atividade cinásica, pretendemos buscar alternativas para o aumento da sobrevida dos pacientes. Apesar do fato de que os implantes cerebrais serem eficazes no controle local do crescimento do tumor, vários efeitos colaterais foram relatados anteriormente, portanto, esta estratégia de tratamento pode ser uma faca de dois gumes devido à chance de edema sintomático grave no cérebro, no entanto, esses efeitos colaterais estão fortemente relacionados a altas concentrações de drogas citotóxicas. Abordagens localizadas e controladas que tratam GB diretamente no local do tumor fornecem uma alternativa para aumentar a eficácia da quimioterapia

e reduzir a toxicidade sistêmica. Devido à sua biocompatibilidade, os polímeros, como o PVA, são um dos recursos mais promissores para o desenvolvimento de DDS. Pretendemos com os resultados deste projeto obter resultados de tratamento bem-sucedidos com a redução da concentração da droga (TMZ) combinada com um inibidor da cinase relacionado ao DDR (iNEK1), usando uma técnica versátil e direta. As formulações de implantes cerebrais produzidas podem ser abordagens promissoras para terapias in situ inovadoras.

Com base no exposto acima, de forma resumida, os seguintes impactos podem ser mencionados:

i. Entendimento do mecanismo de ação associado ao silenciamento da proteína Nek1 na resposta positiva a TMZ e zeocina em células de glioblastoma.

ii. Proposição de novos alvos moleculares, conjuntos a Nek1, para o tratamento de glioblastoma.

iii. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas biocompatíveis com potencial antitumoral.

iv. Utilização de nanoestruturas como forma de aumentar a penetração intracelular de TMZ, bem como prolongar sua liberação.

v. Possibilidade de uma alternativa de tratamento com a inclusão de um inibidor proteico (iNEK1) que traga melhora na sobrevida dos pacientes com glioblastoma.

vi. Diminuição dos efeitos adversos dos tratamentos quimioterápicos convencionais, tendo em vista a diminuição da biodistribuição do fármaco.

vii. Possibilidade de melhora na sobrevida dos pacientes com glioblastoma com o uso dos nanosistemas.

Cabe destacar que a formação de recursos humanos também é contemplada com este projeto, três alunos de doutorado desenvolverão este projeto como parte dos seus trabalhos, assim como um aluno de mestrado. Adicionalmente, um aluno de Iniciação científica participará como colaboradores do projeto.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em revistas da área e em congressos a fim de que o conhecimento gerado com este estudo possa auxiliar outros pesquisadores e clínicos no entendimento deste tipo tumoral extremamente agressivo.

g. Cronograma, riscos e dificuldades

Atividade	1º semestre	2º semestre	3º semestre	4º semestre	5º semestre	6º semestre
Construção das linhagens com a proteína 53BP1 truncada	x					
Microscopia em células vivas		x	x	x		
Microscopia de células fixadas			x	x	x	
Produção e caracterização físico-química dos nanosistemas/microfibras	x					
Análise do efeito do tratamento com nanosistemas sobre o crescimento in vitro dos gliomas		x	x			
Análise do efeito do tratamento com nanosistemas sobre o crescimento in vivo dos gliomas			x	x		

Redação de manuscritos				x	x	x
Elaboração de relatório						x

Este projeto será desenvolvido na UFCSPA (i) no Laboratório de Genética Toxicológica, que dispõe de estrutura para cultivo celular e técnicas de biologia molecular, (ii) na Unidade Bioanalítica da UFCSPA, que dispõe dos microscópios de fluorescência, IN Cell Analyzer 2000, que permite a captação de imagens visível e fluorescente em um meio com temperatura e CO₂ controlado, e o microscópio invertido EVOS FL com fluorescência, assim como FACS Calibur para as análises de citometria de fluxo, e (iii) no Biotério, que dispõe de toda estrutura para a execução das cirurgias estereotáxicas e acompanhamento dos animais, além de possuir maternidade própria com fornecimento dos animais que serão utilizados neste projeto. Adicionalmente, o Laboratório de Sinalização celular da UFRGS, coordenador pelo prof. Gido Lenz, possui uma sala NB2 para transdução viral e está equipado com um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 200 com captação de imagens e um equipamento cytosmart, que permite a aquisição de imagens no visível dentro da incubadora de células. O laboratório do dr. Michael Nugent no *Technological University of the Shannon: Midlands Midwest* (TUS) dispõe de toda estrutura para a produção e caracterização das nanoformulações, incluindo eletrospray Spraybase, microscópio eletrônico de varredura Tescan, microscópio Beckman Coulter Delsa Nano C, microscópio confocal Leica DM 2000, entre outros.

Em relação a parceria com o dr. Michael Nugent do *Athlone Institute of Technology* da Irlanda, destaco que em 2018 iniciei uma colaboração científica com o mesmo e como mencionado acima, parte do projeto aqui apresentado será desenvolvido em conjunto. Atualmente o doutorando Jeferson Henn está no laboratório do dr. Michael, desenvolvendo seu doutorado sanduíche, o qual foi custeado com recursos do CNPq. No ano de 2019, a então mestrand Luiza Steffens fez um mestrado sanduíche de um ano com recursos do Governo Irlandês (GOI Scholar Ship), onde iniciou o desenvolvimento destas formulações a base de PVA. Cabe mencionar que esta parceria já resultou em 3 artigos científicos publicados (doi: 10.1016/j.ejps.2019.105183, doi: 10.1007/s43450-021-00126-9 e doi: 10.1080/00914037.2019.1605606) e 3 capítulos de livros (doi: 10.1016/B978-0-12-820043-8.00001-3 e doi: 10.1016/B978-0-12-817055-7.00019-4, doi: 10.1007/978-981-33-4753-3_7).

Ainda, os pesquisadores e estudantes envolvidos neste projeto possuem experiência em biologia celular e molecular, assim como, no desenvolvimento de novas formulações. Cabe destacar que recentemente publicamos um artigo de revisão, em que são abordados os principais mecanismos de resistência associado às atuais terapias utilizadas no contexto dos GB, os motivos de falha de novas drogas testadas clinicamente, as tecnologias existentes para entrega de drogas e as vias de administração alternativas relevantes no contexto do GB⁵⁶. O objetivo desse artigo foi propor que a associação de sistemas de entrega e rotas alternativas de administração possibilitem novas opções farmacológicas para o tratamento de GB, principalmente com inibidores da resposta a danos no DNA, aumentando a eficiência dessas estratégias clínicas. A construção deste artigo deu maturidade ao nosso grupo para continuidade das pesquisas envolvendo alvos moleculares para o tratamento de GB.

Considerando o exposto acima, não temos risco e dificuldades de execução considerando infraestrutura e pessoal. Entretanto, do ponto de vista científico algumas considerações devem ser feitas, pois podem ocorrer:

- em relação a **parte 1** do projeto, há evidências por experimentos do tipo *high throughput* que a proteína Nek1 interage com as proteínas Mre11 e 53BP1, e pelos resultados de literatura que indicam a participação da proteína Nek1 no eixo de sinalização envolvendo Chk1, Chk2, ATM e ATR, nossa hipótese para o aumento de sensibilidade das linhagens de glioblastoma (encontrados pelo nosso grupo de pesquisa e ainda não publicados), pode envolver uma diminuição da ativação

das proteínas Mre11 e 53BP1. Um risco associado a esta hipótese é não ter alterações na localização/expressão destas proteínas e uma outra via estar sendo afetada. De qualquer maneira, a investigação desta hipótese é válida, na nossa opinião, pois pode trazer informações importantes sobre a mecanística envolvendo alterações na proteína Nek1. Outras limitações que podem ser sanadas estão previstas no **item e.1** deste projeto.

- relativo a **parte 2**, um dos riscos está associado a não especificidade do inibidor de Nek1, considerando que é um inibidor de ATP e pode interagir com outras proteínas. Com o intuito de sanar esta dúvida realizamos uma série de experimentos de docagem molecular deste composto com a proteína Nek1 e verificamos que a energia de ligação deste composto com a proteína Nek1 é muito boa, comparada com outras cinases, incluindo a cinase JNK II, para a qual ele foi demonstrado inicialmente como inibidor. Também já realizamos estudos *in vitro* para determinar a efetividade desta molécula em células de glioblastoma e como isso já determinamos o IC50 do composto, sendo viável pensá-lo como parte de uma estratégia para produção de nano formulações em conjunto com a TMZ. Em relação aos experimentos *in vivo*, a professora Elizandra Braganhol, colaboradora deste projeto, tem larga experiência no implante de tumor, o que nos dá assertividade de que os experimentos serão conduzidos com sucesso.

h. Orçamento

Este projeto terá um custo reduzido de execução, pois alguns itens já foram adquiridos, decorrentes da participação em projetos com colaboradores. Neste sentido, os reagentes e o plasmídeo necessários para expressão da proteína 53BP1 foram adquiridos com recursos do projeto FAPERGS-FAPESP (Processo nº 19/2551-0002277-8), coordenador pelo prof. Guido Lenz. A etapa de preparo e avaliação das formulações será desenvolvido no laboratório do Prof. Michael Nugent no TUS, com custeio do mesmo. A UFCSPA fornecerá os animais para realização dos experimentos *in vivo*.

Entretanto, para que consigamos executar as etapas dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, alguns reagentes serão necessários.

Entendendo que este projeto trará significativo avanço em termos de estratégias para tratamento de glioblastomas, a um baixo custo em função das parcerias previamente estabelecidas, serão necessários os seguintes reagentes:

Material de Consumo	Valor (R\$)
Reagentes e meios de cultura para cultivo celular	R\$ 7.000,00
Material plástico (garrafas de cultura, placas, eppendorfs, ponteiras)	R\$ 5.000,00
Anticorpos primários e secundários	R\$ 9.700.000,00
Drogas quimioterápicas (TMZ, zeocina, iNek1)	R\$ 7.000,00
Kits de reagentes (morte celular, análises bioquímicas, vecta shield)	R\$ 6.300,00
TOTAL DESPESAS DE CUSTEIO	35.000,00

Considerando que a infraestrutura disponível em termos de equipamento da UFCSPA e dos colaboradores deste projeto (UFRGS e TUS) propiciará a execução de todas as etapas previstas neste projeto não está sendo prevista aquisição de material permanente (despesas de capital).

i. Referências bibliográficas

¹Guntuku, L., Naidu, G. M., Yerra, V. G. Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds. *Current Neuropharmacology*. v. 14, n. 6, p. 567-583, 2016.

²Ostrom, Q. T. et al. *Current Understanding and Treatment of Gliomas*. Epidemiology of gliomas. Springer. pp. 1–14, 2015.

- ³Tseng, Y. Y.; Su, C. H.; Yang, S. T.; Huang, Y. C.; Lee, W. H.; Wang, Y. C.; Liu, S. C.; Liu, S. J., Advanced interstitial chemotherapy combined with targeted treatment of malignant glioma in rats by using drug-loaded nanofibrous membranes. *Oncotarget* **2016**, *7* (37), 59902-59916.
- ⁴Brodgelt, A.; Greenberg, D.; Winters, T.; Williams, M.; Vernon, S.; Collins, V. P., Glioblastoma in England: 2007-2011. *Eur J Cancer* **2015**, *51* (4), 533-542.
- ⁵Rape, A.; Ananthanarayanan, B.; Kumar, S., Engineering strategies to mimic the glioblastoma microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, *79-80*, 172-83.
- ⁶Tan, A. C.; Ashley, D. M.; López, G. Y.; Malinzak, M.; Friedman, H. S.; Khasraw, M., Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2020**, *70* (4), 299-312.
- ⁷Ohka, F.; Natsume, A.; Wakabayashi, T. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int*. ID 878425, 2012.
- ⁸Sun, C.; Ding, Y.; Zhou, L.; Shi, D.; Sun, L.; Webster, T. J.; Shen, Y., Noninvasive nanoparticle strategies for brain tumor targeting. *Nanomedicine* **2017**, *13* (8), 2605-2621.
- ⁹Irani, M.; Sadeghi, G. M. M.; Haririan, I., The sustained delivery of temozolomide from electrospun PCL-Diol-b-PU/gold nanocomposite nanofibers to treat glioblastoma tumors. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2017**, *75*, 165-174.
- ¹⁰Wei, X.; Chen, X.; Ying, M.; Lu, W., Brain tumor-targeted drug delivery strategies. *Acta Pharm Sin B* **2014**, *4* (3), 193-201.
- ¹¹Fan, C. H.; Ting, C. Y.; Chang, Y. C.; Wei, K. C.; Liu, H. L.; Yeh, C. K., Drug-loaded bubbles with matched focused ultrasound excitation for concurrent blood-brain barrier opening and brain-tumor drug delivery. *Acta Biomater* **2015**, *15*, 89-101.
- ¹²Park, J.; Aryal, M.; Vykhodtseva, N.; Zhang, Y. Z.; McDannold, N., Evaluation of permeability, doxorubicin delivery, and drug retention in a rat brain tumor model after ultrasound-induced blood-tumor barrier disruption. *J Control Release* **2017**, *250*, 77-85.
- ¹³Tseng, Y. Y.; Wang, Y. C.; Su, C. H.; Yang, T. C.; Chang, T. M.; Kau, Y. C.; Liu, S. J., Concurrent delivery of carmustine, irinotecan, and cisplatin to the cerebral cavity using biodegradable nanofibers: In vitro and in vivo studies. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2015**, *134*, 254-61.
- ¹⁴Denny, B. J.; Wheelhouse, R. T.; Stevens, M. F. G.; Tsang, L. L. H.; Slack, J. A., NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry* **1994**, *33* (31), 9045-9051.
- ¹⁵Akbar, U.; Jones, T.; Winestone, J.; Michael, M.; Shukla, A.; Sun, Y.; Duntsch, C., Delivery of temozolomide to the tumor bed via biodegradable gel matrices in a novel model of intracranial glioma with resection. *J Neurooncol* **2009**, *94* (2), 203-12.
- ¹⁶Zhu, J.; Cai, Y.; Liu, P.; Zhao, W., Frequent Nek1 overexpression in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *476* (4), 522-527.
- ¹⁷Liu, S.; Ho, C. K.; Ouyang, J.; Zou, L., Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (6), 2175-2180.
- ¹⁸Patil, M.; Pabla, N.; Ding, H. F.; Dong, Z., Nek1 interacts with Ku80 to assist chromatin loading of replication factors and S-phase progression. *Cell Cycle* **2013**, *12* (16), 2608-16.
- ¹⁹White, M. C.; Quarumby, L. M., The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol* **2008**, *9*, 29.
- ²⁰Liu, S.; Ho, C. K.; Ouyang, J.; Zou, L., Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (6), 2175-2180.
- ²¹Spies, J.; Waizenegger, A.; Barton, O.; Sürder, M.; Wright, W. D.; Heyer, W. D.; Löbrich, M., Nek1 Regulates Rad54 to Orchestrate Homologous Recombination and Replication Fork Stability. *Mol Cell* **2016**, *62* (6), 903-917.
- ²²Higelin, J.; Catanese, A.; Semelink-Sedlacek, L. L.; Oeztuerk, S.; Lutz, A.-K.; Bausinger, J.; Barbi, G.; Speit, G.; Andersen, P. M.; Ludolph, A. C.; Demestre, M.; Boeckers, T. M., NEK1 loss-of-function mutation induces DNA damage accumulation in ALS patient-derived motoneurons. *Stem Cell Research* **2018**, *30*, 150-162.
- ²³Singh, V.; Jaiswal, P. K.; Ghosh, I.; Koul, H. K.; Yu, X.; De Benedetti, A., Targeting the TLK1/NEK1 DDR axis with Thioridazine suppresses outgrowth of androgen independent prostate tumors. *Int J Cancer* **2019**, *145* (4), 1055-1067.
- ²⁴Singh, V.; Jaiswal, P. K.; Ghosh, I.; Koul, H. K.; Yu, X.; De Benedetti, A., The TLK1-Nek1 axis promotes prostate cancer progression. *Cancer Lett* **2019**, *453*, 131-141.
- ²⁵Singh, V.; Khalil, M. I.; De Benedetti, A., The TLK1/Nek1 axis contributes to mitochondrial integrity and apoptosis prevention via phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle* **2020**, *19* (3), 363-375.
- ²⁶Stracker, T.; Petrini, J. The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 90–103 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrm3047>.
- ²⁷Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008 Mar 7;319(5868):1352-5. doi: 10.1126/science.1140735.
- ²⁸Yuan SS, Hou MF, Hsieh YC, Huang CY, Lee YC, Chen YJ, Lo S. Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Oct 3;104(19):1485-502. doi: 10.1093/jnci/djs355.

- ²⁹Sun, C.; Ding, Y.; Zhou, L.; Shi, D.; Sun, L.; Webster, T. J.; Shen, Y., Noninvasive nanoparticle strategies for brain tumor targeting. *Nanomedicine* **2017**, *13* (8), 2605-2621
- ³⁰Westphal, M.; Lamszus, K., The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* **2011**, *12* (9), 495-508.
- ³¹Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352* (10), 987-96.
- ³²Corsa, P.; Parisi, S.; Raguso, A.; Troiano, M.; Perrone, A.; Cossa, S.; Munafò, T.; Piombino, M.; Spagnoletti, G.; Borgia, F., Temozolomide and radiotherapy as first-line treatment of high-grade gliomas. *Tumori* **2006**, *92* (4), 299-305.
- ³³Mutter, N.; Stupp, R., Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? *Expert Rev Anticancer Ther* **2006**, *6* (8), 1187-204.
- ³⁴Vera, K.; Djafari, L.; Faivre, S.; Guillamo, J. S.; Djazouli, K.; Osorio, M.; Parker, F.; Cioloca, C.; Abdulkarim, B.; Armand, J. P.; Raymond, E., Dose-dense regimen of temozolomide given every other week in patients with primary central nervous system tumors. *Ann Oncol* **2004**, *15* (1), 161-71.
- ³⁵Ranganath, S. H.; Wang, C. H., Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials* **2008**, *29* (20), 2996-3003.
- ³⁶Han, D.; Sasaki, M.; Yoshino, H.; Kofuji, S.; Sasaki, A. T.; Steckl, A. J., In-vitro evaluation of MPA-loaded electrospun coaxial fiber membranes for local treatment of glioblastoma tumor cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2017**, *40*, 45-50.
- ³⁷Kuramitsu, S.; Motomura, K.; Natsume, A.; Wakabayashi, T., Double-edged Sword in the Placement of Carmustine (BCNU) Wafers along the Eloquent Area: A Case Report. *NMC Case Rep J* **2014**, *2* (1), 40-45.
- ³⁸Hirschberg, H., Photo-activated Cancer Therapy: Potential for Treatment of Brain Tumors. In *Optical Methods and Instrumentation in Brain Imaging and Therapy. Bioanalysis (Advanced Materials, Methods, and Devices)*, S., M., Ed. Springer: New York, 2013; Vol. 3.
- ³⁹Bei, D.; Marszalek, J.; Youan, B. B., Formulation of dacarbazine-loaded cubosomes-part I: influence of formulation variables. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10* (3), 1032-9.
- ⁴⁰Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Brannan, A.; Bates, F.; Minko, T.; Discher, D. E., Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J Control Release* **2006**, *116* (2), 150-8.
- ⁴¹Kumar Naraharisetti, P.; Yung Sheng Ong, B.; Wei Xie, J.; Kam Yiu Lee, T.; Wang, C. H.; Sahinidis, N. V., In vivo performance of implantable biodegradable preparations delivering Paclitaxel and Etanidazole for the treatment of glioma. *Biomaterials* **2007**, *28* (5), 886-94.
- ⁴²Hernán Pérez de la Ossa, D.; Lorente, M.; Gil-Alegre, M. E.; Torres, S.; García-Taboada, E.; Aberturas Mdel, R.; Molpeceres, J.; Velasco, G.; Torres-Suárez, A. I., Local delivery of cannabinoid-loaded microparticles inhibits tumor growth in a murine xenograft model of glioblastoma multiforme. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e54795.
- ⁴³Scott, A. W.; Tyler, B. M.; Masi, B. C.; Upadhyay, U. M.; Patta, Y. R.; Grossman, R.; Basaldella, L.; Langer, R. S.; Brem, H.; Cima, M. J., Intracranial microcapsule drug delivery device for the treatment of an experimental gliosarcoma model. *Biomaterials* **2011**, *32* (10), 2532-9.
- ⁴⁴Kim, G. Y.; Tyler, B. M.; Tupper, M. M.; Karp, J. M.; Langer, R. S.; Brem, H.; Cima, M. J., Resorbable polymer microchips releasing BCNU inhibit tumor growth in the rat 9L flank model. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2007**, *123* (2), 172-178.
- ⁴⁵Hua, M. Y.; Liu, H. L.; Yang, H. W.; Chen, P. Y.; Tsai, R. Y.; Huang, C. Y.; Tseng, I. C.; Lyu, L. A.; Ma, C. C.; Tang, H. J.; Yen, T. C.; Wei, K. C., The effectiveness of a magnetic nanoparticle-based delivery system for BCNU in the treatment of gliomas. *Biomaterials* **2011**, *32* (2), 516-27.
- ⁴⁶Ramachandran, R.; Junnuthula, V. R.; Gowd, G. S.; Ashokan, A.; Thomas, J.; Peethambaran, R.; Thomas, A.; Unni, A. K. K.; Panikar, D.; Nair, S. V.; Koyakutty, M., Theranostic 3-Dimensional nano brain-implant for prolonged and localized treatment of recurrent glioma. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 43271.
- ⁴⁷Mangraviti, A.; Gullotti, D.; Tyler, B.; Brem, H., Nanobiotechnology-based delivery strategies: New frontiers in brain tumor targeted therapies. *J Control Release* **2016**, *240*, 443-453.
- ⁴⁸Norouzi, M.; Nazari, B.; Miller, D. W., Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discov Today* **2016**, *21* (11), 1835-1849.
- ⁴⁹Steffens, L.; Morás, A. M.; Arantes, P. R.; Masterson, K.; Cao, Z.; Nugent, M.; Moura, D. J., Electrospun PVA-Dacarbazine nanofibers as a novel nano brain-implant for treatment of glioblastoma: in silico and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *143*, 105183.
- ⁵⁰Reinhardt LS, Henn JG, Morás AM, Sperotto NDM, F MB, Cao Z, Roehe AV, Petry AUS; Nugent M, Moura DJ. Plantago australis Hydroethanolic Extract-Loaded Formulations: Promising Dressings for Wound Healing. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 31:91–101, 2021. Doi: 10.1007/s43450-021-00126-9.
- ⁵¹Moraes, E. C.; Meirelles, G. V.; Honorato, R. V.; de Souza Tde, A.; de Souza, E. E.; Murakami, M. T.; de Oliveira, P. S.; Kobarg, J., Kinase inhibitor profile for human nek1, nek6, and nek7 and analysis of the structural basis for inhibitor specificity. *Molecules* **2015**, *20* (1), 1176-91.

⁵²Hafeez, A.; Kazmi, I., Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1), 16517.

⁵³Khosa, A.; Krishna, K. V.; Saha, R. N.; Dubey, S. K.; Reddi, S., A simplified and sensitive validated RP-HPLC method for determination of temozolomide in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2018**, 41 (10), 692-697.

⁵⁴Gilant, E.; Kaza, M.; Szlagowska, A.; Serafin-Byczak, K.; Rudzki, P. J., Validated HPLC method for determination of temozolomide in human plasma. *Acta Pol Pharm* **2012**, 69 (6), 1347-55.

⁵⁵Michels, L. R.; Fachel, F. N. S.; Azambuja, J. H.; Gelsleichter, N. E.; Braganhol, E.; Teixeira, H. F., HPLC-UV method for temozolomide determination in complex biological matrices: Application for in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Biomed Chromatogr* **2019**, 33 (10), e4615.

⁵⁶Morás AM, Henn JG, Steffens Reinhardt L, Lenz G, Moura DJ. Recent developments in drug delivery strategies for targeting DNA damage response in glioblastoma. *Life Sci.* 2021 Nov 11;287:120128. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120128



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTOXICOS DECORRENTES DA
EXPOSIÇÃO PERI E PÓS-NATAL AO GLIFOSATO EM RATOS WISTAR**

Dora de Athayde Saul

Projeto de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Dallegrave

Co-orientadora: Profa. Dra. Sarah Carobini Werner de Souza Eller Franco de
Oliveira

Porto Alegre

2019

RESUMO

Uma das maiores preocupações globais são os agrotóxicos, devido a sua crescente comercialização no mundo e ao aumento de informações na literatura acerca da sua toxicidade e malefícios tanto para a saúde do ser humano, quanto para o meio ambiente. Dentre estes, destaca-se o glifosato devido a sua ampla utilização na forma de sal de isopropilamina, comercializado principalmente pela Monsanto (Roundup®) atuando em sementes geneticamente modificadas, principalmente em culturas de soja. A toxicidade deste pesticida é relatada na literatura como baixa, no entanto existem evidências acerca da sua toxicidade reprodutiva relacionada a desregulação endócrina, assim como acerca da sua neurotoxicidade devido a alterações no sistema monoaminérgico, alteração de comportamento e correlações com transtornos do desenvolvimento e mentais. Além do mais, apesar de relatada a diferença de toxicidade entre o glifosato e suas formulações comerciais, as causas ainda não são estabelecidas. Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar a neurotoxicidade decorrente da exposição peri e pós-natal ao glifosato em ratos Wistar através de parâmetros comportamentais, neuroquímicos, histopatológicos e imunológicos. Serão utilizadas 48 ratas ao total, separadas em 4 grupos de 12 animais sendo um exposto ao formulado comercial Roundup Original®, outro exposto ao glifosato grau técnico, um grupo controle positivo para transtornos mentais (ácido valpróico) e outro controle negativo (água). As ratas fêmeas serão expostas diariamente a partir do 15º de gestação até o 21º de lactação. Os filhotes serão padronizados em ninhadas de 8 animais por fêmea matriz, e serão avaliadas alterações comportamentais, audiológicas, neuroquímicas, imunológicas e histopatológicas. Dados paramétricos que apresentarem distribuição normal serão comparados por ANOVA (uma via ou medidas repetidas), seguidas do pós teste de Bonferroni; dados não-paramétricas ou sem distribuição normal serão comparados por Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn, considerando uma confiança de 95%.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Agrotóxicos.....	5
1.2. Glifosato	6
1.3. Neurotoxicidade do Glifosato.....	8
1.3.1. Transtornos mentais e do desenvolvimento	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1. Local de realização do projeto	12
3.2. Animais	12
3.3. Protocolo Experimental	13
3.3.1. Escolha da dose	13
3.3.2. Grupos	13
3.3.2.1. Grau técnico (Sal de Isopropilamina de Glifosato)	13
3.3.2.2. Formulado comercial (Roundup Original®).....	14
3.3.2.3. Controle negativo (veículo)	14
3.3.2.4. Controle positivo para transtornos mentais (Ácido Valproico)	14
3.3.3. Delineamento experimental.....	15
3.3.3.1. Recém-nascidos (dia 0)	15
3.3.3.2. Desmame (21 dias).....	15
3.3.3.3. Puberdade (60 dias)	15
3.3.3.4. Idade adulta (90 dias).....	15
3.3.4. Eutanásia	16
3.3.5. Avaliações	17

3.3.5.1. Parâmetros comportamentais.....	17
3.3.5.2. Parâmetros auditivos.....	18
3.3.5.3. Parâmetros histopatológicos.....	18
3.3.5.4. Parâmetros imunológicos	19
3.3.5.5. Parâmetros neuroquímicos.....	19
4. Análise estatística	20
5. Aspectos éticos	20
6. CRONOGRAMA.....	21
7. ORÇAMENTO	22
8. REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agrotóxicos

Uma das maiores preocupações globais são os agrotóxicos, devido a sua crescente comercialização no mundo e ao aumento de informações na literatura acerca da sua toxicidade e malefícios tanto para a saúde do ser humano, quanto para o meio ambiente. A preocupação surge quando a maioria dos pesticidas mundialmente disponíveis ainda possuem componentes tóxicos em sua fórmula, sendo danoso não somente o seu alvo, mas para outros seres vivos também. Ademais, estima-se que a produção de agrotóxicos aumentou levando a mais de 3 milhões de toneladas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990), sendo utilizado principalmente em países como Brasil, China, Estados Unidos e Argentina (FAOSTAT, 2017).

Os agrotóxicos são classificados atualmente de acordo com a FAO como “Qualquer substância ou conjunto de substâncias químicas ou biológicas destinadas a repelir, destruir ou controlar qualquer praga ou regular o crescimento das plantas” (THE INTERNATIONAL CODE OF CONDUCT ON PESTICIDE MANAGEMENT, 2014). Além do mais, estão disponíveis no mercado através de formulações contendo solventes e aditivos em conjunto com o princípio ativo, ou até mesmo junto de compostos com o objetivo de potencializar a ação da substância principal (CECCHINE et al., 2000).

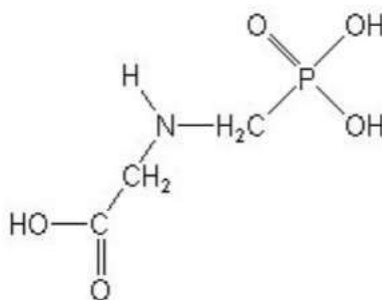
Na última década, a quantidade de publicações correlacionando a exposição aos agrotóxicos a patologias humanas disparou consideravelmente, pois devido a seus mecanismos serem direcionados para seres vivos com organismos totalmente diferentes dos seres humanos, a possibilidade de haver algum malefício para estes era praticamente ignorada (RICHARDSON et al., 2019). Atualmente, devido as pesquisas, já se sabe que podem não só induzir imunotoxicidade e desregulação endócrina assim como atravessam a barreira hematoencefálica causando neurotoxicidade e transtornos de desenvolvimento e mentais como consequência (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017)

1.2. Glifosato

O Glifosato é um herbicida não-seletivo, de ação sistêmica e pós-emergente (ANTONIO J. B. GALLI; MARCELO C. MONTEZUMA, 2005). Pertencente a classe dos organofosfatos e ao grupo químico das glicinas substituídas, ganhou atenção mundial recentemente devido a sua ampla comercialização e utilização em sementes geneticamente modificadas, principalmente em culturas de soja. O uso de glifosato mundialmente chegou a aumentar 15 vezes devido a implantação das sementes geneticamente modificadas pela Monsanto em 1996 (BENBROOK, 2016).

A sua estrutura química (Figura 1) permite que atue como potente inibidor da atividade da 5- enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), levando a catalisação de aminoácidos como tirosina, fenilalanina e triptofano, assim como a inibição da síntese de clorofila, estimulação da produção de etileno, redução da síntese de proteínas e por último, elevação da concentração do IAA (COLE, 1985).

Figura 1: Estrutura química do glifosato



*(ANVISA, 2019)

Atualmente, é encontrado principalmente na formulação de sal de isopropilamina de glifosato, no entanto pode ser encontrado também como sal de potássio de glifosato, sal de amônio de glifosato e sal de dimetilamina. Todas as formulações possuem classificação IV pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) e classificação baixa de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), enquanto a DL50 oral de glifosato puro em ratos é de 4230 mg/Kg e a NOAEL é de 1000 mg/Kg.

Um dos principais fabricantes de formulações com glifosato é a Monsanto, popularmente conhecidas como Roundup®. Originalmente, o Roundup era constituído de 48% (m/v) de sal de isopropilamina de glifosato, já atualmente possuem outros produtos na linha Roundup® com concentrações maiores de glifosato. Além de formulações prontas de glifosato, a Monsanto comercializa também sementes geneticamente modificadas as tornando mais resistentes a aplicação de agrotóxicos e consequentemente permitindo uma maior aplicação de glifosato sem danificar a plantação.

Apesar da baixa toxicidade deste pesticida, tanto o princípio ativo quanto a formulação Roundup® são relatados na literatura acerca dos malefícios para o organismo humano (RICHARDSON et al., 2019). Além do mais, DEFARGE, N. (2018) demonstra em seu estudo que a toxicidade das formulações contendo glifosato é mais alta do glifosato em si, tanto para plantas quanto para células humanas, mesmo que o seu mecanismo de toxicidade ainda não seja bem conhecido.

Outra questão relevante é a toxicidade reprodutiva manifestada em vários ensaios in e in vitro, em que diferentes pesquisadores referem ser este herbicida um provável desregulador endócrino (DALLEGRAVE, 2003; DALLEGRAVE et al., 2007; WALSH et al., 2000). Além de alterações no sistema endócrino, CATTANI et al. (2017) relata estresse oxidativo, disfunção astrocitária e comportamento depressivo.

A exposição ao glifosato pode ocorrer através de diversas formas, seja através de resíduos na alimentação e na água potável, ou através da exposição ocupacional e ambiental, caracterizando um risco para a população em geral (BAI; OGBOURNE, 2016; GILLEZEAU et al., 2019). Atualmente, após reavaliação e considerando estudos internacionais, a ANVISA determinou a IDA (Ingestão Diária Aceitável) do Glifosato como 0,5 mg/kg/dia, e a AOEL (Nível Aceitável de Exposição Ocupacional) como 0,1 mg/kg/dia (ANVISA, 2018). No entanto, ainda não está bem estabelecido o risco de exposição através da dieta,

devido ao aumento de indivíduos portadores de intolerância a lactose assim como de vegetarianos e veganos, classificando um risco principalmente para crianças, gestantes e lactantes, decorrente da ingestão de grandes quantidades de produtos derivados de soja em sua dieta, podendo ultrapassar a ingestão diária aceitável (ANA PAULA B. M. CASTRO et al., 2005; RIZZO; BARONI, 2018).

1.3. Neurotoxicidade do Glifosato

Os mecanismos da neurotoxicidade da exposição ao glifosato ainda não são bem esclarecidos na literatura assim como a sua relação com alterações comportamentais e o desenvolvimento de transtornos do desenvolvimento e mentais. Estudos recentes relacionam mecanismos neuroquímicos com a neurotoxicidade do pesticida descrevendo excitotoxicidade glutamatérgica (CATTANI et al., 2014) assim como decréscimo da atividade da acetilcolinesterase em eritrócitos *in vitro* (KWIATKOWSKA; NOWACKA-KRUKOWSKA; BUKOWSKA, 2014). Ademais, MARTÍNEZ et al. (2018) relatou em seu estudo o decréscimo de serotonina (5-HT), dopamina (DA) e norepinefrina (NE) no sistema nervoso central (CNS), indicando que a exposição ao glifosato induz alterações significativas no sistema monoaminérgico.

1.3.1. Transtornos mentais e de desenvolvimento

Os transtornos ou distúrbios mentais se referem a psicopatologias, alterando o comportamento humano considerado normal. Um transtorno é constituído de um conjunto de sintomas patológicos caracterizando uma síndrome psicológica. Os diagnósticos dos transtornos mentais ou de desenvolvimento é realizado através do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), utilizado por psiquiatras como ferramenta para auxiliar e conduzir o diagnóstico. Atualmente, de acordo com o DSM-IV, são inúmeros os transtornos mentais existentes, sejam de alteração de humor, de ansiedade, de alimentação, de personalidade, de sono, de desenvolvimento psicológico e entre outros.

Destacam-se os transtornos de depressão, ansiedade, espectro autista e esquizofrenia como mais comuns.

Os transtornos mentais e de desenvolvimento podem ser influenciados tanto por fatores genéticos quanto ambientais variando o grau de um para outro. O transtorno de desenvolvimento mais conhecido, o de autismo, tem influência genética em 60%, no entanto os fatores ambientais que colaboram para o desenvolvimento da psicopatologia ainda não é estabelecida (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2019). Transtornos de depressão assim como de ansiedade já foram relatados na literatura com relação a exposição a agrotóxicos (BURNS et al., 2013). Além do mais, não se descarta a hipótese da influência destes agrotóxicos no desenvolvimento do sistema nervoso caracterizando um transtorno de desenvolvimento psicológico, visto que os mecanismos de ação que afetam o sistema nervoso e causam alterações no comportamento humano ainda não são bem conhecidas (LONDON et al., 2012).

As alterações comportamentais devido a exposição a glifosato também são documentadas relatando a indução de ansiedade e alterações locomotoras assim como de memória em ratos adultos (BAIER et al., 2017). Com relação a toxicidade reprodutiva e a neurotoxicidade induzida, o glifosato também tem sido relacionado a transtornos de espectro autista, devido a exposição pré-natal e na infância em áreas rurais com grande aplicação de glifosato (VON EHRENSTEIN et al., 2019). Contudo, apesar de haver informações na literatura acerca dos efeitos neuroquímicos e comportamentais ou da toxicidade reprodutiva do glifosato, ainda faltam evidências acerca destes efeitos em fases críticas do desenvolvimento do sistema nervoso humano e a relação com diagnósticos de transtornos mentais e de desenvolvimento. Ademais, faltam estudos em modelos animais que correlacionem transtornos do desenvolvimento como o de autismo com a exposição a agrotóxicos, descartando a influência de outros fatores ambientais ou genéticos.

Tendo em vista os dados impactantes e crescentes acerca da utilização de glifosato devido à resistência das sementes geneticamente modificadas, é notável que a exposição da população em geral cresça por consequência. Considerando as evidências disponíveis na literatura acerca da neurotoxicidade

do glifosato assim como do seu efeito tóxico no desenvolvimento do ser humano, mesmo que escassas, é possível considerar que a exposição ao pesticida colabore no desdobramento de transtornos do desenvolvimento, afetando a maturação do sistema nervoso e levando a um quadro similar ao de TEA. Além do mais, as diferenças da toxicidade no desenvolvimento sistema nervoso entre o princípio ativo de glifosato e o seu formulado comercial não são relatadas ainda, evidenciando a escassez de informações acerca dos adjuvantes adicionados em suas formulações vendidas comercialmente.

Apesar de existirem informações na literatura que correlacionem a incidência de autismo e a exposição ao glifosato em humanos, estes estudos possuem diversos vieses que poderiam ser excluídos através de um estudo em modelo animal. Portanto, é de interesse avaliar alterações no sistema nervoso através de alterações neuroquímicas e comportamentais devido a exposição pré e perinatal ao padrão de glifosato e seu formulado comercial, assim como correlacionar os achados dos grupos experimentais com os resultados da avaliação de um grupo controle positivo para um quadro similar ao transtorno do espectro autista como método de *screening* para futuras pesquisas acerca do glifosato e a sua influência na incidência dos quadros de autismo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a neurotoxicidade do glifosato através de alterações comportamentais, auditivas, neuroquímicas, imunológicas e histopatológicas, induzidas pela exposição peri e pós-natal ao glifosato em grau técnico e formulado comercial Roundup Original® em ratos Wistar.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a exposição peri e pós-natal ao glifosato comercial Roundup Original®, glifosato técnico na prole de ratas Wistar em diferentes fases do desenvolvimento da prole, por meio de parâmetros:

- Comportamentais (*Open Field*, *Plus Maze* e de interação social) de machos e fêmeas, ao desmame, na puberdade e idade adulta;
- Audiológicos de machos e fêmeas através da avaliação de emissões otoacústicas produto de distorção, nas frequências 2000 a 12000 hz, na puberdade e idade adulta;
- Neuroquímicos em estruturas corticais e subcorticais de machos e fêmeas através de quantificação de neurotransmissores e seus metabólitos em recém-nascidos, ao desmame, na puberdade e na idade adulta;
- Imunológicos (citocinas pró e anti-inflamatórias), na puberdade e idade adulta;
- Histopatológicos de órgãos (fígado e testículos), na puberdade e idade adulta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de realização do projeto

O protocolo experimental com os animais será realizado nas salas de experimentação do biotério, as análises neuroquímicas na Central Analítica, as histopatológicas no Laboratório de Patologia e as imunológicas no Laboratório de Imunologia, todos situados na UFCSPA.

3.2. Animais

No protocolo experimental serão utilizadas 48 ratas (*Rattus norvegicus*) fêmeas Wistar, com 90 dias, pesando aproximadamente 300 ± 50 g, oriundas do biotério da UFCSPA, em dois blocos experimentais de 24 fêmeas cada. Os animais são mantidos em condições controladas de biotério, ciclo claro/escuro de 12h, recebendo ração e água *ad libitum* e acondicionados em caixas grandes de polipropileno, 4 ratas por caixa, até a semana que antecede o parto, onde serão individualizadas e mantidas com suas ninhadas até o desmame.

Serão ainda utilizados 8 ratos machos Wistar para acasalamento com as fêmeas virgens (de ambos os blocos experimentais), distribuídas na proporção de 3 fêmeas por macho, realizado, diariamente, durante 2 horas no final do ciclo escuro do biotério em caixas para tal fim. Após o acasalamento, diariamente será realizado o lavado vaginal para diagnóstico da prenhez (presença de espermatozoides), retornando os animais para suas respectivas caixas.

Ao nascimento, as ninhadas de cada fêmea matriz serão padronizadas em 8 animais (4 machos e 4 fêmeas), sendo separados os animais excedentes e eutanasiados por decapitação, logo após o nascimento tendo seu cérebro removido para análise de neurotransmissores. As proles padronizadas de cada rata serão mantidas junto com as respectivas fêmeas até o desmame (21º dia). Após o desmame, os filhotes serão separados e acomodados em suas caixas de acordo com a sexagem realizada.

3.3. Protocolo Experimental

Os animais (ratas mães) serão alocados em quatro grupos (N=12/grupo): Glifosato Grau Técnico (GT), tratados com 450 mg/kg de glifosato diluído em água; Formulado Comercial Roundup Original® (FC), tratados com 450 mg/kg de Glifosato oriundo do Formulado Comercial; Controle Negativo (CN), tratados com água (10 ml/kg) e Controle Positivo (CP) para indução de transtornos mentais nas ninhadas, tratados com 600 mg/kg de Ácido Valpróico em dose única. O ensaio consistirá em 2 etapas experimentais, utilizando 24 fêmeas prenhes, com posterior padronização das ninhadas em 8 filhotes.

3.3.1. Escolha da dose

DALLEGRAVE et al. (2007) observaram que a exposição pré e pós-natal ao formulado comercial Roundup Original® nas doses de 50 mg/kg, 150 mg/kg e 450 mg/kg do 1º dia de gestação até o 21º da lactação induziram alterações no sistema reprodutivo da prole masculina, sem induzir toxicidade materna. Já CAMARGO (2014) observou em sua tese que a exposição perinatal ao formulado comercial Roundup Transorb® nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 150 mg/kg do 15º dia de gestação até o 7º de lactação, além de não induzir toxicidade materna, também não induziu alterações neurocomportamentais e neuroquímicas nas proles. Devido aos achados acerca da toxicidade do glifosato em estudos relatados e a ausência de neurotoxicidade em doses abaixo de 150 mg/kg decidiu-se utilizar a dose de 450 mg/kg, representado aproximadamente 10% da DL50 (4230 mg/kg) e 50% da NOAEL (1000 mg/kg) a fim de avaliar possíveis alterações no sistema nervoso das proles. Além do mais, o período de exposição ao glifosato escolhido foi do 15º dia de gestação ao 21º dia de lactação, visando abranger somente o período de maturação e diferenciação do cérebro dos ratos.

3.3.2. Grupos

3.3.2.1. Grau técnico (Sal de Isopropilamina de Glifosato)

Os animais serão expostos ao glifosato em grau técnico (Sal de Isopropilamina de Glifosato) na dose de 450 mg/kg através de gavagem. O veículo utilizado para a diluição da substância será água potável. A administração da substância

ocorrerá uma vez ao dia pela manhã, do 15º de gestação até o 21º dia de lactação.

3.3.2.2. Formulado comercial (Roundup Original®)

Os animais serão expostos ao formulado comercial de glifosato (Roundup Original®) na dose de 450 mg/kg através de gavagem. O veículo utilizado para a diluição do composto será água. A administração da substância ocorrerá uma vez ao dia pela manhã, do 15º de gestação até o 21º dia de lactação.

3.3.2.3. Controle negativo (veículo)

Os animais serão tratados com 10 mL/kg de água potável, veículo utilizado nos grupos expostos ao glifosato, através de gavagem. Além do mais, serão submetidos aos mesmos procedimentos realizados nos grupos expostos ao glifosato para efeito de comparação. A administração ocorrerá uma vez ao dia pela manhã, do 15º de gestação até o 21º dia de lactação.

3.3.2.4. Controle positivo para transtornos mentais (Ácido Valproico)

Será utilizado um grupo com prole controle positivo para transtornos mentais para efeito de comparação com os demais grupos expostos ao glifosato. Diversos estudos têm demonstrado forte correlação entre alterações neurológicas e a exposição ao glifosato, inclusive alguns apresentando correlação entre a exposição ao glifosato e transtorno do espectro autista (TEA). Além do mais, o diagnóstico de indivíduos com TEA inclui uma série de alterações de comportamento caracterizando até casos de transtornos mentais de ansiedade, depressão, isolamento social e entre outros. Sendo assim, o presente projeto objetiva utilizar um grupo controle positivo para transtornos mentais e de desenvolvimento para efeito de comparação com os demais grupos expostos ao glifosato afim de buscar estabelecer uma correlação inicial entre estes transtornos e a exposição ao glifosato.

As fêmeas prenhes do grupo serão expostas via intraperitoneal ao Ácido Valproico na dose de 600 mg/kg, o sal será dissolvido em uma solução salina de 0,9% resultando em uma solução de concentração de 250 mg/L. As ratas serão

expostas uma única vez a substância no 12º dia de gestação, a fim de induzir alterações na formação do sistema nervoso da prole constituindo um quadro similar ao TEA (JUNIOR, 2014; SCHLICKMANN; FORTUNATO, 2013).

3.3.3. Delineamento experimental

3.3.3.1. Recém-nascidos (dia 0)

Ao final da gestação, dois filhotes de cada fêmea matriz, de todos os grupos (N=96) serão eutanasiados por decapitação (sob anestesia com isoflurano), para coleta de do cérebro para avaliação neuroquímica. Os demais permanecerão com a mãe até o desmame, aos 21 dias de vida.

3.3.3.2. Desmame (21 dias)

Ao desmame das proles, será realizada a sexagem dos ratos Wistar para serem então separados em suas respectivas caixas de acordo com o sexo. Nesta etapa, será realizada a avaliação comportamental de cada animal e o acompanhamento do comportamento dos filhotes em relação a mãe. Na sequência, serão eutanasiados por decapitação (sob anestesia com isoflurano), mais dois filhotes de cada fêmea matriz de todos os grupo (N=96), para coleta de sangue e órgãos (avaliação imunológica, histológica e neuroquímica). Nesta etapa as fêmeas matrizes serão eutanasiadas e seus demais filhotes separados por sexo. A eutanásia das fêmeas matrizes será realizada mediante sobredosagem anestésica com isoflurano.

3.3.3.3. Puberdade (60 dias)

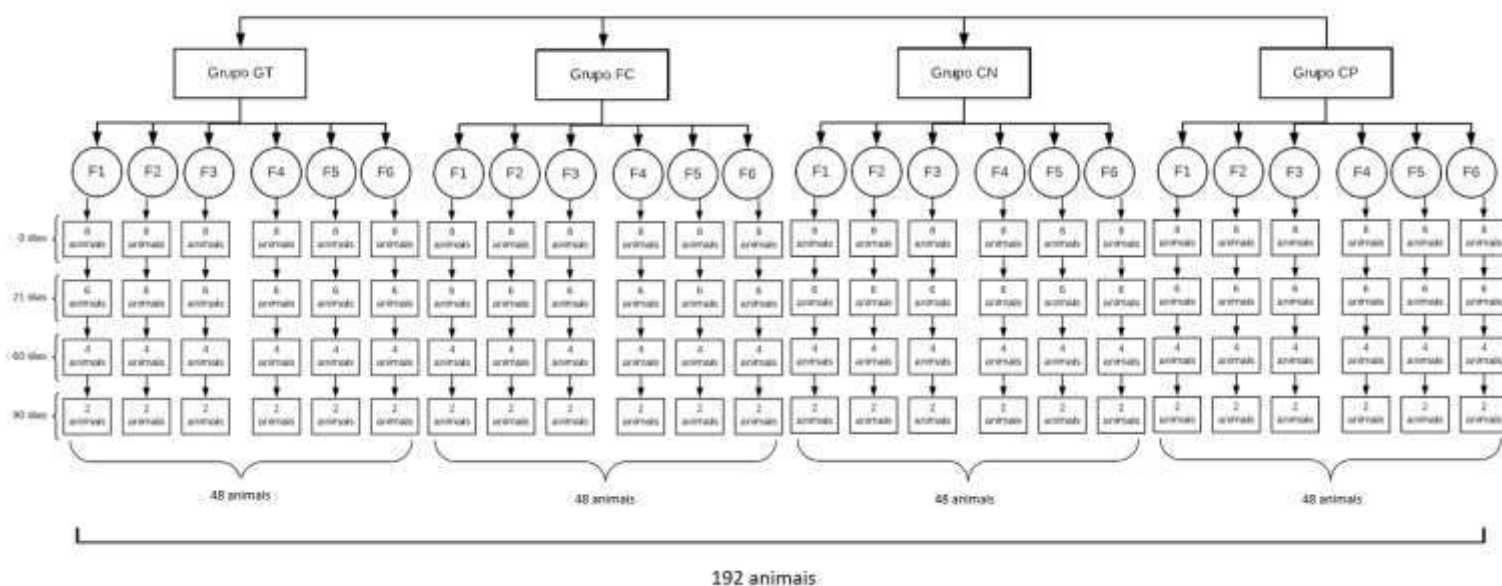
Ao completar 60 dias de vida, na puberdade, será realizada a avaliação auditiva e comportamental de cada animal. Após, será realizada a eutanásia de dois filhotes por fêmea matriz de cada grupo (n=96) para coleta de sangue para avaliação imunológica e remoção de órgãos para análise histopatológica e neuroquímica.

3.3.3.4. Idade adulta (90 dias)

Ao completar 90 dias de vida, na idade adulta, será realizada a avaliação auditiva e comportamental de cada animal. Após, será realizada a eutanásia dos dois

filhotes restantes de cada fêmea matriz por grupo (n=96) para coleta de sangue para avaliação imunológica e remoção de órgãos para análise histopatológica e neuroquímica.

Figura 2: Fluxograma



Fonte: autor

3.3.4. Eutanásia

A eutanásia será realizada com o acompanhamento de um médico veterinário e por um pesquisador experiente. Serão eutanasiados 48 animais (2 de cada fêmea matriz) em cada idade selecionada (0, 21, 60 e 90 dias) e etapa experimental (total de 2 etapas) por decapitação sob anestesia com isoflurano, tendo seu sangue coletado (para avaliação imunológica) e seus órgãos (fígado, coração, encéfalo, rins e pulmões) removidos, mensurados em balança analítica, e destinados a avaliação histopatológica (caso manifestem alterações macroscópicas na necropsia) e análise neuroquímica. O encéfalo será separado em hipotálamo, mesencéfalo, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal, conforme visibilidade devido as idades selecionadas para eutanásia, para comparação dos níveis de transmissores encontrados entre as estruturas.

3.3.5. Avaliações

As fêmeas matrizes e seus filhotes terão a sua massa corporal mensurada semanalmente e tabulada para análise estatística.

3.3.5.1. Parâmetros comportamentais

As avaliações comportamentais serão realizadas a fim de detectar possíveis alterações motoras, sensoriais e de processos associativos no sistema nervoso, assim como de ansiedade e depressão. Os testes comportamentais realizados no estudo serão *Open Field* (Campo aberto) (1) e *Plus Maze* (Labirinto) (2) para avaliação dos seguintes parâmetros:

- Frequência de cruzamentos entre as linhas demarcadas (1);
- Tempo de permanência no quadro central (1);
- Número de *stretchedattendpostures* (1 e 2);
- Número de *rearings* (1 e 2);
- Número e tempo de *grooming* (1 e 2);
- Ocorrência de urinação e/ou defecação (1 e 2);
- Tempo de latência da área central (2);
- Tempo de latência nos braços abertos (2);
- Tempo de latência nos braços fechados (2);
- O primeiro sítio escolhido após o início do teste (braços abertos ou fechados) (2);
- Número total de entradas nos braços abertos e fechados (2);
- Número de entradas nos braços abertos (2);
- Número de entradas nos braços fechados (2);
- Número de *headdippings* (2);
- Número e tempo de *freezing* (2);
- Número e tempo de *grooming* (2);
- Número de quedas do braço aberto (2);

Os testes serão filmados por 10 minutos para posterior análise através de softwares, além do mais, o avaliador será cegado quanto as exposições. Os aparatos serão limpos com álcool 70% após a realização de cada teste para evitar interferência nos resultados.

Será realizada a avaliação de interação social dos ratos também (CAMARGO, 2014), utilizando um aparato de acrílico com 3 compartimentos divididos por portinholas retráteis. O rato teste será colocado no compartimento central para habituação por 10 minutos e em seguida em um dos compartimentos ao lado será colocada uma gaiola com um rato “desconhecido” (animal que não é irmão do rato teste) e no outro lado será colocada uma gaiola sem nenhum animal. Após, será dado o início do teste e serão abertas as portinholas para ser avaliada a interação do rato social por 10 minutos pelos seguintes parâmetros:

- Número de vezes que o rato entra em cada compartimento
- Número de vezes que o rato teste interage com o rato desconhecido
- Tempo em que o rato fica em cada compartimento

3.3.5.2. Parâmetros auditivos

Será realizada avaliação auditiva nos ratos por meio da avaliação das emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD), que avaliam a função coclear desde a espira basal até a espira apical e apresentam grande sensibilidade para detectar lesão das células ciliadas externas. Desta forma, será utilizado o equipamento da marca Interacoustics. Na pesquisa das emissões evocadas por produto de distorção (EOAE-PD) serão utilizados dois tons puros de frequências primárias (F1 e F2). Serão analisadas as respostas nas bandas de frequência de 2000 a 12000 Hz. O critério para considerar presença de resposta será verificação da amplitude de resposta (relação sinal/ ruído) igual ou superior a 6 dB NPS.

3.3.5.3. Parâmetros histopatológicos

Após a decapitação e coleta de sangue, os animais terão seu abdomen incisado e seus órgãos removidos (fígado, rins, pulmões, coração e encéfalo), livres de tecidos adjacentes. A massa dos órgãos será mensurada e relacionada com a massa corporal de cada indivíduo. Todos os órgãos serão inspecionados quanto a possíveis alterações macroscópicas e conservados em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica, quando alterados na necropsia. Após fixação em formol, fatias dos órgãos serão processadas e os blocos de parafina seccionados em fragmentos de 3µm. Os fragmentos serão montados

sobre lâmina, corados com hematoxilina/eosina e observados em microscópio óptico a 40, 100 e 400x.

3.3.5.4. Parâmetros imunológicos

O sangue troncular, será coletado durante a decapitação, com auxílio de funil de vidro acoplado a um tubo com EDTA, centrifugado e o plasma acondicionado em *eppendorf* e congelado a - 20°C. Posteriormente, serão quantificadas as citocinas IL-6 e IL-1 β , além do TNF- α , pelo método de Enzima imunoensaio (ELISA) usando kit comercial, seguindo as recomendações do fabricante (Peprotech, EUA).

3.3.5.5. Parâmetros neuroquímicos

Após eutanásia, as amostras de parte do encéfalo de cada animal serão retiradas, separadas em hipotálamo, mesencéfalo, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal, acondicionadas em frascos de plástico e congeladas a -40° para análise neuroquímica. Para a avaliação dos parâmetros neuroquímicos será realizada a quantificação de neurotransmissores como dopamina (DA), serotonina (5-HT), noraepinefrina (NE), ácido gama-aminobutírico (GABA) e acetilcolina (ACh), assim como seus metabólitos. Como método de análise será utilizada cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-HRMS).

As amostras serão submetidas a uma etapa pré-analítica que consistirá na homogeneização de 50 mg de amostra em 500 μ L de água mili-Q , sob banho de gelo. Uma alíquota de 100 μ L do homogenato será utilizada para a análise dos neurotransmissores, com a adição de 380 μ L da mistura de solventes (75% acetonitrila e 25% acetona) e 20 μ L de padrão interno dopamina- d_4 . As amostras serão homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 15 min a 15.000 rpm. Em seguida, alíquotas de 450 μ L serão secas sob fluxo de ar, ressuspensas em 30 μ L de água ultrapura e alíquotas de 20 μ L serão injetadas no sistema analítico.

As análises serão realizadas com ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo, a partir de parâmetros de ionização pré-definidos e conduzidas através de um método proposto e validado *in house* na Central Analítica da UFCSPA. O

método desenvolvido foi validado previamente conforme o guia *Guideline on bioanalytical method validation* (EMA, 2011).

4. Análise estatística

Os dados serão apresentados como média e erro padrão da média e a comparação entre os grupos será realizada por análise de variância de uma via para variáveis paramétricas (massa corporal relativa, massa relativa dos órgãos) que apresentarem distribuição normal, seguida do pós-teste de Bonferroni e o teste Kruskal Wallis, para as variáveis não paramétricas (escores de lesões histopatológicas) ou para as que não apresentarem distribuição normal. Será considerada uma confiança de 95%.

5. Aspectos éticos

O tamanho da amostra respeita o preconizado para os referidos ensaios (OECD 421) e todos os procedimentos serão realizados de acordo com a legislação vigente no Brasil, Lei 11.794/08, chamada Lei Arouca, regulamentada em 8/10/2008, Portaria 1250/2009 de 07 de outubro de 2009 e com as normas do Código de Ética da Medicina Veterinária, de 2002 (Resolução 722). A pesquisadora responsável pelos ensaios *in vivo* é a Médica Veterinária Eliane Dallegrave, que executará os procedimentos eutanásia dos animais. Após eutanásia, as carcaças serão acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e encaminhados para a câmara fria do Biotério da UFCSPA, para posterior encaminhamento à empresa *Ambientus*.

Quanto aos procedimentos relacionados à execução das técnicas propostas no projeto, serão obedecidos os cuidados pertinentes à adequada manipulação do material utilizado, seringas, agulhas e drogas, constando também, do uso de luvas durante o manuseio dos animais. O material perfuro-cortante será acondicionado em caixas para descarte especial (tipo Descarpac®).

6. CRONOGRAMA

2021	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Aquisição dos Materiais								X	X	X	X	X
Solicitação dos Animais											X	
2022	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
1º Bloco Experimental		X	X	X	X	X	X					
Análise dos dados					X	X	X	X				
Análise neuroquímica, imunológica e histopatológica					X	X	X	X				
Escrita do artigo						X	X	X	X	X	X	X
2023	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
2º Bloco Experimental		X	X	X	X	X	X					
Análise dos dados					X	X	X	X				
Análise neuroquímica, imunológica e histopatológica					X	X	X	X				
Escrita do artigo					X	X	X	X	X	X	X	X

7. ORÇAMENTO

Todos os equipamentos necessários ao desenvolvimento do projeto encontram-se disponíveis na instituição e acessíveis ao grupo de pesquisa. Os materiais de custeio serão obtidos por meio de financiamento próprio do pesquisador e por meio de doações recebidas pelo laboratório do grupo de pesquisa.

Material	Custo previsto (R\$)
Sal de isopropilamina de Glifosato	115,00
Roundup Original ®	95,00
Padrões analíticos	3000,00
Valprato de Sódio Injetável	
Solventes e reagentes	600,00
Materiais para coleta de órgãos e sangue	150,00
Materiais para histologia	250,00
Materiais para imunologia	500,00
Insumos para laboratório	1610,59
TOTAL	6.320,59

Fonte de Financiamento: serão utilizados recursos próprios do pesquisador e dos parceiros do grupo de pesquisa, verbas institucionais (PROAP), bem como o projeto será ser submetido a editais de agências de fomento.

8. REFERÊNCIAS

ANA PAULA B. M. CASTRO et al. Evolução clínica e laboratorial de crianças com alergia a leite de vaca e ingestão de bebida à base de soja. **Revista Paulista de Pediatria**, [s. l.], v. 23, p. 27–34, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=406038909006>>. Acesso em: 3 fev.

2020.

ANTONIO J. B. GALLI; MARCELO C. MONT SCHLICKMANN, Eloise; FORTUNATO, Jucélia Jeremias. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão The use of valproic acid for the induction of animal models of autism: a review. [S. l.], 2013. EZUMA. **ALGUNS ASPECTOS DA UTILIZAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO NA AGRICULTURA 1.** [s.l: s.n.].

ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 23/2018/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+técnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>>. Acesso em: 3 fev. 2020.

ANVISA. **ÍNDICE MONOGRAFICO NOME G01 GLIFOSATO G01-Glifosato.** [s.l: s.n.].

BAI, Shahla Hosseini; OGBOURNE, Steven M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 19, p. 18988–19001, 2016.

BAIER, Carlos Javier et al. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 64, p. 63–72, 2017.

BENBROOK, Charles M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 3, 2016. Disponível em: <<http://www.enveurope.com/content/28/1/3>>. Acesso em: 23 nov. 2019.

BURNS, Carol J. et al. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: Review of the epidemiologic and animal studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 3–4, p. 127–183, 2013.

CAMARGO, Esther Lopes Ricci Adari. **Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o**

desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta. 2014. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-15102014-103238/>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

CATTANI, Daiane et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, [s. l.], v. 320, n. 1, p. 34–45, 2014.

CATTANI, Daiane et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, [s. l.], v. 387, p. 67–80, 2017.

CECCHINE, Gary et al. A Review of the Scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illnesses: Volume 8: Pesticides. [s. l.], 2000.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate--a literature analysis. **Herbicide glyphosate / edited by E. Grossbard, D. Atkinson**, [s. l.], 1985.

DALLEGRAVE, Eliane. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup em ratos Wistar. [s. l.], 2003.

DALLEGRAVE, Eliane et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 81, n. 9, p. 665–673, 2007.

DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**, [s. l.], v. 5, p. 156–163, 2018.

FAOSTAT. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

GILLEZEAU, Christina et al. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. **Environmental Health**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 2, 2019. Disponível em: <<https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12940-018-0435-5>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

JUNIOR, Victorio Bambini. **Modelo Animal De Transtorno Do Espectro Do**

Autismo Induzido Por Exposição Pré-Natal Ao Ácido Valpróico: Estudos Comportamentais, Avaliações Moleculares E Estratégias Preventivas. 2014. [s. l.], 2014.

KWIATKOWSKA, Marta; NOWACKA-KRUKOWSKA, Hanna; BUKOWSKA, Bozena. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 1101–1108, 2014.

LONDON, Leslie et al. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 887–896, 2012.

MARTÍNEZ, María Aránzazu et al. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, [s. l.], v. 161, p. 212–219, 2018.

MOSTAFALOU, Sara; ABDOLLAHI, Mohammad. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 549–599, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00204-016-1849-x>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

OECD. **Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test.** [s.l.] : OECD, 2016. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-421-reproduction-developmental-toxicity-screening-test_9789264264380-en>. Acesso em: 19 nov. 2019.

RICHARDSON, Jason R. et al. **Neurotoxicity of pesticides** *Acta Neuropathologica* Springer Verlag, , 2019.

RIZZO, Gianluca; BARONI, Luciana. **Soy, soy foods and their role in vegetarian diets** *Nutrients* MDPI AG, , 2018.

SCHLICKMANN, Eloise; FORTUNATO, Jucélia Jeremias. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão The use of valproic acid for the induction of animal models of autism: a review. [s. l.], 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Transtorno do Espectro do Autismo.** [s.l: s.n.].

The International Code of Conduct on Pesticide Management. . ROME.

Disponível em:

<http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/CODE_2014Sep_ENG.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2019.

VON EHRENSTEIN, Ondine S. et al. Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: Population based case-control study. **BMJ (Online)**, [s. l.], v. 364, 2019.

WALSH, Lance P. et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. PUBLIC HEALTH IMPACT OF PESTICIDES USED IN AGRICULTURE. In: 1990, GENEVA. **Anais...** GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39772/9241561394.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 29 jul. 2018.

I - Identificação do Projeto

Título:	Resposta morfológica aguda ao uso de decanoato de nandrolona associado ao treinamento de força e treinamento aeróbico em ratos wistar com doença hepática gordurosa não-alcoólica
Palavras-chave:	EHNA, DHGNA, decanoato de nandrolona, treinamento, dieta.
Resumo:	A doença hepática gordurosa não alcoólica é um distúrbio multifatorial complexo que envolve uma série de fatores genéticos, metabólicos e ambientais. A doença está intimamente associada à resistência à insulina, síndrome metabólica, obesidade, diabetes e a muitas outras afecções. A pior evolução da doença correlaciona-se com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Os índices de mortalidade em pacientes com esteatoepatite (NASH) são maiores do que na população normal. É crucial examinar a progressão da doença e os fatores que determinam a evolução de DHNA para esteato-hepatite gordurosa não alcoólica, fibrose e cirrose. Embora a fibrose pareça estar associada à progressão natural da doença hepática gordurosa não alcoólica ao longo do tempo, os pacientes podem permanecer estáveis por vários anos, estabelecendo uma janela potencial para intervenção. Não há, até o presente momento, uma terapia medicamentosa segura, eficaz e específica para doença hepática gordurosa não alcoólica. Assim, o objetivo desse estudo é avaliar as respostas agudas da utilização de decanoato de nandrolona associado ao treinamento de força, ao treinamento aeróbico e a diferentes dietas na doença hepática gordurosa não alcoólica. Para isso será realizado um estudo experimental controlado, em ratos wistar machos portadores de doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) induzida. O estudo é estruturado por duas etapas, sendo a Fase I o período de indução da doença hepática, através da dieta de indução de esteatose hepática não-alcoólica (EHNA), e a Fase II como método de intervenção e controle. Configurou-se 18 grupos divididos por dieta (normal, hipercalórica e hiperproteica), estilo de vida (sedentários, treinamento de força e treinamento aeróbico) e utilização ou não de decanoato de nandrolona (DECA). Serão coletadas amostras de sangue em três momentos do estudo, para comparações de marcadores bioquímicos, citocinas anti e pró-inflamatórias e, após a eutanásia, serão colhidos materiais biológicos para análise histoquímica de tecido muscular, tecido ósseo, órgãos e glândulas. Também será avaliado o nível de segurança para a utilização desse esteroide anabólico em sua região de absorção e síntese.

II - Dados do proponente e equipe

Proponente:	Prof ^a . Dra. Fernanda Bordignon Nunes Dep. de Ciências Básicas da Saúde e PPG em Patologia UFCSPA fernandabn@ufcspa.edu.br
Colaborador:	Prof ^a . Dra. Gisele Branchini Dep. PPG em Patologia UFCSPA giseleb@ufcspa.edu.br
Colaborador:	André Ferreira D'Avila Aluno do PPG em Patologia UFCSPA andreavila@ufcspa.edu.br
Colaborador:	Anderson Velasques Catarina Aluno do PPG em Patologia UFCSPA anderson.catarina@acad.pucrs.br

III - Caracterização da proposta

As causas que dão origem a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) são classificadas como multifatoriais, envolvendo fatores ambientais, genéticos, eventos extra e intra-hepáticos, assim como comorbidades comumente associadas à DHGNA (obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia etc.) e riscos cardiovasculares. Outra evidência diz respeito a inatividade física, que apresenta associação significativa com a presença da esteatose. O espectro da DHGNA compreende a esteatose simples, podendo avançar para a esteato hepatite não alcoólica (EHNA), caracterizada pela presença de inflamação e balonização dos hepatócitos, sendo essa condição um fator de risco para o desenvolvimento de cirrose e/ou carcinoma hepatocelular (CHC) (Chalasani et al., 2018; Marchesini et al., 2016). Estudos epidemiológicos têm revelado que a DHGNA é um problema de saúde pública, acometendo 20-40% dos indivíduos testados na dependência da prevalência da obesidade na população estudada. Por se tratar de uma epidemia mundial (Arab et al., 2016; Pablo et al., 2018; Younossi et al., 2016), é imprescindível a busca por modelos alternativos de intervenção, com a finalidade de diminuir o processo inflamatório e melhorar as funções dos tecidos hepáticos, inibindo assim os riscos intercorrentes. O objetivo desse estudo experimental é associar a administração de decanoato de nandrolona ao treinamento de força, treinamento aeróbico e dietas específicas em animais com DHGNA. O decanoato de nandrolona é recomendado e prescrito para o tratamento de imunodeficiência humana, anemia e afins com o objetivo de potencializar o ganho de massa muscular (Andreato et al., 2013). Assim, nossa hipótese é de que o ganho de massa muscular, aumente o gasto energético, diminua as reservas lipídicas, reduza os níveis de triglicerídeos dos hepatócitos, o processo inflamatório no fígado e demais variáveis bioquímicas características da DHGNA. Também será avaliado o nível

de segurança para a utilização desse esteroide anabólico em sua região de absorção e síntese. Além disso espera-se aumentar o condicionamento físico, cardíaco e respiratório dos animais.

IV - Justificativa

A DHGNA é uma doença silenciosa, bastante prevalente, associada a fatores metabólicos e com um crescente número de casos de cirrose e câncer hepático sendo relatados. A mortalidade por hepatopatia é a terceira causa mortis entre pacientes com DHNA, comparada à décima causa na população geral. Atualmente, cerca de um bilhão de pessoas são afetadas pela doença em todo o mundo. Não pode ser considerada uma doença apenas prevalente em países ocidentais ricos, pois elevadas taxas da doença são relatadas no Oriente Médio (32%) e na América do Sul (31%) seguidas pela Ásia (27%). A prevalência nos EUA é estimada em 24%, na Europa em 23%, e são relatadas taxas de 14% na África. Em consonância com o aumento mundial da prevalência de seus fatores de risco principais, como diabetes, obesidade e idade, ocorre o aumento na prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica. Dessa forma, os últimos estudos mostram prevalência global desse distúrbio estimada em cerca de 25% (de Silva et al, 2015). Além de causar graves danos à saúde, reduz consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. A DHGNA demanda altos valores de recursos financeiros para seu tratamento, acarretando gastos para o sistema de saúde pública. Os pacientes com DHGNA tem mais internações por ano, aumentando o custo de saúde, também é fato que os pacientes requerem mais consultas extra-hospitalares, aumentando ainda mais o custo. Portanto, além de prejudicar a saúde dos pacientes, a DHGNA também aumenta consideravelmente o custo de atendimento, principalmente em fase de cirrose. Atualmente o tratamento da DHGNA é limitado em seu estágio inicial de esteatose ou esteato hepatite, com recomendações de mudanças hábitos, reestruturação alimentar, atividade física e uso de medicamentos. Estágios graves, como a cirrose, não possuem alternativas de intervenção além do transplante hepático. Sendo assim, justifica-se estudos de intervenção precoce que buscam inibir o processo inflamatório e restabelecer funções hepáticas dos acometidos por DHGNA. O decanoato de nandrolona, considerando o seu uso terapêutico, proporciona o aumento de massa magra corporal, aumento de massa óssea, aumento de produção de glóbulos vermelhos, além de auxiliar na reconstituição tecidual (Andreato et al. 2013; Neto 2000). A associação desse esteróide com o treinamento específico tende a aumentar as capacidades biomotoras do indivíduo, conforme as valências estimuladas e rotas metabólicas da especificidade do treinamento, visando o aumento de força, resistência aeróbica, resistência cardiovascular e ganhos na funcionalidade motora (Cunha et al. 2004; Neto 2000). Para que o decanoato de nandrolona possa ser utilizado, associado ao treinamento físico e dietas, como um meio de intervenção de modo seguro para a DHGNA, se fazem necessários estudos experimentais para observar seus efeitos no músculo esquelético, no músculo cardíaco e nas vísceras, relacionando as respostas sistêmicas com as vias metabólicas estimuladas e a ingestão alimentar.

IV - Objetivos

Objetivos gerais:

Avaliar as respostas agudas da utilização de decanoato de nandrolona associado ao treinamento de força, ao treinamento aeróbico e a diferentes dietas na doença hepática gordurosa não alcoólica.

Objetivos específicos

Verificar a resposta do uso de decanoato de nandrolona em modelos de ratos Wistar com doença hepática gordurosa não alcoólica, em associação ao treinamento de força e treinamento aeróbico, avaliando os seguintes parâmetros:

- ganho de massa magra;
- qualidade da massa magra através da avaliação de estrutura e volume das fibras musculares com menor percentual de gordura.
- alterações de força muscular;
- a quantidade de tecido adiposo periférico;
- quantidade de tecido adiposo visceral;
- alterações de produção de lactato;
- nível de lesão hepática entre os grupos;
- níveis de ALT, AST, hemoglobinas, plaquetas, bilirrubina e albumina;
- níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF alfa, TGF Beta) entre os grupos.

V - Metodologia da proposta

O presente trabalho será realizado como um estudo experimental controlado, utilizando ratos *Wistar* machos submetidos a um protocolo para desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), avaliando os efeitos relacionados à dieta específica de cada grupo e as alterações proporcionadas pelo sedentarismo, estilos de treinamento e pela utilização de decanoato de nandrolona.

Este estudo está associado ao protocolo 264/19, com o **status de aprovado** pelo parecer 770/20 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

O estudo será fracionado em duas fases, denominadas como Fase I e Fase II. Na **Fase I** será instaurada a DHGNA nos animais através da dieta de indução de esteatose hepática não-alcoólica (EHNA). Na **Fase II** os animais serão divididos em grupos, receberão dieta específica e treinamento físico conforme o grupo pertencente.

O estudo experimental controlado utilizará ratos *Wistar*, machos, pesando entre 210 e 260 gramas, com idade aproximada de 8-9 semanas para a **Fase I**, com a finalidade de instauração da DHGNA. Os mesmos animais da **Fase II** serão submetidos aos protocolos de treinamento, alteração de dieta e administração de *decanoato de nandrolona*, conforme os grupos sorteados.

Os animais adultos jovens serão distribuídos em gaiolas com até 3 indivíduos, com forração de maravalha utilizada e fornecida pelo biotério da UFCSPA, estarão em ambiente climatizado a 25°C, sujeitos a um ciclo de 12 horas claro/escuro, inatividade

física durante toda a **Fase I**, e, treinamento ou inatividade física na **Fase II** conforme o grupo.

O tamanho da amostra foi definido a partir da quantidade de animais utilizados nos estudos de experimentação de Tamaki et al. (1992), Andreato et al. (2013), Stefano et al. (2015) e Henkel et al. (2019), configurando um total de 40 ratos *Wistar machos* pesando entre 210 e 260 gramas, com idade aproximada de 8-9 semanas para experimentos *in vivo*.

A dieta dos animais é ofertada conforme a **Fase** em que os modelos animais se encontram, assim como ao grupo ao qual pertencem. Durante a **Fase I**, todos os animais receberão **dieta de indução de EHNA** (explicitada abaixo) até a 7ª semana do experimento. Esta será alterada na **Fase II**, de modo que os animais receberão oferta nutricional de acordo com o grupo ao qual o animal pertence (explicitadas abaixo). A alimentação será compatível com o recomendado pelo Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, ofertando-se 15g por dia de ração (Neves et al., 2013).

Durante a **Fase I**, todos os animais receberão a dieta de indução da EHNA, proposta por Janin Henkel et al. (2019) que mimetiza a ingestão alimentar contemporânea, composta por altos níveis calóricos e baixa qualidade nutricional. A dieta de indução da EHNA que será ofertada para os animais contará com a mistura de óleo de soja e wafer, complementada com 15g de dieta padrão e 15g de açúcar refinado administrado na hidratação diária, similar à dieta de indução de EHNA apresentada no estudo de Henkel et al. (2019). A composição da dieta de indução da EHNA compreende em seus 15g de ração padrão, 15g de wafer e 3mL de óleo de soja: 17,4g de carboidrato, 3,9g de proteína, 7,42g de gorduras totais, 2,86g de gordura saturada, 0,75g de fibra alimentar, 53,25mg de sódio e 159,47Kcal por porção ofertada. O açúcar ofertado de modo livre na água disponibilizada compreende um acréscimo de 14,93g de carboidrato e 59,7Kcal. A quantificação dos valores nutricionais da dieta foi baseada nas informações descritas nos rótulos dos produtos.

Na **Fase II**, os animais adultos jovens terão sua alimentação alterada para a dieta hiperproteica ou para dieta padrão, bem como treinamento específico de força, aeróbico ou mantidos em sedentarismo, dependendo do grupo a qual participarão. A administração de *decanoato de nandrolona* ocorrerá conforme o grupo pertencente. As dietas da **Fase II** serão ofertadas conforme o grupo a que os animais pertencerem, sendo ofertada a **dieta padrão**, composta por 25g ração *Nuvilab CR-1*; e a **dieta hiperproteica**, composta por 15g de ração diária da marca *Nuvilab CR-1*, acrescidos 5g de suplementação hiperproteica (100% Whey Protein 1kg - Wedy Nutrition no sabor chocolate), contendo: carboidratos 0,37g; proteínas 3,62g; gorduras totais 0,27g; gorduras saturadas 0,12g; fibra alimentar 0,26g; sódio 10,37mg; cálcio 17,37mg; fósforo 16,62mg; magnésio 3mg; ferro 0,042mg; potássio 23,25mg; L-ácido gaspártico 0,35g; L-ácido glutâmico 0,53g; L-alanina 0,16g; L-arginina 0,07g; L-cistina 0,06g; L-fenilalanina 0,1g; L-glicina 0,06g; L-isoleucina 0,22g; L-leucina 0,33g; L-lisina 0,3g; L-metionina 0,06g; L-prolina 0,2125g; L-serina 0,13g; L-tirosina 0,08g; L-treonina 0,25g; L-triptofano 0,06g; L-valina 0,21g. Os laudos da suplementação serão emitidos por Ricardo da Silva Wedy Suplementos Alimentares EIRELI – ISO NUTRI INDÚSTRIA DE ALIMENTOS – CNPJ 089.660.74/0002-70, e todos os animais terão livre acesso à água. O **esteroide anabólico** utilizado será o decanoato de nandrolona, comercializado no

Brasil com o nome de Deca-Durabolin (DECA), pela Schering-Plough Indústria Farmacêutica (Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda, 2013).

A formação dos grupos ocorrerá de modo aleatório, dividindo os animais em 5 grupos, categorizados como: **G1)** Grupo controle, **G2)** Grupo com treinamento de força e dieta hiperproteica, **G3)** Grupo com treinamento aeróbico e dieta hiperproteica, **G4)** Grupo com treinamento de força, dieta hiperproteica e decanoato de nandrolona, e **G5)** Grupo com treinamento aeróbico, dieta hiperproteica e decanoato de nandrolona, conforme o Quadro 1. Os animais do grupo G4 e G5 receberão duas aplicações semanais via intramuscular do esteroide *decanoato de nandrolona* (DECA), administrado na dose de $5\text{mg kg}^{-1}\text{semana}^{-1}$, durante o período de 6 semanas, adaptado do estudo de Andreato et al. (2013).

Quadro 1. Fase II – Grupos de Ratos Wistar com DHGNA, treinamento e de dieta.

Grupo	Período	Dieta	Inóculo	Treinamento	N
G1	1ª à 6ª semana da Fase II	Dieta de indução de EHNA + 15g de açúcar na hidratação diária	x	Não	8
G2	1ª à 6ª semana da Fase II	Hiperproteica	x	Sim, treino de força	8
G3	1ª à 6ª semana da Fase II	Hiperproteica	x	Sim, treino aeróbico	8
G4	1ª à 6ª semana da Fase II	Hiperproteica	Decanoato de Nandrolona $5\text{mg kg}^{-1}\text{semana}^{-1}/\times 2$ semana	Sim, treino de força	8
G5	1ª à 6ª semana da Fase II	Hiperproteica	Decanoato de Nandrolona $5\text{mg kg}^{-1}\text{semana}^{-1}/\times 2$ semana	Sim, treino aeróbico	8
Total de animais					40

O protocolo do treinamento de força será uma adaptação proposta por Andreato et al. (2013), sendo executado 3 vezes na semana em dias não consecutivos, com três séries de 10 repetições, simulando o exercício de agachamento para os humanos. Os intervalos entre as repetições foram padronizados com dois segundos de duração, sendo utilizado como estímulo para o movimento um impulso elétrico de 10V durante 0,3 segundos de estímulo. O tempo adotado entre as séries foi de dois minutos, conforme o estudo de Tamaki et al. (1992). A ênfase deste exercício é proporcionar

contrações musculares nos seguimentos posteriores dos animais, tanto da parte anterior quanto posterior de cada seguimento (Evans, 2007), conforme a Figura 1.

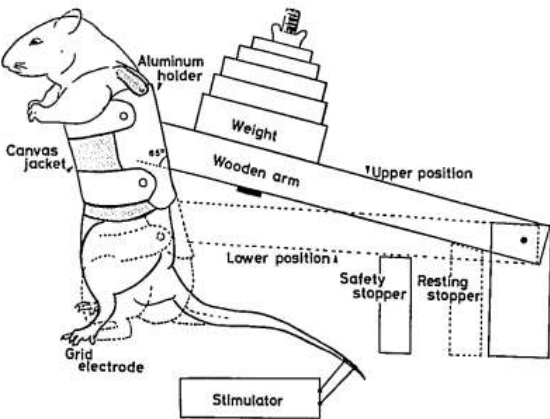


Figura 1. Protocolo de equipamento de treino de força. Tamaki, Uchiyama, e Nakano, 1992, p882

O treinamento aeróbico será adaptado do estudo de Tamaki et al. (1992) conforme as diretrizes propostas por Bompa and Buzzichelli (2015) no Quadro 2. O protocolo do treinamento aeróbico será uma adaptação proposta por Tamaki, Uchiyama, e Nakano (1992), sendo executado 3 vezes na semana em dias não consecutivos, com cinco séries de dois minutos de duração e dois minutos de intervalo entre as séries. A velocidade será aumentada gradativamente conforme a semana de treinamento dos animais.

Quadro 2. Protocolo de treinamento aeróbico

Protocolo original	Protocolo adaptado
10 sets/1min	5 sets/2min
Velocidade gradativa	Velocidade gradativa
Sem. 1 = 40m min ⁻¹	Sem. 1 = 40m min ⁻¹
Sem. 6 = 80m min ⁻¹	Sem. 6 = 80m min ⁻¹
Fonte de energia: anaeróbica láctica e aláctica	Fonte de energia: aeróbica

Adaptado de Tamaki, Uchiyama, e Nakano, 1992, p882

As avaliações bioquímicas serão realizadas utilizando amostra de sangue (soro). O **sangue** será coletado em três momentos neste estudo, sendo a primeira coleta no 1º dia do estudo, pela veia da cauda com uma amostra de 0,6 mL, bem como a segunda coleta, que ocorrerá no 42º dia do estudo. A terceira coleta ocorrerá no dia de eutanásia dos animais, através de punção cardíaca, coletando uma amostra de 10 mL. Todos os procedimentos de coleta ocorrerão conforme o Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (Neves et al., 2013). O sangue será centrifugado em centrífuga à 2000 rpm e será armazenado o soro congelado à -80°C.

A determinação dos níveis de **AST** e **ALT** será feita com kits comerciais da Labtest®, conforme manual do fabricante. Os níveis de **IL-6**, **IL-10** e **TNF-α** serão medidos por citometria de fluxo, com uso de Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando para a automação o citômetro de

fluxo BD FACSCantoTM. Exames bilirrubina, albumina (analisados por kits comerciais) e hemograma completo serão realizados para comparação dos níveis entre os grupos.

Após a eutanásia, os animais serão submetidos à avaliação morfológica e coleta de material biológico. Serão coletados os órgãos (fígado, coração, pulmões, rins e testículo), músculos (gastrocnêmios e quadríceps femorais), próstata e ossos (fêmur) e refrigerados mergulhados em paraformaldeído a 4% por 24 horas, e, sequencialmente serão refrigerados mergulhados em solução de sacarose a 30%, diluída em água de injeção com pH 7.4 também por 24 horas. Após, os órgãos, músculos, próstata e ossos serão emblocados em parafina.

VI - Etapas de execução do projeto e Cronograma de atividades (12 meses)

Etapa 01: Revisão de literatura e solicitação de animais junto ao Biotério UFCSPA;

Etapa 02: Fase I - Indução da EHNA em todos os animais do estudo;

Etapa 03: Divisão dos grupos (conforme os grupos apresentados no Quadro 1);

Etapa 04: Fase 2 - Oferta de treinamento, dietas e inóculo de DECA;

Etapa 05: Eutanásia, coleta de material biológico e análise de dados;

Etapa 06: Redação de artigos sobre o estudo executado.

[illegible]

Avaliação e discussão dos resultados			X	X								
Redação de artigos			X	X	X	X						

VII - Produtos esperados como Resultado da execução do projeto

Como produto desse estudo, almejamos um tratamento precoce para DHGNA, através da associação do decanoato de nandrolona na DHGNA ao treinamento físico e à dieta. Considerando a relevância do treinamento físico e de uma dieta saudável na manutenção da saúde hepática, e que o decanoato de nandrolona se apresenta com um potencial terapêutico em outras patologias, é possível que os resultados obtidos com a realização deste estudo apresentem mais uma opção terapêutica para esta condição, melhorando a qualidade de vida e minimizando os custos com os tratamentos convencionais.

Assim, será produzido ao menos um artigo científico de grande impacto para publicação em periódicos indexados, além da formação de recursos humanos na área de Patologia Experimental (um aluno de doutorado e dois alunos de iniciação científica).

VIII - Potencial de Impacto como resultado da execução do projeto

Por meio do desenvolvimento da DHGNA nos animais, esperamos compreender a influência do estilo de vida adotado pelos indivíduos perante a doença hepática, bem como compreender como as combinações de treinamento e reformulação nutricional, ou treinamento, reformulação nutricional e utilização do esteróide podem impactar bioquimicamente na condição dos pacientes.

Esta proposta visa a traçar um método alternativo e seguro de intervenção para os casos de DHGNA, de modo a assegurar a integridade física e mental dos pacientes acometidos, permitindo o avanço dos estudos acerca de possíveis estratégias terapêuticas. Considerando os impactos da DHGNA e suas complicações, o estabelecimento deste modelo apresenta grande potencial de reduzir custos e a carga de doença nos sistemas de saúde e de melhorar as abordagens terapêuticas alternativas para esta condição.

Referências

- Almeida, M. E. F. de, & Santos, V. S. (2015). Dieta de cafeteria com chocolate, amendoim e biscoito: eficácia na indução do excesso de peso e da dislipidemia em ratos cafeteria diet with chocolate, peanut and cookie: effectiveness in induction of overweight and dyslipidemia in rats. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*, 10(3), 15–24.
- Andreato, L. V. ;, Esteves, J. V. D. C., Almeida, F. N., Ribeiro, T. A. da S., Barrena, H. C., Peres, S. B., & Moraes, S. M. F. de. (2013). Uso do esteróide anabólico decanoato de nandrolona associado ao treinamento de força em ratos wistar.

Acta Scientiarum - Biological Sciences, 35(2), 283–291.
<https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v35i2.15513>

- Arab, J. P., Barrera, F., Gallego, C., Valderas, J. P., Uribe, S., Tejos, C., Serrano, C., Huete, Á., Liberona, J., Labbé, P., Quiroga, T., Benítez, C., Irarrázaval, P., Riquelme, A., & Arrese, M. (2016). High prevalence of undiagnosed liver cirrhosis and advanced fibrosis in type 2 diabetic patients. *Annals of Hepatology*, 15(5), 721–728. <https://doi.org/10.5604/16652681.1212434>
- Bompa, T., & Buzzichelli, C. (2015). *Periodization Training for Sports* (3ª). Human Kinetics.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., & Sanyal, A. J. (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 67(1), 328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>
- Evans, N. (2007). *Anatomia da musculação*. Manole.
- Favoretto, S. M., Seabra, D. I., & Olivato, M. C. M. (2019). *Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa - UNIFESP*. 51. https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia_Eutanasia_UNIFESP_ver_sao_final_042019.pdf
- Henkel, J., Buchheim-Dieckow, K., Castro, J. P., Laeger, T., Wardelmann, K., Kleinridders, A., Jöhrens, K., & Püschel, G. P. (2019). Reduced oxidative stress and enhanced FGF21 formation in livers of endurance-exercised rats with diet-induced NASH. *Nutrients*, 11(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11112709>
- Marchesini, G., Day, C. P., Dufour, J. F., Canbay, A., Nobili, V., Ratzliff, V., Tilg, H., Roden, M., Gastaldello, A., Yki-Jarvinen, H., Schick, F., Vettor, R., Frühbeck, G., & Mathus-Vliegen, L. (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 64(6), 1388–1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
- Neves, S. M. P., Ong, F. de M. P., Rodrigues, L. D., Santos, R. A. dos, Fontes, R. S., & Santana, R. de O. (2013). Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. In *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP*. FCF-IQ/USP. <https://doi.org/10.11606/9788585285098>
- Pablo, A. J., Marco, A., & Michael, T. (2018). Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), 321–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>
- Schering-Plough Indústria Farmacêutica Ltda. (2013). *DECA-DURABOLIN: decanoato de nandrolona*.
- Stefano, J. T., Pereira, I. V. A., Torres, M. M., Bida, P. M., Coelho, A. M. M., Xerfan, M. P., Cogliati, B., Barbeiro, D. F., Mazo, D. F. C., Kubrusly, M. S., D'Albuquerque, L. A. C., Souza, H. P., Carrilho, F. J., & Oliveira, C. P. (2015). Sorafenib prevents

liver fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rodent model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(5), 408–414.
<https://doi.org/10.1590/1414-431X20143962>

Tamaki, T., Uchiyama, S., & Nakano, S. (1992). A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 24(8), 881–886. <https://doi.org/10.1249/00005768-199208000-00009>

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84.
<https://doi.org/10.1002/hep.28431>



Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFCSPA

**Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na
fisiopatologia da pré-eclâmpsia**

Proponente: Prof^a. Dra. Gisele Branchini

Equipe: Prof^a. Dra. Fernanda Bordignon Nunes
Prof^a Dra. Helena von Eye Corleta
Acadêmica Thaís Duarte Borges de Moura
Biomédica Érika Santana Leotério

Porto Alegre, novembro de 2020

Resumo

As síndromes hipertensivas são as complicações mais frequentes na gestação e constituem, no Brasil, a primeira causa de morte materna, principalmente quando se instalam nas suas formas graves, como a eclâmpsia e a síndrome HELLP. São ainda responsáveis por altas taxas de mortalidade perinatal, prematuridade e restrição de crescimento fetal. A pré-eclâmpsia caracteriza-se pelo aparecimento de hipertensão, com proteinúria e/ou edema; ocorre após a 20ª semana de gestação e é predominantemente patológica. Não é possível a prevenção da pré-eclâmpsia pelo desconhecimento de sua etiologia. Mas, na prática clínica, são utilizados a aspirina e o cálcio em dose baixa nos casos de alto risco para amenizar os sintomas. Sua fisiopatologia relaciona-se com diferenciação trofoblástica, invasão decidual e remodelação das artérias espiraladas de forma defeituosa. Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico. O projeto tem como objetivo avaliar o papel dos canais de cálcio operados por estoque (SOCE) na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e da pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez normotensa. As placentas serão oriundas de mulheres com idade superior a 18 anos, em atendimento obstétrico para parto no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que concordarem em assinar o TCLE. Serão realizadas análises da expressão gênica dos canais de cálcio operados por estoque de amostras da placente e do leito placentário de mulheres portadoras de pré-eclâmpsia e normotensas. Será avaliada expressão e localização proteica pela técnica de imuno-histoquímica. O cálcio sérico será dosado do soro e mensurado a partir da técnica de eletrodo íon seletivo. Serão isoladas e cultivadas células endoteliais placentárias e células musculares lisas arteriais. As células em cultivo serão submetidas à extração de RNA e proteínas para verificar a expressão gênica e proteica dos canais de cálcio operados por estoque nos diferentes tipos celulares. Além disso, as células receberão tratamento com cálcio, sulfato de magnésio e nifedipina, em doses e tempos a serem padronizados, e terão seu potencial elétrico mensurado, de modo a comparar a resposta das células de cada grupo experimental. Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico, incluindo o papel dos componentes moleculares da entrada de cálcio operada por estoque (SOCE).

1. Introdução

Na gravidez, os distúrbios hipertensivos associam-se a um risco maior de complicações para a mãe e o para o recém nascido. As variadas formas de hipertensão arterial na gravidez causam cerca de 14% das mortes maternas, além de se associarem a problemas pós-natais^{1,2}. Os distúrbios hipertensivos da gestação englobam condições distintas, como pré-eclâmpsia,

eclâmpsia, hipertensão crônica de qualquer etiologia, hipertensão crônica com pré-eclâmpsia sobreposta e hipertensão gestacional ou transitória³. Dessa forma, observa-se que a gravidez pode induzir hipertensão arterial em uma mulher previamente normotensa ou agravar uma hipertensão preexistente.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou recomendações sobre a suplementação de cálcio durante a gravidez para prevenir a pré-eclâmpsia⁴. Outras organizações de saúde também emitiram declarações sobre a eficácia da suplementação de cálcio na prevenção da pré-eclâmpsia em populações com baixa ingestão alimentar e alto risco de pré-eclâmpsia^{5,6}. No mundo todo, problemas hipertensivos na gravidez constituem uma das causas principais de mortalidade materna⁷. Assim, observa-se que a suplementação de cálcio é uma intervenção preventiva de baixo risco e custo, que tem potencial para efeitos na saúde materna e neonatal⁸.

A diretriz da OMS afirma que: “Em populações onde a ingestão de cálcio é baixa, a suplementação de cálcio como parte do cuidado pré-natal é recomendada para a prevenção da pré-eclâmpsia entre mulheres grávidas, particularmente entre aquelas com maior risco de hipertensão”⁴. Essa recomendação é baseada em evidências de qualidade moderada, metanálises de ensaios clínicos randomizados, em que a suplementação de cálcio preveniu aproximadamente metade dos casos de pré-eclâmpsia⁴.

A pré-eclâmpsia continua sendo uma síndrome que leva a graves repercussões maternas e fetais, conhecendo-se muito pouco a respeito de sua etiologia. Ela é caracterizada pela hipertensão (Pressão Arterial Sistólica ≥ 140 mmHg e Pressão Arterial Diastólica ≥ 90 mmHg) induzida após a 20ª semana de gravidez, acompanhada de sinal clínico, laboratorial ou hemodinâmica de hiperatividade vascular como: proteinúria significativa, disfunções orgânicas maternas (perda de função renal, disfunção hepática, complicações neurológicas, hematológicas – plaquetopenia, hemólise, estado de antiangiogênese ou disfunção uteroplacentária, como crescimento fetal restrito, alterações no doppler, artéria umbilical alterada).

Muitas teorias foram propostas para compreender melhor o quadro clínico. Algumas sugeriram a existência de fatores imunogenéticos com implicação do gene da síntese do óxido nítrico e do sistema Human Leucocyte Antigens (HLA), considerados importantes no início do processo fisiopatológico. Além disso, esses fatores acrescidos do endotélio poderiam ser influenciados pelas grandes modificações gestacionais⁹⁻¹². Essas modificações provocam a má adaptação placentária, com falha da remodelação e na infiltração de células trofoblásticas nas arteríolas espiraladas e subsequente hipoperfusão placentar¹¹.

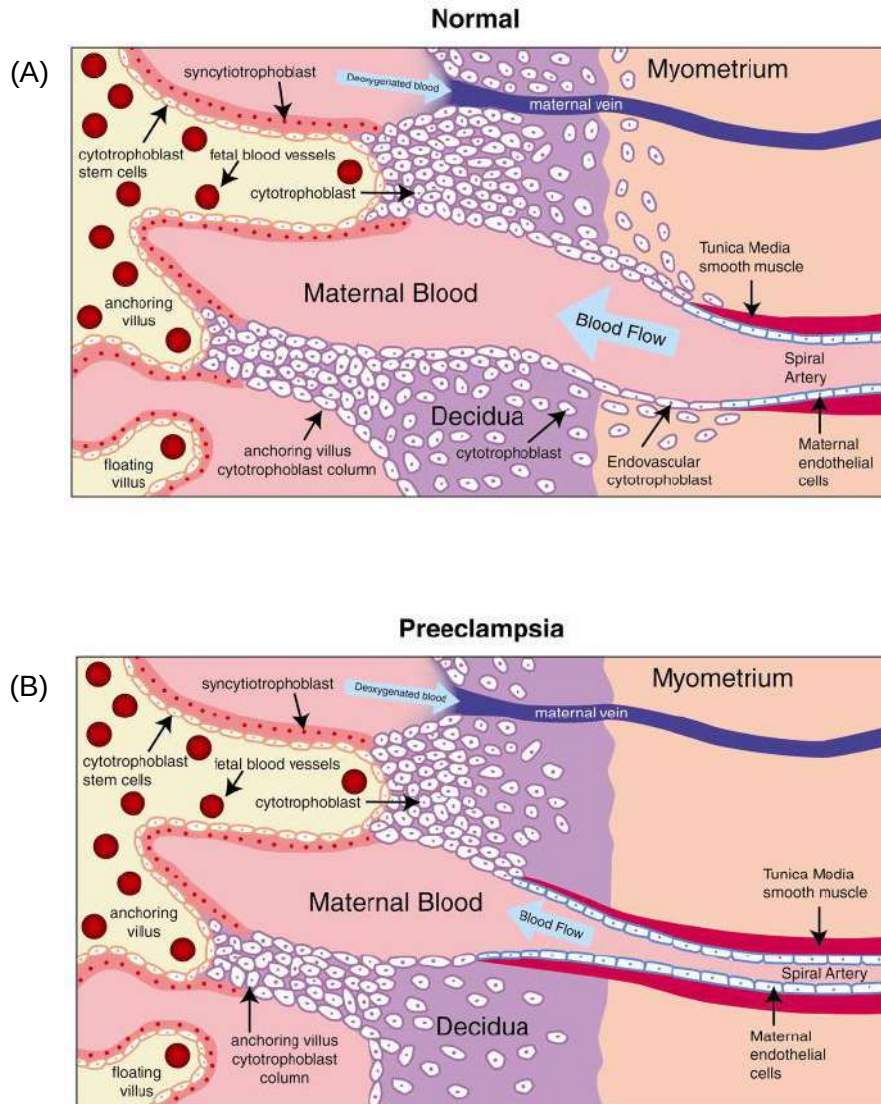
A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbimortalidade materna e perinatal, do parto prematuro e da restrição do crescimento intrauterino¹³. Esta síndrome ocorre em cerca de 2% a 8% das gestações, porém este índice pode aumentar para 15 a 20% quando as gestantes apresentam hipertensão crônica, diabetes pré-gestacional, gravidez múltipla ou se tiveram pré-eclâmpsia em gestação prévia^{14,15,16}. Além disso, possui como fatores de riscos a

primiparidade, histórico familiar, doença renal crônica, doença do colágeno, trombofilias, obesidade, gestação molar, hidropsia fetal, extremos da vida reprodutiva (> 35 anos ou adolescente), raça negra, longo intervalo interpartal e síndrome antifosfolípídeo. Em mulheres normotensas e hipertensas, o aumento da rigidez arterial é apresentado como um marcador de grande risco para problemas cardiovasculares, de forma até mais significativa que os valores elevados de pressão arterial periférica¹⁷⁻¹⁹.

Apesar da etiologia da pré-eclâmpsia não estar bem definida, ela está primariamente associada à presença da placenta e a diminuição da perfusão desta, principalmente devido a uma má formação das artérias espiraladas maternas e ao aumento da resistência vascular^{20,21}. A melhor terapêutica para esse distúrbio deve observar sempre à redução dos índices de morbimortalidade por prevenção de complicações²². O tratamento definitivo da pré-eclâmpsia é o parto, mais especificamente a retirada da placenta¹⁶. Dependendo de fatores como idade gestacional, gravidade, bem-estar fetal e presença ou não de complicações, a interrupção da gravidez está indicada. No entanto, a apresentação precoce da doença aumenta a chance de prematuridade com subsequente incremento da morbimortalidade perinatal²³. A evolução da pré-eclâmpsia é variável, enquanto algumas não progridem para a forma mais grave da doença, outras apresentam essa evolução em questões de dias ou horas, sendo imprescindível o monitoramento contínuo dessas pacientes²¹.

Assim, na tentativa de analisar a resistência e alteração cardiovascular que caracteriza a pré-eclâmpsia na gestação, deve-se observar mais cuidadosamente os fatores fisiológicos que regulam a pressão arterial, em especial o tônus vascular. Diante disso, para a correta formação estrutural da placenta é necessário que as artérias espiraladas maternas sejam remodeladas²¹. Conforme demonstrado na figura 1, esses vasos sanguíneos são invadidos por células trofoblásticas, resultando na perda das células endoteliais e das células musculares lisas de suas porções distais, restando apenas uma estrutura dilatada que as ligam ao espaço intervilloso²⁴. Uma vez que o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é a retirada da placenta, as terapias atuais visam evitar a morbimortalidade, tratando somente a sintomatologia apresentada, sem a existência de um medicamento de escolha para tratamento das gestantes pré-eclâmpicas³.

Figura 1 – Placentação anormal na pré-eclâmpsia.



(A) No desenvolvimento normal da placenta, os citotrofoblastos de origem fetal invadem as artérias espirais maternas, transformando-as de vasos de resistência de pequeno calibre em vasos de capacitância de alto calibre, capazes de fornecer perfusão placentária adequada para sustentar o feto em crescimento. Durante o processo de invasão vascular, os citotrofoblastos se diferenciam de um fenótipo epitelial para um fenótipo endotelial, um processo denominado "pseudovasculogênese" ou "mimetismo vascular".

(B) Na pré-eclâmpsia, os citotrofoblastos não conseguem adotar um fenótipo endotelial invasivo. Em vez disso, a invasão das artérias espiraladas é rasa e permanecem vasos de pequeno calibre com maior resistência (painel inferior). Fonte: Powe CE.³²

As evidências de estudos randomizados mostram que o uso de cálcio ajuda a prevenir a pré-eclâmpsia, o parto prematuro e a reduzir o risco de uma mulher morrer ou ter problemas sérios relacionados à pressão alta durante a gravidez²⁵. Isso serve especialmente para mulheres em dietas com baixo teor de cálcio.

A baixa ingestão de cálcio pode resultar em uma pressão arterial elevada ao estimular a liberação de paratormônio (PTH) ou a liberação de renina, aumentando assim o cálcio intracelular no músculo liso vascular²⁶ e levando à vasoconstrição. Um possível modo de ação para a suplementação de cálcio é que ele reduz a liberação de paratormônio e, em consequência, a

concentração de cálcio intracelular, reduzindo assim a contratilidade do músculo liso. Por um mecanismo semelhante, a suplementação de cálcio também pode reduzir a contratilidade do músculo liso uterino e prevenir o trabalho de parto prematuro²⁷. Evidências também indicam que a suplementação de cálcio afeta o fluxo sanguíneo útero-placentário, reduzindo o índice de resistência nas artérias uterinas e umbilicais²⁸. Além disso, a suplementação na segunda metade da gravidez parece reduzir a pressão arterial diretamente, em vez de prevenir o dano endotelial associado à pré-eclâmpsia²⁹.

Assim, a suplementação de cálcio é importante para reduzir o risco de uma mulher desenvolver pré-eclâmpsia, sendo o uso seguro para a gestante e o feto. Além disso, existe a possibilidade de que possa haver um efeito preventivo sobre o risco de hipertensão nos descendentes³⁰.

Além do uso preventivo do cálcio, orientado pela OMS⁴, outro fármaco com a mesma função é o sulfato de magnésio, visto que ele apresenta grande eficácia no controle das crises convulsivas e ainda inibe o trabalho de parto prematuro³¹. Biologicamente, o magnésio está inserido em uma variedade de reações fisiológica. No entanto, por ser um antagonista fisiológico natural do cálcio, ele é capaz de reduzir a resistência vascular periférica³¹. Ademais, a nifedipina utilizada para controle hipertensivo na gestação atua bloqueando canais de cálcio, reduzindo a concentração de cálcio intracelular, resultando no relaxamento da musculatura vascular. É também utilizado como hipotensor, vasodilatador e tocolítico²⁴.

Assim, diante do papel imprescindível do cálcio - tanto na prevenção da pré-eclâmpsia, quanto como agente vasoconstritor. Assim, é de fundamental importância a análise detalhada dos canais de cálcio nas células musculares lisas das células espiraladas materna, para esclarecer a relação do cálcio com esta doença.

Os canais de cálcio podem ser classificados conforme a tabela 1 e 2. No entanto, é importante evidenciar os canais do tipo store-operated channels calcium (SOCC), pois, em células não excitáveis, a ativação de receptores ligados à fosfolipase C acoplada à proteína G (PLC) causa a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, que é seguida pela entrada transmembrana de Ca^{2+} . Esta entrada de cálcio é a base de uma fase pequena e sustentada do aumento na concentração intracelular. Além disso, é importante para várias funções celulares, incluindo expressão gênica, secreção e proliferação celular. Em células excitáveis, como as células musculares lisas das artérias espiraladas, esse mecanismo de entrada de Ca^{2+} é importante para contração muscular³³.

Tabela 1 - Canais de Cálcio Voltagem Dependentes.

Tipo	Voltagem	Subunidade	Local
Canais de Cálcio tipo L	Ativado por alta tensão	$\alpha 2 \delta, \beta, \gamma$	Músculo esquelético, Músculo Liso, osteoblasto, neurônios corticais, etc.
Canais de Cálcio tipo P	Ativado por alta tensão	$\alpha 2 \delta, \beta$	Células de Purkinje e células granulares do cerebelo
Canais de Cálcio tipo N	Ativado por alta tensão	$\alpha 2 \delta / \beta 1, \beta 3, \beta 4$	Cérebro e SNP
Canais de Cálcio tipo R	Ativado por tensão intermediária	$\alpha 2 \delta, \beta$	Células granulares cerebelares
Canais de Cálcio tipo T	Ativado por baixa tensão	-	Neurônios, osteócito

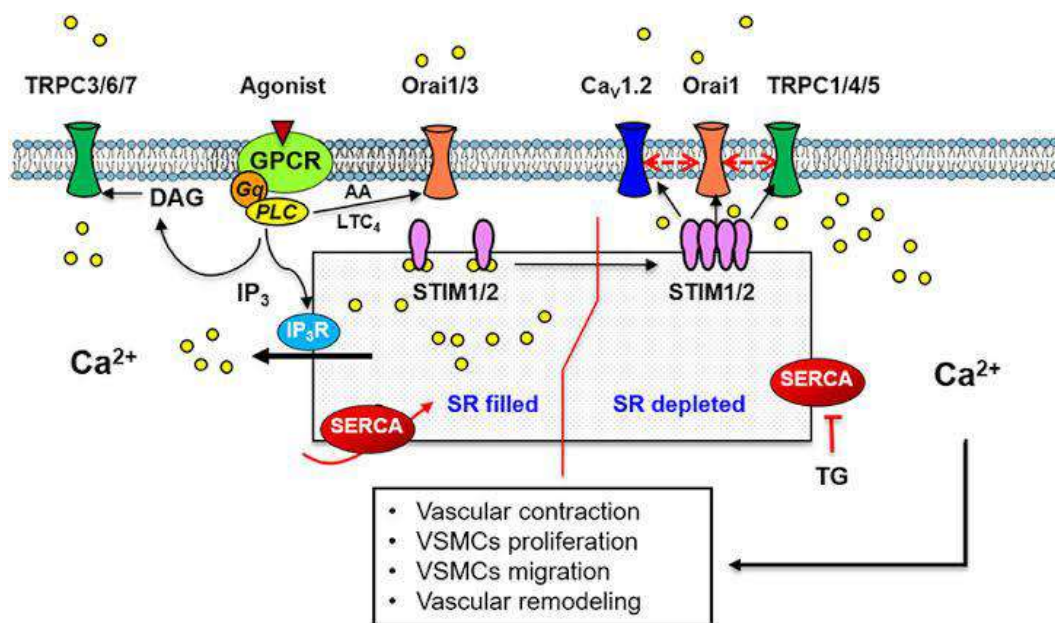
Tabela 2 - Canais de Cálcio operados por receptores.

Tipo	Mecanismo de Fechamento	Gene	Localização	Função
Receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)	IP3	ITPR1, ITPR2, ITPR3	Retículo Endoplasmático	Libera cálcio em resposta ao IP3 do Retículo Endoplasmático
Receptor de Rianodina	Receptores de Diidropiridina	RYR1, RYR2, RYR3	Retículo Endoplasmático	Libera cálcio
Two-pore channel	Ácido nicotínico adenina dinucleotídeo fosfato (NAADP)	TPCN1, TPCN2	Membrana Lisossomo e Endossomo	Transporte de cálcio ativado por NAADP através das membranas endossômicas e lisossomais
Canais de Cátions do esperma	Cálcio	PKD2	Flagelo	Ajuda a direcionar os espermatozóides no trato reprodutivo feminino
Store-operated channels calcium (SOCC)	Diminuição de Cálcio no Retículo Endoplasmático	ORAI1, ORAI2, ORAI3	Membrana Plasmática	Sinalização de cálcio ao citoplasma

Um modelo para o acoplamento de excitação e contração, em uma célula de músculo liso tônico, em que a contração sustentada envolve a entrada de cálcio foi apresentada recentemente, conforme a figura 2. Fisiologicamente, a entrada de cálcio operada por armazenamento (SOCE) é iniciada pela estimulação de receptores que se acoplam por meio da proteína de ligação a GTP (proteínas G) para ativar a fosfolipase- $C\beta$ (PLC β) ou por estimulação de receptores que se acoplam por meio de fosforilação de tirosina para ativar PLC γ . Essa ação resulta na decomposição e produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Este segundo mensageiro ativa os receptores IP3, que são canais dependentes de cálcio localizados

no retículo endoplasmático, liberando o cálcio armazenado. A liberação resultante de cálcio no citoplasma causa um aumento transitório na concentração de cálcio intracelular, enquanto que o esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} gera um sinal retrógrado que ativa SOCCs na membrana plasmática, isso ocorre simultaneamente em um curto espaço de tempo. Como consequência, as reservas de Ca^{2+} esgotadas geram uma molécula mensageira chave chamada Fator de Influxo de Cálcio (CIF), que se difunde para a membrana plasmática. Uma cascata de reações ativam os SOCCs. Nesse aspecto, a liberação de cálcio do retículo endoplasmático faz com que a proteína STIM1 (sensora de Ca^{2+}) se agregue em áreas próximas à membrana plasmática e interaja com SOCC (ou seja, Orai1, $\text{Ca}_v1.2$ e TRPC 1/4/5). Acredita-se que seja esse o mecanismo de entrada de cálcio operada por armazenamento³³.

Figura 2 – Esquema que ilustra o mecanismo padrão e os componentes moleculares de SOCE em células de músculo liso vascular.

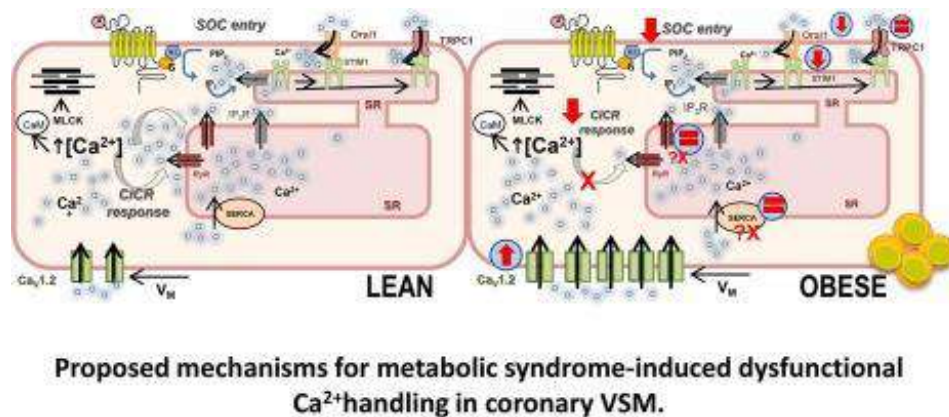


Fonte: Ávila-Medina J³⁴

Um estudo recente relaciona os canais tipo SOCC com a Síndrome Metabólica em vasos coronarianos de ratos obesos. Esse estudo mostrou que, por um lado, a entrada SOCE é prejudicada devido a STIM1 e Orai1 estarem deficientes, mas a expressão da proteína TRPC1 permanece inalterada. Por outro lado, a resposta prejudicada da liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) foi diminuída sem alteração do receptor de Ryanodina (RyR) nem da expressão de proteína total de SERCA. No entanto, a entrada de cálcio através de canais do tipo L dependentes de voltagem, via expressão aumentada do canal $\text{Ca}_v1.2$, conseguiu preservar a vasoconstrição induzida pela despolarização em artérias coronárias de ratos Zucker obesos³⁵. Talvez o mecanismo do cálcio que esteja alterado nas artérias coronarianas, na Síndrome Metabólica, onde há uma diminuição no mecanismo SOCE e uma

vasoconstrição preservada (conforme figura 3), também esteja alterado em artérias espiraladas do miométrio uterino.

Figura 3 – Mecanismo de disfunção de cálcio na Síndrome Metabólica em células do músculo liso coronariano



Fonte: Belém C. ³⁵

Diante do exposto, infere-se a importância do estudo dos canais de cálcio operados por armazenamento no estudo da pré-eclâmpsia. Os conhecimentos gerados a partir deste projeto terão potencial para aprimorar o manejo de gestantes com pré-eclâmpsia, uma vez que diferentes alvos terapêuticos poderão ser futuramente explorados para contribuir na redução da morbimortalidade materna e perinatal.

2. Justificativa

Atualmente, não existe prevenção à pré-eclâmpsia pelo desconhecimento de sua etiologia. No entanto, estudos apontam o uso do cálcio em doses baixas nos casos de alto risco. A fisiopatologia dessa doença relaciona-se com diferenciação trofoblástica, invasão decidual e remodelação das artérias espiraladas de forma defeituosa. Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas, torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico, incluindo o papel dos componentes moleculares da entrada de cálcio operada por estoque (SOCE).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos componentes da entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e da pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez normotensa.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica e proteica dos componentes moleculares da entrada de cálcio operada por depósito (SOCE), as proteínas Orai1, TRPC1, $Ca_v1.2$ e STIM1, em células de músculo liso vascular da placenta materna e fetal;
- Avaliar a alteração do potencial elétrico das células musculares lisas arteriais e células endoteliais placentárias em cultivo em resposta ao tratamento com cálcio, sulfato de magnésio e nifedipina;
- Avaliar a associação dos dados de expressão dos canais, bem como das alterações de potencial elétrico das células em resposta aos tratamentos acima descritos, com os diferentes graus de pré-eclâmpsia;
- Avaliar a associação dos dados obtidos nas análises das amostras coletadas com desfechos neonatais (peso, comprimento, Apgar).

4. Materiais e Métodos

4.1 Delineamento da Pesquisa

Estudo transversal comparativo e um estudo experimental *in vitro*.

4.2 Amostra

Serão coletadas três amostras: uma colheita de sangue, uma do útero da participante da pesquisa e uma da placenta. Amostras de placenta fetal e do leito placentário materno coletadas de mulheres com idade superior a 18 anos, sem histórico de hipertensão prévia, que receberam atendimento obstétrico para cesariana no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e que consentiram na sua participação no estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3 Sujeitos de Pesquisa

Para recrutamento da amostra, serão selecionadas 224 participantes, sendo 149 para Grupo controle (sem pré-eclâmpsia) e 45 para Grupo pesquisa (com pré-eclâmpsia). Para esta seleção, será adotada a seguinte estratégia: na sequência da internação de pacientes que apresentarem indicação de cesariana pela equipe assistente, um membro da equipe as convidará verbalmente para participar do estudo de forma voluntária e explicará os procedimentos metodológicos da pesquisa. As voluntárias serão questionadas nesse momento a respeito das informações referentes aos critérios de inclusão e exclusão, os quais serão preenchidos conforme a primeira parte do Check-list do estudo, apresentado no Apêndice I.

As mulheres que se enquadrarem nos critérios de inclusão para cada um dos grupos experimentais (descritos abaixo) deverão ler, assinar e datar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Em relação à via de parto, serão incluídas somente cesáreas. Não serão excluídas participantes que fizerem uso de medicamentos para controle da pré-eclâmpsia, mas os seus dados serão avaliados de forma estratificada.

4.3.1 Critérios de Inclusão para o grupo Pré-Eclâmpsia

- Possuir idade maior ou igual a 18 anos.
- Apresentar diagnóstico de pré-eclâmpsia leve ou grave (Pressão Arterial Sistólica ≥ 140 mmHg e Pressão Arterial Diastólica ≥ 90 mmHg, induzida após a 20ª semana de gravidez, acompanhada de sinal clínico, laboratorial ou hemodinâmica de

hiperatividade vascular como: proteinúria significativa, disfunções orgânicas maternas (perda de função renal, disfunção hepática, complicações neurológicas, hematológicas – plaquetopenia, hemólise, estado de antiangiogênese ou disfunção uteroplacentária, como crescimento fetal restrito, alterações no doppler, artéria umbilical alterada), sem história clínica de hipertensão em período anterior a gestação.

4.3.2 Critérios de Inclusão para o grupo Controle

- Possuir idade maior ou igual a 18 anos.
- Apresentar pressão normal antes e durante a gestação.

4.3.3. Critérios de Exclusão

Serão excluídas do estudo gestantes com diagnóstico prévio de nefropatia, hepatopatia, tireoidopatias, infecções ativas (como infecção do trato urinário) ou que apresentem gestações múltiplas. Gestantes normotensas com proteinúria $\geq 1+$ no exame qualitativo de urina também serão excluídas, bem como as que fizerem uso de qualquer tipo de medicamento que possa interferir nas concentrações de cálcio sérico ou nos canais iônicos, como Calcitriol ou Citrato de Cálcio.

4.4 Coleta das Amostras

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, as participantes serão submetidas a coleta das três amostras: uma colheita de sangue, uma do útero da participante da pesquisa e uma da placenta. Além disso, será feito o uso de informações retiradas de prontuário tanto da mãe quanto do bebê.

A coleta de volume sanguíneo antes de qualquer infusão sorológica de modo a evitar hemodiluição. A coleta sanguínea será realizada por profissional capacitado e habilitado para os procedimentos, bem como o local será previamente preparado higienizado para a realização do procedimento. As amostras de sangue serão acondicionadas em tubos do tipo *vacutainer* específicos para separação de soro (sem anticoagulante).

Durante a cesariana, após a retirada do concepto e da placenta, o leito placentário será identificado e, de forma breve, uma biópsia do leito placentário (face materna) será realizada. A amostra terá o tamanho de um disco em torno de 1,5 cm de diâmetro da parte central do leito placentário ou uma amostra em forma de cunha de 1,5 cm de comprimento. Ambos não mais profundos que 0,5 cm. Esta amostra será dividida em três fragmentos para análises distintas: biologia molecular, imuno-histoquímica e cultivo celular. As amostras de tecido destinadas às análises de biologia molecular serão acondicionadas em RNA *later* e posteriormente congeladas a -80 °C. As amostras destinadas à imuno-histoquímica serão acondicionadas em

frasco contendo formalina tamponada. As amostras destinadas aos cultivos celulares serão acondicionadas em tubos tipo falcon de 15 mL contendo solução salina de Hank's estéril e refrigerada. Esse procedimento será feito com a maior brevidade possível, de modo a não atrapalhar ou interferir nas etapas subsequentes da cesariana. Caso haja qualquer intercorrência durante a cirurgia, a coleta será imediatamente cancelada.

Além disso, será coletada uma amostra da placenta fetal. Da mesma forma, será dividida em três fragmentos para análises distintas: biologia molecular, imuno-histoquímica e cultivo celular. Todos serão armazenados conforme as biópsias placentárias maternas.

Todos os frascos contendo amostras de sangue ou das placentas estarão identificadas por um código numérico, de modo a preservar a identificação da paciente. O transporte até o Laboratório de Fisiologia Translacional da USF CPA será feito em recipiente térmico adequado, contendo gelo reutilizável para preservação resfriada das amostras. O profissional responsável pelo transporte usará equipamento de proteção individual adequado para transporte e manuseio das amostras.

As amostras fixadas em formalina serão encaminhadas ao Laboratório de Patologia da UFCSPA para realização de imuno-histoquímica. As amostras destinadas às análises de biologia molecular serão armazenadas em freezer -80 °C até o processamento para avaliação da expressão gênica no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. As amostras destinadas aos cultivos celulares serão encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA, onde serão processadas conforme descrição abaixo. As amostras de sangue serão processadas e armazenadas no Laboratório de Fisiologia Translacional, conforme descrito adiante.

Também serão coletadas informações clínicas de prontuário sobre a parturiente e o concepto (peso, comprimento, Apgar), conforme identificado no Chek-list (apêndice I), para posterior avaliação de associação com os dados moleculares avaliados no laboratório, descritos abaixo.

4.5 Avaliação da expressão dos canais de cálcio

4.5.1 Expressão gênica

A expressão gênica será avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (RT-qPCR). O RNA total será extraído das amostras com o uso do reagente Trizol, seguindo-se a síntese do cDNA (DNA complementar) com o uso do Kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). A amplificação do mRNA dos genes de interesse será realizada pela técnica de PCR em tempo real com oligonucleotídeos (primers) específicos no aparelho 7500 Fast (Applied Biosystems), com o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) o qual possui um corante fluorescente exclusivo, semelhante ao SYBR Green I. A reação será normalizada pela expressão dos genes normalizadores (a serem

testados nas amostras para escolha – β -actina, beta-2-microglobulin, hypoxanthine phosphoribosyltransferase, succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

As sequências nucleicas dos genes de interesse (canais de SOCC) serão identificadas in silico no genoma humano. As sequências dos genes do genoma humano estão disponíveis na base de dados ENSEMBL.org e GenBank. Após a identificação das sequências proteicas, primers sense e antisense serão desenhados e utilizados nas reações de qPCR para a amplificação de fragmentos dos genes. Todos os primers serão desenhados com o auxílio da ferramenta IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc.) e sintetizados pela IDT.

4.5.2 Avaliação da expressão e localização proteica

Para avaliação da expressão e localização celular dos canais em estudo, será realizada a técnica de imuno-histoquímica. Os tecidos provenientes das amostras serão fixados em formalina e submetidos ao procedimento normal de patologia para inclusão em parafina e subsequente realização da técnica de imuno-histoquímica. Após o procedimento de desparanifização dos cortes, será realizada a recuperação antigênica e o bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, será feito o bloqueio das ligações inespecíficas e incubação com o anticorpo primário. Serão utilizados anticorpos primários tendo como alvo as proteínas dos canais de membrana Orai1, TRPC1, $Ca_v1.2$ sensível à voltagem e STIM1, bem como anticorpos secundários para realizar o restante dos procedimentos. Esses anticorpos serão selecionados conforme especificidade para realização da técnica de imuno-histoquímica, bem como serão escolhidos conforme análise de melhor custo-benefício dentre as empresas fabricantes. Após incubação com o anticorpo secundário, as lâminas serão incubadas com anticorpo terciário do mesmo kit e em seguida será feita a revelação com substrato cromógeno, a desidratação e a montagem com Entellan. As lâminas serão avaliadas e suas imagens capturadas para posterior análise com auxílio de um software de processamento de imagem. Estas técnicas serão realizadas no Laboratório de Patologia da UFCSPA.

4.6 Dosagem sérica de cálcio

Após a colheita sanguínea as amostras serão centrifugadas por 10 minutos a 2500 x g para separação do soro, que será armazenado a -20 °C até a análise. A dosagem de cálcio sérico será realizada pela técnica de eletrodo íon seletivo a partir do soro.

4.7 Isolamento e cultivo celular

4.7.1 Isolamento e cultivo de células endoteliais

Para os cultivos de células endoteliais uma parte dos fragmentos coletados que foram

acondicionados em solução salina de Hank's estéril e refrigerada serão lavados com uma solução PBS para remover todos os traços sanguíneos. O fragmento será incubado por 20 minutos a temperatura ambiente com solução PBS contendo 0,05% de tripsina e 0,53 mmol/L de EDTA. Após este período será adicionado meio M199 enriquecido com 10% de soro bovino fetal e o fragmento será centrifugado a 2500 x g por 10 minutos. As células serão plaqueadas em placas de Petri contendo meio livre de células endoteliais (EC-SFM; Gibco-brl, Grand Island, New York) e meio M199 na proporção de 1:1, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e penicilina-estreptomicina. As culturas serão mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios serão renovados após as primeiras 24 horas e após a cada 2 ou 3 dias. Quando as células endoteliais atingirem confluência de 80%, serão subcultivadas com 0,05% de tripsina/EDTA. O intervalo entre as subculturas será de 7 dias e apenas células de segunda ou terceira passagem serão utilizadas para estudo devido a melhor manutenção da integridade celular³¹.

4.7.2 Isolamento e cultivo de células arteriais musculares lisas

Fragmento das artérias espiraladas, isoladas das biópsias coletadas, que foram acondicionados em solução salina de Hank's serão lavados três vezes com solução salina de Hank's acrescida de 2% de penicilina-estreptomicina e 50 U/mL de nistatina. Após cortar o tecido longitudinalmente, pedaços de aproximadamente 3 a 5 mm serão dissecados e plaqueados em 5 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enriquecido com 10% de soro fetal bovino e penicilina-streptomicina. As culturas serão mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios serão retirados e trocados duas vezes por semana. Quando as células endoteliais atingirem confluência de 80%, serão cultivadas em meio DMEM sem soro pelo período de 24 horas para eliminar fibroblastos e células endoteliais. Após este período, meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, será acrescentado à cultura celular e as células estarão prontas para o seguimento dos estudos³².

4.8 Análises eletrofisiológicas

As células em cultivo serão submetidas à extração de RNA e proteínas de modo a verificar a expressão gênica e proteica dos canais de cálcio nos diferentes tipos celulares, conforme as técnicas descritas acima. Além disso, as células receberão tratamento com cálcio, sulfato de magnésio ou nifedipina, em doses e tempos a serem padronizados, e terão seu potencial elétrico mensurado, de modo a comparar a resposta das células de cada grupo experimental.

Para o estudo da eletrofisiologia, o potencial de membrana das células íntegras será registrado em temperatura ambiente utilizando pipeta ou solução intracelular contendo 145 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de EGTA, 2 mM de adenosina trifosfato de magnésio, 0,1 mM de GT e 10 mM de HEPES, com o pH final ajustado para 7,2 com hidróxido

de potássio. A solução do banho externo das células será composta por 140 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 5 mM de HEPES e 10 mM de glicose, com pH final ajustado para 7,4 com NaOH. O potencial será obtido a cada segundo, estimulado por pulsos despolarizantes de 300 ms a partir de um potencial de -70 mV até 80 mV, seguindo acréscimos de 10mV³³.

4.9 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo amostral foi feito a partir de dados de um estudo prévio do grupo de pesquisa, que avaliou a expressão gênica de canais de cálcio em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia e normotensas. Este estudo encontra-se em fase de finalização, de modo que os dados ainda não estão publicados. Para fins do cálculo amostral, foram usados os dados de expressão do canal de cálcio dependente de cálcio ($\text{K}_{\text{Ca}} 3.1$), com expressão de 4,17 unidades arbitrárias $\pm 6,77$ UA de expressão gênica, com N = 41 para o grupo controle, e 6,87 $\pm 6,74$ UA de expressão gênica, com N = 25 para o grupo pré-eclâmpsia, com $p = 0,010$ pelo teste U de Mann-Whitney. O tamanho amostral, considerando um poder de 90% e nível de significância de 0,05, foi de 224 pacientes (75 grupo pré-eclâmpsia e 149 grupo controle). O cálculo do tamanho amostral foi realizado com o programa WinPepi.

4.10 Análises estatísticas

A descrição da amostra será realizada através da estatística descritiva. A normalidade das variáveis será avaliada através do teste Shapiro-Wilk. A comparação das variáveis quantitativas será pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Bonferroni para comparação intragrupos. E na comparação intergrupos através do teste t de Student para amostras pareadas. Caso as variáveis em estudo não apresentem distribuição normal, serão utilizados os testes estatísticos não paramétricos correspondentes.

O índice de significância adotado será de $p < 0,05$ em todas as comparações. Os dados serão analisados pelo pacote estatístico computacional SPSS para Windows, versão 22.0.

5. Locais de realização do estudo

As amostras de placenta e soro serão obtidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após o entendimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) do HCPA e da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

As análises de biologia molecular, imuno-histoquímica e as dosagens séricas previstas neste estudo serão realizadas nas dependências da Fundação Universidade Federal de

Ciências da Saúde de Porto Alegre, nos Laboratórios de Fisiologia Translacional, de Biologia Molecular e de Patologia. Os cultivos celulares serão feitos no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA.

Cabe salientar que este projeto não prevê nenhuma intervenção que possa interferir nos desfechos clínicos das pacientes.

6. Cronograma do Projeto

	2021				2022				2023			
	JAN- MAR	ABR- JUN	JUL- SET	OUT- DEZ	JAN- MAR	ABR- JUN	JUL- SET	OUT- DEZ	JAN- MAR	ABR- JUN	JUL- SET	OUT- DEZ
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Compra de materiais	X	X	X	X	X	X						
Coleta das amostras		X	X	X	X							
Dosagem sérica		X	X	X	X							
Isolamento e cultivo celular							X	X	X	X	X	
Análises eletrofisiológicas								X	X	X	X	
Avaliação da expressão gênica			X	X	X	X	X					
Avaliação da expressão proteica			X	X	X	X	X					
Análise dos dados			X	X	X	X	X					
Submissão de artigo científico						X	X				X	X

As coletas das amostras só poderão ser iniciadas após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes (CEP).

7. Orçamento

Este projeto será custeado pelos pesquisadores envolvidos. Parte do material das análises encontra-se disponível nos locais de realização do estudo na UFCSPA. Materiais de escritório e expediente da equipe executora também terão custeios próprios.

Item	Quantidade	Valor unitário	Valor Total
Material para coleta de sangue	100	R\$ 0,45	R\$ 45,00
Criotubos (pct com 100)	01	R\$ 133,65	R\$ 133,65
Luvas de Procedimento cx 50 pares sem talco	10	R\$ 20,00	R\$ 200,00
Trizol (Invitrogen) 100 MI	01	R\$ 650,00	R\$ 650,00
Qubit RNA HS Assay kit (Invitrogen) (100 ensaios)	01	R\$ 403,75	R\$ 403,75
Kit para síntese de cDNA (GoScript) (Promega)	01	R\$ 1.009,50	R\$ 1009,50
Kit para qPCR (GoTaq) (Promega)	02	R\$ 1.050,00	R\$ 2.100,00
Primers (IDT)	02	R\$ 120,00	R\$ 240,00
Placas para qPCR (Life Technologies) (com 10 unid)	03	R\$ 162,13	R\$ 486,39
Adesivo óptico para placas de PCR (Life Technologies)	01	R\$ 403,00	R\$ 403,00
Anticorpos primários	03	R\$ 3.000,00	R\$ 9.000,00
Anticorpos secundários	02	R\$ 1.100,00	R\$ 2.200,00
Formalina (4L)	01	R\$ 338,00	R\$ 338,00
Parafina (1kg)	01	R\$ 250,00	R\$ 250,00
Substrato cromógeno (1g)	01	R\$ 207,00	R\$ 207,00
Dosagem de Ca ⁺ sérico	80	R\$ 20,00	R\$ 1.600,00
Meio de cultivo M199 (pó para 10L)	01	R\$ 223,47	R\$ 223,47
Meio de cultivo DMEM (pó para 10L)	01	R\$ 172,44	R\$ 172,44
Meio EC-SFM (500 mL)	02	R\$ 402,75	R\$ 805,50
Solução de Hank's	01	R\$ 102,00	R\$ 102,00
Soro fetal bovino (500 mL)	01	R\$ 285,00	R\$ 285,00
Placas de cultura 6 poços	20	R\$ 5,85	R\$ 117,00
Garrafas para cultivo celular 25cm ² (pct com 10)	10	R\$ 7,00	R\$ 70,00
Nistatina (100 mL)	01	R\$ 186,00	R\$ 186,00
Penicilina-Estreptomicina (100 mL)	02	R\$ 106,00	R\$ 212,00
Sulfato de magnésio (250g)	01	R\$ 326,00	R\$ 326,00
Nifedipina (1g)	01	R\$ 426,00	R\$ 426,00
VALOR TOTAL			R\$ 22.191,70

Na tabela acima estão listados os materiais necessários para o desenvolvimento do projeto e a verba direcionada a cada item. Materiais como ponteiras, microtubos, tubos tipo Falcon, lâminas e lamínulas, bem como alguns reagentes, como álcool etílico e isopropílico, já foram adquiridos e encontram-se à disposição nos laboratórios em que as técnicas serão

executadas. Os primers para os genes normalizadores também já estão disponíveis para uso.

8. Aspectos Éticos

A presente proposta está de acordo com a Resolução 466/2012 no que diz respeito a realização de pesquisa com seres humanos. O projeto será encaminhado para os Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFCSPA e do HCPA para análise e aprovação.

8.1. Riscos e Benefícios

Os riscos decorrentes da participação no projeto são moderados. O profissional que estará acompanhando as pacientes estará treinado e habilitado para fornecer informações referentes à pesquisa. O sangue será retirado por um profissional especializado podendo ocorrer a formação de um hematoma temporário devido à coleta de sangue. A equipe irá indicar medidas preventivas para que não ocorra a formação do hematoma. Caso ocorra, será indicada uma orientação médica para agilizar o processo de melhora do hematoma. Em relação à coleta do tecido placentário, o protocolo de coleta prevê a obtenção de fragmentos com a menor intervenção possível, sendo realizado de maneira ágil e com o mínimo de interferência no procedimento cirúrgico pós-parto. Existe também o risco de quebra de confidencialidade, mas os resultados do projeto serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação das participantes do estudo. Além disso, cada pesquisador assinará o termo de compromisso de utilização de dados dos pacientes, responsabilizando-se pela quebra de sigilo intencional.

No futuro, essas características que estão sendo estudadas poderão auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia e facilitar o diagnóstico e tratamento desta doença. Em relação as análises das amostras de sangue e dos tecidos coletados, não trarão benefícios diretos para as participantes.

9. Referências Bibliográficas

1. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(6):323-33.
2. Bramham K, Parnell B, Nelson-Piercy C, Seed PT, Poston L, et al. Chronic hypertension and pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014 Apr 15;348:g2301.
3. Roberts JM, August PA, Bakris G, Barton JR, Bernstein IM, Druzin M, et al. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013;122(5):1122-31.
4. World Health Organization (WHO). WHO Recommendation: Calcium Supplementation During Pregnancy for the Prevention of Pre-eclampsia and Its Complications. WHO; 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277235/9789241550451-eng.pdf>
5. Hipertensão na Gravidez: Relatório da Força-Tarefa ACOG sobre Hipertensão na Gravidez. 2013, Congresso Americano de Obstetras e Ginecologistas.
6. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L., Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA. A classificação, diagnóstico e tratamento das doenças hipertensivas da gravidez: uma declaração revista do ISSHP . *Pregnancy Hypertens* 2014; 4 : 97–104.
7. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, Gülmezoglu AM, Temmerman M, Alkema L. Global causes of maternal death: A WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2:e323–33.
8. Omotayo, M. O., Dickin, K. L., O'Brien, K. O., Neufeld, L. M., De Regil, L. M., & Stoltzfus, R. J. (2016). Calcium Supplementation to Prevent Preeclampsia: Translating Guidelines into Practice in Low-Income Countries. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 7(2), 275–278. doi: 10.3945/an.115.010736
9. Redman CW. Immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol*. 1991;15(3):257-62.
10. Serrano Díaz NC, Péz Leal MC, Martínez Linares MP, Casas Romero JP, Gil Urbano L, Navarro Mancilla AA. Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia. *MedUNAB*. 2002;5(15):185-92.
11. Gerretsen G, Huisjes HJ, Hardonk MJ, Elema JD. Trophoblast alterations in the placental bed in relation to physiological changes in spiral arteries. *Br J Obstet Gynaecol*. 1983;90(1):34-9.
12. Pacheco Romero J. Disfunción endotelial en la preeclampsia. *An Fac Med (Perú)*. 2003;64(1):43-54.
13. Jesús GR, Jesús NR, Santos FC, Oliveira CS, Levy RA, Pôrto LCM, Klumb EM. Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e seu uso na prática obstétrica atual. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2014;13(3):26-32
14. Freire CMV, Tedoldi CL. Hipertensão arterial na gestação. *Arq Bras Cardiol*, 2009; 93(6 supl.1): e110-e178

15. Baschat AA, Magder LS, Doyle LE, et al. Prediction of preeclampsia utilizing the first trimester screening examination. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2014; 211:514.e1-7
16. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*, 2002; 19(1): 103–111
17. Seeland U, Brecht A, Nauman AT, Oertelt-Prigione S, Ruecke M, Knebel F, et al. Prevalence of arterial stiffness and the risk of myocardial diastolic dysfunction in women. *Biosci Rep*. 2016;36(5):pii:e00400.
18. Manisty C, Mayet J, Tapp RJ, Parker KH, Sever P, Poulter NR, et al. Wave reflection predicts cardiovascular events in hypertensive individuals independent of blood pressure and other cardiovascular risk factors: an ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcome Trial) substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(1):24-30.
19. Patwardhan E, Heffernan KS, Ryan J, Hession M, Warner P, Karas RH, et al. Augmentation index derived from peripheral arterial tonometry correlates with cardiovascular risk factors. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:253758.
20. Verdonk K, Visser W, Van Der Meiracker AH, Danser AHJ. The renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clinical Science*, 2014; 126: 537–544
21. Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 2012 April 1; 2(2): 72–83
22. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *ACGO Pract Bull*. 2002;(33):1-9.
23. Churchill D, Duley L. Interventionist versus expectant care for severe pre-eclampsia before term. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(31):CD003106.
24. Barbosa FT, Barbosa LT, Jucá MJ, Cunha RM. Usos do sulfato de magnésio em obstetrícia e em anestesia. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 2010; 60(1)
24. Redman CW, Sargent IL. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*, 2005; vol. 308
25. Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah ÁN, Torloni MR. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018, Issue 10. Art. No.: CD001059. DOI: 10.1002/14651858.CD001059.pub5.
26. Belizan JM, Villar J. The relationship between calcium intake and edema, proteinuria, and hypertension-gestosis: an hypothesis. *American Journal of Clinical Nutrition* 1980;33:2202-10.
27. Villar J, Repke JT. Calcium supplementation during pregnancy may reduce preterm delivery in high-risk populations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990;163:1124-31.
28. Carroli G, Merialdi M, Wojdyla D, Abalos E, Campodonico L, Yao SE, et al. Effects of calcium supplementation on uteroplacental and fetoplacental blood flow in low-calcium-intake mothers: a

randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2010; Vol. 202:45.e1-45.e9.

29. Hofmeyr G, Duley L, Atallah A. Dietary calcium supplementation for prevention of pre-eclampsia and related problems: a systematic review and commentary. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* 2007;114(8):933-43.

30. Belizan JM, Villar J, Bergel E, del Pino A, Di Fulvio S, Galliano SV, et al. Long term effect of calcium supplementation during pregnancy on the blood pressure of offspring: follow up of a randomised controlled trial. *BMJ* 1997;315:281-5.

31. La and Inhibition of Potassium Current in Cerebral Vascular Smooth Muscle Is Dependent on Activation of Protein Kinase C. *The journal of biological chemistry*, 1997; 272 (43): 27345-52

32. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 Jun 21;123(24):2856-69. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853127. PMID: 21690502; PMCID: PMC3148781.

33. Leung, F. P., Yung, L. M., Yao, X., Laher, I., & Huang, Y. (2008). Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *British journal of pharmacology*, 153(5), 846–857. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707455>

34. Avila-Medina J, Mayoral-Gonzalez I, Dominguez-Rodriguez A, Gallardo-Castillo I, Ribas J, Ordoñez A, Rosado JA and Smani T (2018) The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front. Physiol.* 9:257. doi: 10.3389/fphys.2018.00257

35. Belén C, Santiago E, Sanchez A. Metabolic syndrome inhibits store-operated Ca^{2+} entry and calcium-release mechanism in Coronary artery smooth muscle. *Biochemical Pharmacology*, 2020, Vol 182, 114222. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114222

Apêndice I

Projeto: Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na fisiopatologia da pré-eclâmpsia

CheckList

Data: ____/____/____

Preenchimento de critérios de inclusão/ exclusão:

- Menor de 18 anos: [] Sim [] Não
- Diagnóstico prévio de nefropatia: [] Sim [] Não
- Diagnóstico prévio de hepatopatia: [] Sim [] Não
- Diagnóstico prévio de tireoidopatias: [] Sim [] Não
- Presença de infecções ativas: [] Sim [] Não
- Gestação múltipla: [] Sim [] Não
- Parto normal: [] Sim [] Não

Obs.: Se todas as respostas acima forem “não” a paciente estará habilitada a participar do estudo.

Material para uso:	Procedimento realizado:
Aplicação TCLE: - Termo em branco - Caneta - Pasta para arquivo	Termo de Consentimento assinado: [] Sim [] Não Data: ____/____/____ Hora: ____:____
Coleta sanguínea: - Luvas - Algodão - Álcool - Seringa - Agulha - Curativo - Tubos sem anticoagulante	Coleta sanguínea <u>antes</u> do parto: [] Sim [] Não <u>Antes</u> de intervenção medicamentosa: [] Sim [] Não Data: ____/____/____ Hora: ____:____
Coleta placentária: - Luvas - Bisturi - Pinça - Tesoura - Eppendorfs - RNA Later - Tubos Falcon - Frascos com formol	Coleta de fragmento - Eppendorf: [] Sim [] Não Coleta de fragmento - Formol: [] Sim [] Não Coleta de fragmento - Falcon: [] Sim [] Não Data: ____/____/____ Hora: ____:____

Dados de identificação:

Paciente: _____

Nº das amostras: _____

Nº Atendimento: _____ Data nascimento: ____/____/____ Idade: ____

Alocar para grupo: ☐ Controle ☐ Pré-eclâmpsia leve
☐ ☐ Pré-eclâmpsia grave

Obs.: Anexar este check-list preenchido ao TCLE.

Dados do parto:

IG: _____ Tipo de parto: ☐ PC ☐ PNSE ☐

PNCE Indicação: _____

Data: ____/____/____ Hora: ____:____

Peso placenta: _____g

Macroscopia: _____

Dados Bebê:

Peso: _____g

Apgar: ____/____ Sexo: ☐ F ☐ M

Condição nascimento: ☐ RN vigoroso ☐ Outro: _____

Necessário reanimação: ☐ Não ☐ Sim

Diagnóstico: ☐ Normal ☐ Outro: _____

Clínica Médica:

Uso de medicações contínuas: ☐ Não ☐ Sim (quais): _____

Alergias: ☐ Não ☐ Sim (quais): _____

Cirurgias prévias: ☐ Não ☐ Sim (quais): _____

Abuso de álcool: ☐ Não ☐ Sim

Fumante: ☐ Não ☐ Sim

Usuária de drogas: ☐ Não ☐ Sim

Diagnóstico:

☐ HAS ☐ HAS gestacional ☐ DM ☐ DM gestacional

☐ JPE leve ☐ JPE grave ☐ HELLP

☐ Outros: _____

Medicações em uso:

☐ MgSO₄ ☐ Ocitocina ☐ Ampicilina

☐ Outros: _____

Sinais Vitais:

ANTES do PARTO

Hora: ____:____

Temperatura: _____oC

FR: _____

FC: _____

PA máxima: _____

PA mínima: _____

APÓS o PARTO

Hora: ____:____

Temperatura: _____oC

FR: _____

FC: _____

PA máxima: _____

PA mínima: _____

Observações:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação do papel dos canais de cálcio operados por estoque na fisiopatologia da pré-eclâmpsia”**, cujo objetivo é avaliar a função de algumas proteínas relacionadas com o cálcio no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, uma doença que pode ocorrer no final da gravidez.

Este estudo está sendo realizado pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) em colaboração com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além disso, como finalidade, ele pretende identificar alguns componentes placentários que podem estar envolvidos no desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

Caso aceite, sua participação consistirá em **doar um pequeno fragmento da região do útero onde a placenta estava aderida, um pequeno fragmento da placenta fetal removida e uma amostra de sangue venoso**. A placenta - órgão que permite a nutrição de seu bebê enquanto dentro do útero - é retirada no momento do parto independentemente da realização desta pesquisa e não é aproveitada para nenhum outro propósito.

Para organização deste estudo, se você tiver diagnóstico de pré-eclâmpsia, as suas amostras serão estudadas no grupo PRÉ-ECLÂMPسيا. Se você não tiver diagnóstico de pré-eclâmpsia, as suas amostras serão estudadas no grupo CONTROLE.

Logo após o processo de consentimento, antes do seu encaminhamento para o parto, será coletada uma amostra de 10 mL de sangue por punção venosa, normalmente coletada no seu braço. Após o parto, depois do término de todos os procedimentos envolvendo o nascimento do seu filho, o médico em atendimento procederá a coleta de um pequeno fragmento da região do útero onde sua placenta estava fixada (a amostra terá o tamanho de um disco em torno de 1,5 cm de diâmetro da parte central do leito placentário ou uma amostra em forma de cunha de 1,5 cm de comprimento, ambos não mais profundos que 0,5 cm), bem como da placenta fetal removida que será descartada. Também utilizaremos informações do seu prontuário como idade, valores de pressão arterial, sintomas e medicamentos que você utiliza, além de informações do seu bebê, como sexo, peso, comprimento, Apgar. Essas informações são importantes para avaliarmos se elas têm alguma relação com os dados moleculares que estamos estudando.

Todo o material biológico coletado será utilizado exclusivamente para as análises previstas no projeto de pesquisa, a serem realizadas nos laboratórios de pesquisa da UFCSPA (exames do sangue e das amostras de tecido). Cabe salientar, que o material coletado não será armazenado. Em caso de necessidade de armazenamento, que pode acontecer apenas para aguardar a realização das análises previstas no estudo, o limite de tempo não passará de 5 anos. Se houver interesse, nesse período, de uso destas amostras para outras pesquisas, os projetos serão submetidos ao Comitê de Ética e entraremos em contato com você novamente para questionar se você concorda ou não com o uso para um novo estudo.

Os riscos ou desconfortos decorrentes da sua participação no projeto são moderados. O sangue será retirado por um profissional especializado. Pode ocorrer a formação de um hematoma temporário devido à coleta de sangue. Caso isso ocorra, será indicada uma orientação médica para agilizar o processo de melhora do hematoma.

A coleta de amostras do seu útero será feita logo antes do término do procedimento cirúrgico, após a retirada da placenta, mas não haverá nenhuma interferência no seu atendimento ou no atendimento ao seu bebê. Caso a equipe identifique **qualquer situação de risco à sua saúde na cirurgia, mesmo com o termo de consentimento assinado**, a coleta será imediatamente cancelada.

Referente às informações obtidas nos prontuários, existe o risco de quebra de confidencialidade. No entanto, o profissional que coleta estas informações está capacitado e treinado para assegurar o sigilo dos dados de identificação pessoal. Os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participam do estudo.

Os possíveis benefícios decorrentes de sua participação poderão auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia e facilitar o diagnóstico e tratamento desta doença. Em relação aos resultados das análises feitas nas amostras de sangue e dos tecidos coletados, eles não trarão benefícios diretos para você.

Em relação aos resultados das análises feitas nas amostras de sangue e dos tecidos coletados, eles não trarão benefícios diretos para você. Entretanto, essas características que estão sendo estudadas poderão futuramente auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia para que se obtenha uma melhora no tratamento e prevenção desta doença.

A senhora é livre para decidir participar ou não do estudo e sua recusa ou desistência em qualquer momento da sua participação não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento em nenhuma das instituições participantes da pesquisa, nem para o seu tratamento com o seu médico. A senhora não terá nenhuma despesa para participar do estudo, porém não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação.

Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente da participação no estudo, está previsto ressarcimento segundo as determinações do Código Civil (Lei nº 10.406 de 2002) e das Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde. Além disso, a senhora receberá uma via deste termo de consentimento e outra via ficará guardada com os pesquisadores, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Caso a senhora tenha qualquer dúvida sobre o projeto, poderá contatar os pesquisadores responsáveis por este projeto pelos telefones:

- Profa. Dra. Gisele Branchini, da UFCSPA, no telefone (51) 3303.8753 ou (51) 98140.1240, endereço Rua Sarmiento Leite, 245, Prédio 1, sala 308;
- Profa Dra. Helena von Eye Corleta, no telefone (51) 3165.583, endereço Rua Ramiro Barcelos, 910, CJ 905;
- Thaís Moura, da UFCSPA, no telefone (51) 98333.8976, endereço Rua Sarmiento Leite, 245, Prédio 1, sala 308.

Este projeto foi revisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA e do HCPA, sendo que a senhora poderá entrar em contato com os CEP para esclarecimentos se assim desejar:

CEP UFCSPA: Rua Sarmiento Leite, 245, Prédio 3, sala 407, ou pelo telefone (51) 3303.8804, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira.

CEP HCPA: Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, sala 2229, ou pelo telefone (51) 3359.7640, das 8h às 17h.

- 1) Li e entendi todas as informações deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- 2) Tive oportunidade de ter todas as minhas dúvidas esclarecidas satisfatoriamente;
- 3) Concordo voluntariamente em participar deste projeto de pesquisa;
- 4) Compreendo que minha participação é voluntária e que tenho liberdade de sair do estudo em qualquer momento, independente do motivo e sem que isso interfira no meu cuidado médico;
- 5) Receberei uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado

e datado.

Nome da Participante na Pesquisa: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Nome do Responsável por obter o TCLE: _____

Assinatura : _____ Data: ____/____/____

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

**Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA
em gliomas**

Projeto de Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Patologia UFCSPA

Orientadora: Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima

Co-orientadora: Dra. Miriam da Costa Oliveira

Resumo

Os gliomas incluem vários tipos de tumores com perfis moleculares e histológicos distintos, o que sugere diferentes etiologias. Os gliomas correspondem a 80% dos tumores malignos de sistema nervoso central. Apesar do progresso na caracterização da patogênese dos gliomas, estes tumores permanecem incuráveis e, na maioria dos casos, refratários ao tratamento devido à sua heterogeneidade. Os polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) são reconhecidos como importantes ferramentas na genética humana e médica e têm sido amplamente estudados. Os SNPs podem levar à produção defeituosa das proteínas, acarretando seu mau funcionamento e desempenho. Este trabalho tem como objetivos avaliar frequência dos polimorfismos e a expressão imuno-histoquímica do XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) em gliomas. O estudo será realizado com pacientes do Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), instituição conveniada à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

1. Introdução

1.1. Gliomas

Gliomas são os tumores intracranianos primários malignos mais comuns em adultos, podem se desenvolver em qualquer parte do sistema nervoso central (SNC), ocorrem principalmente no cérebro, surgindo na glia (Ostrom e cols., 2015; Harris, 2015). A glia é formada por quatro células principais: astrócitos, oligodendrócitos, microglia e ependima. Os astrócitos e os oligodendrócitos têm como função dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. A microglia tem função específica de defesa contra invasões externas. O epêndima tem função de revestimento das cavidades ventriculares encefálicas e do canal medular, participando da dinâmica do fluxo liquórico (Cohen e Pfaff, 2003; Liu, 2007). Os gliomas são classificados, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em graus que variam de I a IV, com base no comportamento maligno. O grau I é atribuído aos tumores mais delimitados, com baixo potencial proliferativo, o grau II aos tumores com forma difusa e infiltrativa com atípia citológica isolada, o grau III aos tumores que mostram anaplasia e aumento do potencial proliferativo e o grau IV (glioblastomas) aos tumores que, além dessas características, mostram elevada proliferação e/ou necrose microvascular (Louis e cols., 2007).

Os gliomas correspondem a 80% dos tumores malignos e a 27% de todos os tumores primários de SNC. São 1,3 vezes mais diagnosticados em homens do que em mulheres (INCA, 2014; Ostrom e cols., 2015). Em relação ao tipo histológico, o glioblastoma (grau IV) é o mais frequente (55,1%), seguido pelo astrocitoma difuso (grau II) (8,6%). Os gliomas de baixo grau (graus I e II) têm um pico de incidência entre a terceira e quarta década de vida, enquanto que os gliomas de alto grau (graus III e IV) têm este pico após a sétima década (Dolecek e cols, 2012; Ostrom e cols, 2013).

Alguns gliomas não causam quaisquer sintomas e podem ser achados incidentais. Os sintomas, quando presentes, surgem lentamente e são causados principalmente pelo aumento da pressão intracraniana, como cefaleia, convulsões, mudanças de comportamento, náuseas, vômitos e perda da visão (Jhons Hopkins, 2015).

Como a maioria dos tumores cerebrais, a causa dos gliomas é

desconhecida, mas alguns fatores podem aumentar o risco de desenvolver tais tumores. Os gliomas são mais comuns com o aumento da idade (Ostrom e cols., 2014). As síndromes hereditárias como a neurofibromatose tipo I e II, síndrome de Lynch, síndrome de Li-Fraumeni, entre outras, estão associadas com o aumento da incidência dos gliomas (Goodenberger e Jenkins, 2012). A radiação ionizante e a exposição a campos eletromagnéticos de radiofrequência de telefones celulares e sem fio estão envolvidas com o desenvolvimento desses tumores em pacientes jovens (Braganza e cols., 2012; Hardel e Carlberg, 2015). Os polimorfismos em genes de reparo de DNA têm demonstrado um importante papel na tumorigênese dos gliomas (Luo e cols., 2013).

1.2. Polimorfismos do DNA e associação com gliomas

Tumores humanos podem se desenvolver através de danos ao DNA causados pelos raios ultravioletas, radiação ionizante e agentes químicos. Neste contexto, genes de reparo desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade genômica por meio de diferentes vias e são fundamentais para a vida celular (Kawabata et al., 2005; Sreeja e cols., 2008). Para garantir a integridade do genoma, o reparo por excisão de base é o primeiro mecanismo de defesa da célula contra danos no DNA, sendo um evento importante para impedir a mutagênese (Hu et al., 2005).

Os SNPs que resultam na mudança de aminoácidos levam à disfunção da proteína produzida, podendo esta ficar superexpressa ou totalmente sem função (Klepstad, 2009). Os SNPs são reconhecidos como importantes ferramentas da genética humana e medicina e têm sido amplamente utilizados em estudos de associação de várias doenças genéticas complexas, como distúrbios cardiovasculares, psiquiátricos, auto-imunes, obesidade, osteoporose, diabetes e câncer (Curran e cols., 2001; Miller e Kwok, 2001; Lin e cols., 2003; Tamura e cols., 2003; Yamada e cols., 2003; Hirai e cols., 2005).

O risco de gliomas tem sido associado com SNPs em genes de reparo do DNA como XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) (Ladiges, 2006; Goode e cols., 2002; Shete e cols., 2009; Wrensch e cols., 2009; Liu e cols., 2011; Custódio e cols., 2011).

1.3. Genes XRCC (X-ray cross complementing group)

Os genes XRCC desempenham um papel importante na compreensão dos processos de reparação do DNA de mamíferos, especialmente aqueles envolvidos no reparo das quebras de fita dupla. A maioria destes genes foi identificada por sua capacidade de corrigir danos ao DNA e de agir como componentes de várias vias, como na do reparo por excisão de bases e na recombinação homóloga e não homóloga. Além da importância contínua em identificar mecanismos de reparo do DNA, a análise dos genes XRCC contribui para a compreensão de doenças humanas específicas, incluindo câncer.

2. Justificativa

Os gliomas na sua maioria possuem comportamento maligno, a patogênese destes tumores vem sendo alvo de investigações. O estudo de marcadores moleculares de reparo do DNA é importante, pois identifica fatores associados à regulação do crescimento, invasividade e recorrência tumoral.

Em nosso estudo, avaliaremos a frequência dos polimorfismos em casos e controles e a expressão imuno-histoquímica dos marcadores: XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) e sua associação com o risco de gliomas, o que pode proporcionar novas abordagens terapêuticas, permitindo estratégias mais eficazes para o tratamento de tais tumores.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar os polimorfismos e a expressão imuno-histoquímica de XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) em gliomas.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar a presença dos polimorfismos XRCC1 (Arg399Gln, Arg194Trp e Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) e XRCC4 (G1394T) em amostras de pacientes com gliomas e controles através da técnica de PCR em tempo real.
- 2) Avaliar a expressão das proteínas XRCC1, XRCC2, XRCC3 e XRCC4 através da técnica de imuno-histoquímica.

- 3) Verificar a associação entre os polimorfismos e a expressão imuno- histoquímica.
- 4) Associar os resultados obtidos com as variáveis: sexo, idade, tipo histológico, sintomas, localização, tamanho do tumor e taxa de sobrevida livre de doença.
- 5)

4. Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Delineamento do Estudo

Estudo caso-controle.

4.1.2 Pacientes e controles

Serão incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos internados com diagnóstico pré-operatório de tumor primário do SNC submetidos à neurocirurgia no Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e com diagnóstico anátomo-patológico confirmatório de glioma, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1). Serão excluídos do trabalho pacientes com idade inferior a 18 anos, aqueles que não tenham assinado o TCLE, bem como pacientes com diagnóstico anátomo-patológico que não contemplem os gliomas.

Os indivíduos controles serão convidados a participar da pesquisa através de meios virtuais e cartazes afixados nos murais informativos da UFCSPA (anexo 2). Serão selecionados indivíduos, para o grupo controle, maiores de 18 anos, sem histórico familiar de tumor cerebral em parentes de primeiro grau, mediante assinatura do TCLE (anexo 3) e preenchimento da ficha de coleta de dados (anexo 4).

4.1.3 Local a ser realizado

O estudo será realizado com pacientes do Hospital São José da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), instituição conveniada à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). As amostras de sangue dos indivíduos controles serão coletadas na sala de coleta do segundo andar do prédio II na UFCSPA. As análises serão realizadas no laboratório de Biologia Molecular e no laboratório de Patologia da UFCSPA.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico será extraído de sangue periférico utilizando-se o kit comercial DNA Purelink Genomic (Invitrogen). A quantificação do DNA será feita através do aparelho NanoSpec. Após a quantificação o DNA será diluído a fim de atingir a concentração de 10ng/μl para todas as amostras.

4.2.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) com ensaios de detecção por sonda de hidrólise

Será utilizado o equipamento de PCR, StepOnePlus (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), que permite o processamento de DNA em placas de 96 poços. Para preparação da reação de PCR, será utilizado para cada amostra: 5μl de TaqMan Genotyping Master Mix (conjunto de reagentes otimizados para genotipagem de SNPs, incluindo AmpliTaq Gold DNA polimerase, dNTPs sem dUTP, referência passiva e mix de componentes otimizados); 3,5 μL de água MilliQ; 1μL de amostra DNA em concentração 10 ng/μL; 0,25μL de TaqMan SNP Genotyping Assays (duas sequências de primers específicos, para amplificar o polimorfismo de interesse; e duas sondas alelo-específicas TaqMan MGB, para detectar os alelos do polimorfismo de interesse) (Applied BiosystemsCalifórnia, EUA).

4.2.2 Técnica de imuno-histoquímica (IH)

Para o estudo imuno-histoquímico, o material obtido da ressecção cirúrgica será fixado com formalina tamponada a 10% e incluído em parafina. Será seccionado em espessura de 4 μm e o material montado em lâminas de vidro preparadas com organosilano. Os cortes serão submetidos à técnica de imuno-histoquímica para avaliação da expressão das proteínas XRCC1, XRCC2, XRCC3 E XRCC4.

5. Cronograma

- Inclusão de pacientes, recolhimento e armazenamento adequado do material de estudo;
- Treinamento da técnica de imuno-histoquímica, para determinação da expressão dos marcadores em gliomas e leitura das lâminas e quantificação da imuno-histoquímica;
- Atuação no laboratório de Biologia Molecular para aplicação da técnica de PCR em tempo real; e tabulação dos dados obtidos através da análise das lâminas e da PCR em tempo real;
- Revisão de prontuários dos pacientes que forneceram as amostras;
- Redação de relatório de resultados para apreciação do CEP, arquivamento e envio para conhecimento dos órgãos competentes;
- Análise estatística dos resultados;
- Atualização constante da bibliografia pertinente ao estudo;
- Participação na elaboração de material para a apresentação dos resultados parciais e finais em eventos científicos, bem como da elaboração do manuscrito para a publicação.

[illegible]

6. Orçamento

O orçamento do projeto será submetido à agência de fomento para incentivo a pesquisa sendo absorvido pelo Grupo de Pesquisa do Centro de Neuroendocrinologia da ISCMPA/UFCSPA. Não haverá ônus para à ISCMPA.

Reagentes utilizados para a técnica de PCR em tempo real			
Produto	Valor unit.	Quantidade	Valor total
Tubo Hemo Roxo EDTA K2 Pacote com 100 Unds	R\$ 45,50	2	R\$ 91,00
PURELINK KIT DE PURIFICACAO DE DNA GENOMICO - Life Technologies - 50 preparações	R\$ 607,00	2	R\$ 1.214,00
TaqMan® Genotyping Master Mix	R\$ 333,54	3	R\$ 1.000,62
Água MilliQ	-	-	Já adquirido
TaqMan® SNP Genotyping Assays	1.107,00	6	R\$ 6.642,00
Placas para PCR 96 poços	-	10	Já adquirido
Filme para placa	-	10	Já adquirido
Luva VersaTouch caixa com 100 unidades	-	10	Já adquirido
Ponteira 0,1-10 ul sem filtro - Cral - pct. 1000	-	5	Já adquirido
Ponteiras P200, amarelas, RNase e DNase free, volume de 10 a 200 microlitros - Greiner - 2 pacotes de 500 unidades (1000 unid)	-	5	Já adquirido
Reagentes utilizados para a técnica de imuno-histoquímica			
Produto	Valor unitário	Quantidade	Valor total
Kit Anticorpo monoclonal anti- XRCC1	R\$ 3083,00	1	R\$ 3083,00
Kit Anticorpo monoclonal anti- XRCC2	R\$ 2877,00	1	R\$ 2877,00
Kit Anticorpo monoclonal anti- XRCC3	R\$ 2961,00	1	R\$ 2961,00
Kit Anticorpo monoclonal anti-XRCC4	R\$ 2877,00	1	R\$ 2877,00
Lâminas silanizadas (caixa com 50 unidades)	R\$50	8	R\$400,00
Kit anticorpo secundário e DAB	-	1	Já adquirido
Total			R\$ 21.145,62

Os materiais apresentados como “já adquiridos” foram comprados para projetos já realizados ou fazem parte do estoque e são utilizados como rotina no grupo de pesquisa.

Todos os equipamentos que serão utilizados já foram adquiridos pelos respectivos laboratórios e fazem parte da rotina.

7. Referências

Braganza MZ, Kitahara CM, Berrington de González A, Inskip PD, Johnson KJ, et al. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol.* 2012;14:1316-24.

Cohen RS, Pfaff DW. Cytology and Organization of Cell Types: Light and Electron Microscopy. In: *Neuroscience in Medicine*, Second Edition. Humana Press; Oregon-USA, 2003.

Curran JE, Lea RA, Rutherford S, Weinstein SR, Griffiths LR. Association of estrogen receptor and glucocorticoid receptor gene polymorphisms with sporadic breast cancer. *Int J Cancer.* 2001;95:271-5.

Custódio AC, Almeida LO, Pinto GR, Santos MJ, Almeida JRW, Clara CA, Rey JA, Casartelli C. Analysis of the polymorphisms XRCC1Arg194Trp and XRCC1Arg399Gln in gliomas. *Genet Mol Res.* 2011;10:1120-9.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro Oncol.* 2012;14 v1-v49.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1513-30.

Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 2012;205:613-21.

Harris RE. *Global Epidemiology of Cancer*. Jones and Bartlett Publishers, Inc; First edition. Illinois-USA, 2015.

Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki C. WRN gene 1367 Arg allele protects against development of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69:287-92.

Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1810-8.

INCA, Estimativa. Incidência do Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2014;20.

Johns Hopkins Medicine. Neurology and Neurosurgery. Em: <http://www.hopkinsmedicine.org/neurology_neurosurgery/centers_clinics/brain_tumor/center/glioma/types/>. Acesso em 13 de novembro de 2015, às 17:40.

Kawabata M, Kawabata T, Nishibori M. Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama.* 2005;59:1-9.

Klepstad P. Pharmacogenetic considerations in the treatment of cancer pain. In: *Cancer Pain*, Portenoy RK, Bruera ED. Cambridge-USA, 2009.

Ladiges WC. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer.

Oncogene. 2006;25:1612-9.

Lin RC, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ. Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obes Res.* 2003;11:802-8.

Liu L, Yuan P, Liu L, Wu C, Zhang X, Guo H, et al. A functional -77T>C polymorphism in XRCC1 is associated with risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:479-87.

Liu SQ. Nervous Regenerative Engineering. In: *Bioregenerative Engineering: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, 2007.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.

Luo KQ, Mu SQ, Wu ZX, Shi YN, Peng JC. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of glioma and meningioma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:449-52.

Miller RD, Kwok PY. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2195-8.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro-oncol.* 2013;15:ii1–56.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014;16:896-913.

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncol.* 2015;17:iv1–iv62.

Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):899-904.

Sreeja L, Syamala VS, Syamala V, Hariharan S, Raveendran PB, Vijayalekshmi RV, et al. Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:645-52.

Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A. Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;131:33-8.

Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS, Yeh RF, Xiao Y, Decker PA, et al. Variants in the

CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. Nat Genet. 2009;41:905-8.

Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of polymorphisms of interleukin-6, osteocalcin, and vitamin D receptor genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88:3372-8.

8. Anexos

10.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

10.2 Cartaz

10.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controles

10.4 Ficha de Dados

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas Versão 1 (data: 23/11/2015)

(Nome completo do PACIENTE – preencher em letra de forma)

Os gliomas são os tumores malignos mais comuns do sistema nervoso central. Apesar do progresso nas pesquisas, estes tumores permanecem sem cura e, na maioria dos casos, resistentes aos tratamentos.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas”, que objetiva ampliar os conhecimentos a respeito dos mecanismos relacionados à evolução deste tipo de tumor.

No dia anterior à cirurgia, serão coletadas amostras de sangue como procedimento de rotina, será separada uma parte de 4ml para esta pesquisa. Este material será encaminhado ao laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre para análises. O material retirado durante a cirurgia (o tumor) será encaminhado ao laboratório de patologia do hospital para identificação do tipo de tumor (procedimento de rotina), após este procedimento, o material será utilizado para o presente estudo, a análise será realizada no laboratório de patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Os dados clínicos serão obtidos através dos prontuários médicos.

Ao participar desta pesquisa o voluntário não terá benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os gliomas, proporcionando uma investigação mais detalhada e ajudando os mais pacientes.

Não será realizado nenhum procedimento além dos de rotina, não havendo riscos médicos adicionais aos procedimentos.

É garantido que todo o material coletado será analisado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre não gerando ônus ao paciente e à Santa Casa. Os gastos para a realização da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo e você não receberá nenhuma compensação financeira por participar.

É dada à liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa, sem que isso traga prejuízos. Ressaltamos que a concordância ou não em participar desse estudo não implica em qualquer modificação no tratamento médico já estabelecido, visto que se trata de uma participação voluntária.

É dada a garantia da não identificação do paciente e de ser mantido o caráter confidencial das informações em todas as etapas da pesquisa. Os dados serão utilizados apenas pela equipe da pesquisa e autoridades regulatórias da área da saúde. É assumido o compromisso de fornecer ao paciente informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a sua vontade em continuar participando.

Para casos de eventos adversos ou dúvidas referentes à pesquisa deve ser contatada a *Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima* (investigador principal) pelo telefone (51) 3303.8779. Para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa deve ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação Dr. Carlos Olea, telefone 3214.8571 e email cep@santacasa.tche.br e/ou o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pelo telefone (51) 3303-8804.

Estou ciente que não serão violados os segredos profissionais obtidos durante a pesquisa e autorizo a utilização do material coletado para futuras pesquisas. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima. A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização ao coordenador do estudo, aos Comitês de Ética do hospital e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, e à organização governamental de saúde para utilização dos dados obtidos quando necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Nome do Sujeito de Pesquisa (letra de forma)

Data

Assinatura do Sujeito de Pesquisa

Nome do Pesquisador responsável (letra de forma)

Data

Assinatura do Pesquisador responsável

CONVITE

Convidamos você a participar da pesquisa intitulada:

“Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas”

Os gliomas são os tumores malignos mais comuns do sistema nervoso central. Apesar do progresso nas pesquisas, estes tumores permanecem sem cura e, na maioria dos casos, são resistentes aos tratamentos.

Participando desta pesquisa, você estará contribuindo para o maior conhecimento sobre a origem dos gliomas.

Requisitos para participar:

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Maiores de 18 anos, sem histórico de tumor cerebral em parente de 1º grau (pai, mãe, filho (a), irmão (ã));
- Será colhida uma amostra de sangue (4 ml), não é necessário jejum;
- Você preencherá uma ficha de dados.

Data: ____/____/____

Horário: ____:____

Local: Sala de Coleta UFCSPA (2º andar do prédio 2)

Pesquisador responsável: Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima

AGUARDAMOS VOCÊ!

A ciência agradece!

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controle)
Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas Versão
1 (data: 23/11/2015)

(Nome completo – preencher em letra de forma)

Os gliomas são os tumores malignos mais comuns do sistema nervoso central. Apesar do progresso nas pesquisas, estes tumores permanecem sem cura e, na maioria dos casos, resistentes aos tratamentos.

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Análise de polimorfismos e expressão de marcadores associados ao reparo de DNA em gliomas”, que objetiva ampliar os conhecimentos a respeito dos mecanismos relacionados à evolução deste tipo de tumor.

Será coletada amostra de sangue (4 ml) por profissional da saúde habilitado, com material adequado para evitar qualquer tipo de contaminação e dano ao participante (tempo da coleta: 15 minutos). Este material será encaminhado ao laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre onde será analisado. Haverá o preenchimento de uma ficha de dados (tempo de preenchimento: 5 minutos)

Ao participar desta pesquisa o voluntário não terá benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os gliomas, proporcionando uma investigação mais detalhada destes tumores e ajudando mais pacientes.

A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde do voluntário. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tontura durante ou após o procedimento. Para minimizar esse acontecimento, você será orientado a permanecer sentado durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar.

É garantido que todo o material coletado será analisado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre não gerando ônus ao voluntário. Os gastos para a realização da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo e você não receberá nenhuma compensação financeira por participar.

É dada a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa, sem que isso traga prejuízos.

É dada a garantia da não identificação do voluntário e de ser mantido o caráter confidencial das informações em todas as etapas da pesquisa. Os dados serão utilizados apenas pela equipe de pesquisa e autoridades regulatórias da área da saúde.

Para casos de eventos adversos ou dúvidas referentes à pesquisa deve ser contatada a *Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima* (investigador principal) pelo telefone (51) 3303.8779. Para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa deve ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação Dr. Carlos Olea, telefone 3214.8571 e email cep@santacasa.tche.br e/ou o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pelo telefone (51) 3303-8804.

Declaro que não sou parente de primeiro grau (pai, mãe, filho(a), irmão(ã)) com diagnóstico de tumor cerebral. Estou ciente que não serão violados os segredos profissionais obtidos durante a pesquisa e autorizo a utilização do material coletado para futuras pesquisas. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima. A minha assinatura neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dará autorização ao coordenador do estudo, aos Comitês de Ética do hospital e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, e à organização governamental de saúde para utilização dos dados obtidos quando necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Nome do voluntário (letra de forma)

Data

Assinatura do voluntário

Nome do Pesquisador responsável (letra de forma)

Data

Assinatura do Pesquisador responsável

FICHA DE COLETA DE DADOS

Nome completo: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Idade: _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Telefone para contato: _____

Endereço: _____

E-mail: _____

I) IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

a) Título do Projeto: Efeitos *in vitro* e *in vivo* de análogos do GLP-1 sobre a neurogênese e gliogênese: ênfase na neuroinflamação, amnésia e neurodegeneração

Proponente: Profa. Dra. Marilda da Cruz Fernandes

b) RESUMO

Nesse projeto, temos o interesse em investigar os mecanismos neuroprotetores e/ou glioprotetores relacionados ao peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) no sistema nervoso central (SNC), principalmente no estudo das vias que regulam o comportamento e a memória em condições normais e patológicas, como na doença de Alzheimer. É nessa perspectiva, que este projeto tem o seu foco, ou seja, investigar os mecanismos de ação da exenatida e da liraglutida (análogos do GLP-1) no SNC, principalmente avaliando a neurogênese e a gliogênese em diferentes regiões cerebrais, bem como entender os potenciais efeitos dessas duas drogas tanto no aprendizado quanto na formação da memória. Outro aspecto relevante, é que um estudo mais detalhado da participação da glia mediando esses efeitos não foram realizados em detalhe, e pretendemos com estratégias *in vitro* e *in vivo* trazer evidências com relação a participação dos astrócitos nesse processo.

b.1) Palavras Chaves Indexadas: Análogos do GLP-1, neurogênese, gliogênese, metabolismo cerebral, exenatida, liraglutida

II) DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE:

a) PROPONENTE: Profa. Dra. Marilda da Cruz Fernandes (UFCSA).

b) COLABORADORES:

- Profa. Dra. Paula Maria Garcia Agostinho (Universidade de Coimbra, Portugal)
- Profa. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM, PQ 1B CNPq)
- Profa. Dra. Rosélia Maria Spanevello (UFPEL, PQ 1D CNPq)
- Dr. Jessié Martins Gutierrez (Posdoc UFCSA)

c) INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

- i) Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)
- ii) Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)
- iii) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
- iv) Universidade de Coimbra, Portugal

III) CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

A pesquisa sobre a demência de Alzheimer, principalmente no nosso estado, levando em consideração as tentativas malsucedidas dos estudos clínicos com essa patologia no mundo, abre caminho para a avaliação de outros mecanismos que podem estar associados ao desenvolvimento dessa doença. Para ter uma melhor chance de sucesso, os esforços de pesquisa sobre demências precisam de aportes financeiros substanciais, seja para estudos na pesquisa básica, envolvendo desenhos experimentais inovadores com cobaias, ou mesmo estudos mecanicistas *in vitro* e em uma última etapa, estudos clínicos.

A descoberta por novas drogas é um caminho natural, no entanto, estudar outros mecanismo adjacentes a essa condição patológica é uma oportunidade única. Nesse projeto, temos o interesse em investigar os mecanismos neuroprotetores e/ou glioprotetores relacionados ao peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) no sistema nervoso central (SNC), principalmente no estudo das vias que regulam o comportamento e a memória em condições normais e patológicas, como na doença de Alzheimer. O projeto torna-se relevante, na medida em que tematiza dissertações de mestrado e teses doutorado, ou seja, qualificando e formando recursos humanos capazes de dar continuidade a essa linha de estudos na nossa instituição e nas instituições co-irmãs, bem como tornar esse campo mais frutífero e possibilitar que pesquisas dessa natureza, possam aprofundar mecanismos de ação de incretinomiméticos para futuros ensaios clínicos.

O GLP-1 é um peptídeo semelhante ao glucagon que regula a secreção de glicose dependente de insulina e glucagon. Ele atua ligando-se e ativando os receptores que são expressos nas ilhotas do pâncreas, no coração, no fígado, na vascularização e no SNC. Também tem efeitos extra pancreáticos como a saciedade, a ingestão de alimentos, no metabolismo energético e no sistema cardiovascular. Agonistas do receptor GLP-1 tornaram-se basilares no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, particularmente em pacientes com doença aterosclerótica (American Diabetes Association, 2018).

Muitos dos efeitos do GLP-1 são mediados por meio de ações em várias partes do cérebro. A manipulação da ação do GLP-1 do cérebro altera claramente o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina, mas os receptores do GLP-1 do cérebro não são necessários para o controle normal da glicose (Cabou *et al.*, 2011; Sandoval e Sisley, 2015). Os receptores GLP-1 são expressos em várias regiões do cérebro de humanos, primatas e roedores, incluindo cerebelo, córtex, hipocampo e hipotálamo (Alvarez *et al.*, 2005; Hamilton e

Hölscher, 2009; Cork *et al.*, 2015; Heppner *et al.*, 2015). O acúmulo de evidências sugere que os receptores GLP-1 do cérebro medeiam a neuroproteção do GLP-1 e muitas funções autonômicas e neuroendócrinas (During *et al.*, 2003; Kinzig *et al.*, 2003). O GLP-1 derivado do cérebro, produzido em neurônios pré-proglucagon localizados no núcleo do trato solitário e se projetando para várias regiões do cérebro, demonstrou controlar uma gama de respostas de alimentação e balanço de energia (Trapp e Richards, 2013). Além disso, os análogos do GLP-1 administrados periféricamente, como liraglutide e Val(8)-GLP-1, podem reduzir a formação da placa amilóide, prevenir o comprometimento da memória e perda de sinapses no hipocampo e resgatar a plasticidade sináptica em um modelo animal para doença de Alzheimer em camundongos (McClean *et al.*, 2011; Gengler *et al.*, 2012) e proteger contra o comprometimento induzido por A β 1-40 da potenciação de longo prazo, de fase tardia, do hipocampo e aprendizagem espacial em ratos (Wang *et al.*, 2010).

Para que o GLP-1 circulante (ou análogos do GLP-1) atue nos neurônios, ele deve primeiro cruzar a barreira hematoencefálica (BBB) para alcançar o compartimento do fluido intersticial cerebral. A BBB não serve apenas como uma barreira, mas também fornece área de superfície de troca endotelial para substratos, como oxigênio, nutrientes e hormônios para acessar neurônios e astrócitos. Os análogos do GLP-1 injetados periféricamente parecem entrar rapidamente (em 5 minutos) no cérebro de uma forma dependente do tempo (Kastin e Akerstrom, 2003). Os peptídeos cruzam a BBB por meio de vias vesiculares transcelulares que podem ser constitutivas ou reguladas. A entrada de 125 I-exendina-4 no cérebro é inibida por altas concentrações de exendina-4 não marcada, sugerindo um processo saturável (Kastin e Akerstrom, 2003). Isso é semelhante à leptina (Banks *et al.*, 1996) e à insulina (Gray *et al.*, 2014; Meijer *et al.*, 2016), dois hormônios reguladores do apetite secretados periféricamente que entram no cérebro. A exendina-4 é um poderoso análogo do GLP-1, no entanto seu custo é alto. Além disso, existem poucos estudos que avaliam outros análogos do GLP-1 e que são comparavelmente mais baratos do mercado e, considerando respostas a desafios relacionados aos processos de neurodegeneração, disfunção sobre o aprendizado e memória ou mesmo neuroinflamação, ainda não foram completamente elucidados. É nessa perspectiva, que este projeto tem o seu foco, ou seja, investigar os mecanismos de ação da exenatida e da liraglutida no SNC, principalmente avaliando a neurogênese e a gliogênese em diferentes regiões cerebrais, bem como entender os potenciais efeitos desses outros análogos do GLP-1, tanto no aprendizado quanto na formação da memória. Outro aspecto relevante, é que um estudo mais detalhado da participação da glia mediando esses efeitos não foram realizados em detalhe, e pretendemos com estratégias *in vitro* e *in vivo* trazer evidências com relação a participação dos astrócitos nesse processo.

IV) OBJETIVOS

a) Objetivo geral

O objetivo será investigar os mecanismos neuroprotetores de análogos do GLP-1 (Exenatida e Liraglutida) *in vitro* e *in vivo*, avaliação da neurogênese e gliogênese em diferentes regiões cerebrais, memória e aprendizado em diferentes modelos animais.

b) Objetivos específicos:

Em estudos *in vitro* utilizando os análogos do GLP-1, serão avaliados:

- Viabilidade celular (MTT assay), Proliferação celular, Morte celular – (Caspase-3 clivada, IP)
- Marcadores inflamatórios (S100B), Marcadores de astrócitos em diferentes fases de ativação (GFAP, EAAT1/GLAST, Sox-9)

Em estudos *in vivo* utilizando os análogos do GLP-1, serão avaliados:

- Parâmetros comportamentais de locomoção, ansiedade, bem como de memória de curta e longa duração;
- Avaliar os marcadores inflamatórios (S100B), interleucinas, apoptose e necrose (Caspase-3 clivada) em diferentes regiões do encéfalo;
- Investigar marcadores de astrócitos em diferentes fases de ativação (GFAP, EAAT1/GLAST, Sox-9), neurônios adultos (NeuN), neurônios imaturos (Doublecortina) e sinaptogênese e plasticidade (Sinaptofisina, TrKB, PSD-95) e proliferação celular (PCNA) em diferentes regiões do encéfalo;
- Investigar a distribuição de receptores para o GLP-1 e Insulina (IR), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), bem como a sua co-localização com o receptor de Insulina (IR), GLP-1R, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5HT_{2C} através de imunofluorescência em diferentes regiões do encéfalo;

V) METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

a) Aspectos éticos

Todos os procedimentos com animais já foram encaminhados e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

b) Animais

Neste estudo serão utilizados ratos *Wistar* machos (n= 60; 60 dias; 250g ± 5g). Os animais serão adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e serão mantidos em condições padrão em um ambiente com temperatura controlada (23°C ± 1) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. Já para a cultura primária de astrócitos serão obtidos ratos neonatos de 1 a 2 dias de idade (n=10), esses animais serão adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

c) Delineamento experimental

O delineamento experimental está dividido em 2 protocolos:

c.1) Protocolo I (*in vitro*):

No primeiro protocolo serão realizados estudos *in vitro* utilizando cultura primária de astrócitos. Para isso, será realizado uma curva de dose (10, 100, 1000 e 10000 nM) usando os análogos do GLP-1 (Exenatida e Liraglutida) em uma incubação de 30 minutos, as células serão desafiadas com lipopolissacarídeo por um período de 5 horas (LPS, dose 200 ng/ml de acordo com Ryu *et al.* (2019), e serão avaliados na sequência parâmetros de sobrevivência, morte celular, proliferação e avaliações imunocitoquímicas. Após, será definida a melhor dose resposta e realizado um segundo experimento usando o peptídeo beta amiloide (AB 1-42) em cultura de acordo com Jorda *et al.* (2020) com subsequente avaliação dos mesmos parâmetros, conforme a divisão de grupos a seguir: **Grupo 1:** Veículo (1% DMSO) (n=4); **Grupo 2:** AB 1-42 (15uM) (n=4); **Grupo 3:** Liraglutida (n=4); **Grupo 4:** Exendina (n=4)

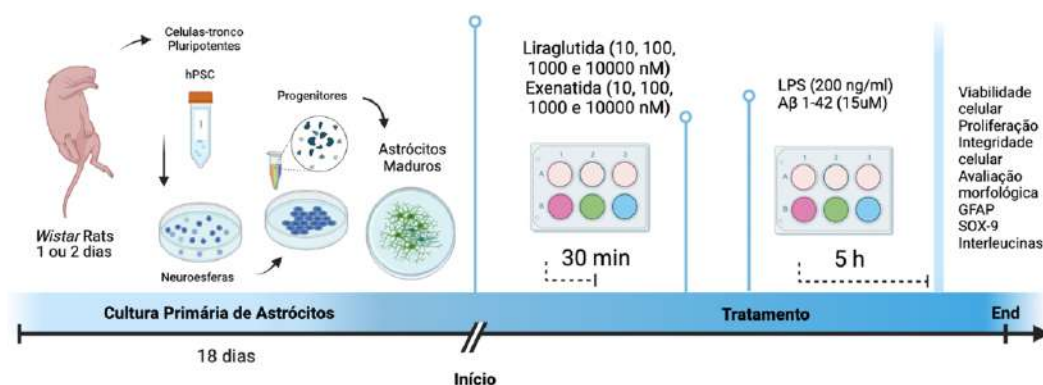


Figura 1 - Esquema experimental dos protocolos I e II

c.2) Protocolo II (Modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer induzido por estreptozotocina, STZ)

Os animais serão tratados com Exenatida por via subcutânea (Sc), na dose de 10 µg/kg/dia, dissolvida em água destilada esterilizada (0.2 ml) de acordo com Tao *et al.* (2019), e o tratamento com Liraglutida será realizado por via intraperitoneal (IP), na dose de 200 µg/kg/dia, dissolvida em 0.9% de salina (1ml/kg), de acordo com Zeng *et al.* (2019). Os animais serão anestesiados e após o efeito, será feita a raspagem dos pelos da cabeça do animal antes de serem colocados no estereotático. Será injetado 0,2 mL de lidocaína no local da raspagem do periosteio, e após serão realizados dois orifícios

bilaterais com uma broca, seguindo as coordenadas estereotáticas dos ventrículos laterais, conforme Paxinos e Watson (0,9 mm no eixo anteroposterior, 1,5 mm no eixo médio-lateral e 3,6 mm no eixo dorsoventral). Depois do procedimento estereotático inicial, com uma seringa de Hamilton, será injetado bilateralmente a droga estreptozotocina (STZ, 3 mg/kg) que será dissolvida em líquido cefalorraquidiano artificial (FCSA) (5 μ L/ventrículo). Animais controles receberão apenas o veículo FCSA (147 mM NaCl; 2,9 mM KCl; 1,6 mM MgCl₂, 1,7 mM CaCl₂ e 2,2 mM dextrose). Após a cirurgia os animais serão mantidos a 37° C e depois de retomarem a consciência serão colocados novamente na caixa moradia com água e comida *ad libitum*. Para determinar os efeitos dos análogos do GLP-1, caso da Exenatida (10 μ g/kg/dia) e Liraglutida (200 μ g/kg/dia) sobre a degeneração neuronal e reatividade glial causada pelo STZ nas regiões do hipocampo, locus coeruleus e córtex entorinal, os animais serão distribuídos randomicamente em seis grupos principais e tratados durante 30 dias. Na semana anterior a eutanásia os animais serão treinados e testados em tarefas comportamentais que envolvem memória (Labirinto em Y e Reconhecimento de Objetos) e atividade locomotora (Campo Aberto) e memória espacial (Morris Water Maze). Divisão dos grupos: **Grupo 1:** Veículo (Salina 0.9%)(n=10); **Grupo 2:** STZ icv bilateral (3 mg/kg)(n=10); **Grupo 3:** Exenatida 10 μ g/kg (n=10); **Grupo 4:** Liraglutida (200 μ g /kg) (n=10); **Grupo 5:** STZ + Exenatida 10 μ g/kg (n=10); **Grupo 6:** STZ + Liraglutida 200 μ g/kg (n=10)

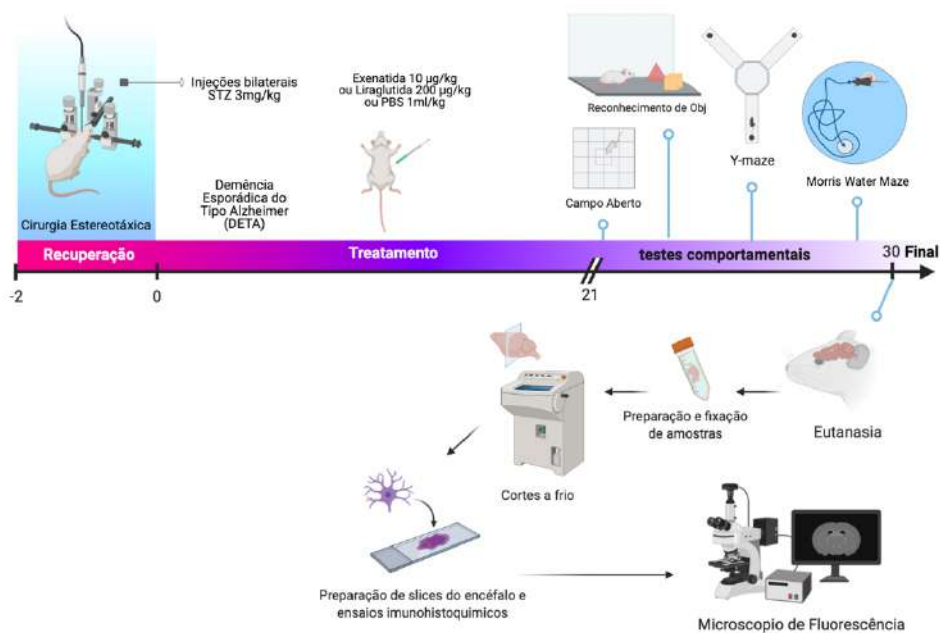


Figura 1. Esquema experimental

d) Parâmetros comportamentais:

Teste de labirinto em Y, Reconhecimento de Objetos e *Morris Water Maze*

O labirinto em Y será utilizado para avaliar a memória espacial dos animais (Teixeira *et al.*, 2013). O teste de R.O. será realizado para avaliar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural dos animais em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (Dodart; Mathis; Ungerer, 1997). O teste do labirinto de Morris é utilizado para investigar a aprendizagem espacial e a memória em roedores, sendo, assim, utilizado para validar modelos de doenças neurodegenerativas (D'Hooge; De Deyn, 2001).

e) Análises de histoquímica e Imuno-histoquímicas

Os testes serão realizados pelo método de *free-floating*. As secções serão primeiramente lavadas com PBS 0,3% de Triton X-100 (PBS-Tx) e seguidas de posterior incubação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS-Tx por 30 minutos. Após uma última lavagem com PBS-Tx, as amostras serão incubadas com 1% de albumina de soro bovino (BSA) diluída em PBS-Tx por 1h. Em seguida, as amostras serão incubadas *overnight* a 4°C e protegidas da luz com os devidos anticorpos primários para anti-S100 (1:1000), anti-GFAP (1:250), anti-EAAT1/GLAST (1:1000), anti-EAAT2/GLT1 (1:1000), anti-NeuN (1:1000), anti-Sinaptofisina (1:1000), Anti-PSD-95 (1:1000), anti-Caspase 3 clivada (1:500), anti-PCNA (1:1000), anti-5HT2A (1:2000), anti-5HT2B (1:2000) e receptor de Insulina: anti-IR (1:500); e receptor colinérgico nicotínico: anti-ACh- α 7 (1:500) e receptor colinérgico muscarínico: anti-ACh-M1 (1:500), bem como transportador de Acetilcolina: anti-VACHT (1:500). As células em cada secção ao longo de toda a região rostro-caudal do hipocampo serão contadas. Serão utilizados os anticorpos anti-NeuN, anti-Sinaptofisina e anti-Doublecortina. Após essa incubação, as secções serão lavadas em abundância com PBS-Tx para a remoção total do anticorpo primário e posteriormente incubadas com anticorpos secundários ligados a fluoróforos ALEXA Fluor adequados. As secções serão montadas em lâminas gelatinizadas com o meio de montagem que preserva a fluorescência Vectashield (Vector®) e em seguida serão armazenadas em caixas protegidas da luz, a uma temperatura de 4°C. As lâminas serão avaliadas em microscópio óptico *wide-field* para observações com fluorescência (Leica DM6000 B) e as imagens obtidas serão capturadas por uma câmera (Leica DFC7000 T).

f) Análise Estatística

A análise estatística será realizada com auxílio do *software Graph Pad Prisma 7.0*. Para os demais experimentos poderão ser utilizados análises de variância (ANOVA) de

uma, duas ou três vias seguida de um posterior teste *Post Hoc* (Tukey) quando apropriado para identificar a diferença entre os grupos. Em caso de necessidade de análises não-paramétricas, o teste de Kruskal-Wallis ou Scheirer-Ray-Hare poderá ser utilizado. A significância estatística será considerada quando $p < 0,05$.

VI) ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PROJETO – CRONOGRAMA

ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PROJETO	12 meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Recebimento dos Animais	x											
Compra dos Materiais de Consumo (Recursos de Custeio)	x	x										
Execução Protocolo I (P1). Início do tratamento do protocolo I com Exenatida e Liraglutida, LPS e oligômeros AB 1-42 em cultura primária de astrócitos. O Protocolo I será desenvolvido em parceria com a Professora Dra. Rosélia Maria Spanevello na Universidade Federal de Pelotas. Parte das amostras dos experimentos do P1 serão enviados para avaliação imuno-histoquímicas no Laboratório de Pesquisa em patologia da UFCSPA.		x	x									
Análise Estatística dos Dados (P1)			x	x								
Relatório Parcial do Projeto					x							
Execução Protocolo II (P2). Determinação dos efeitos da Exenatida e Liraglutida durante 30 dias sobre a degeneração neuronal, reatividade glial e déficits cognitivos (memória e aprendizado) causados pelo STZ no modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (DETA). O tratamento experimental do protocolo II será realizado na UFCSPA.					x	x	x					
Envio de Amostras Protocolo II (P2). Através de parceria firmada no projeto com a professora Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), será enviado parte das amostras do protocolo II.							x					
Análise dos Dados (P2). Análise estatística dos dados de comportamento, de imunofluorescência e de biologia molecular.							x	x				
Redação dos Artigos										x		
Relatório Final											x	
Prestação de Contas do Projeto												x

VII) PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DA EXECUÇÃO DO PROJETO

O projeto faz parte de uma linha de estudos já consolidada a mais de 15 anos e desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA. Através destes experimentos, temos por objetivo publicar no período de vigência 2 artigos científicos que serão incorporados a uma tese de doutorado, referente aos tópicos abaixo relacionados:

Artigo 1 - Efeito neuroprotetor de análogos do GLP-1 (Exenatida e Liraglutida) sobre a morte/sobrevivência, crescimento celular, proliferação em cultura primária de astrócitos desafiados por lipopolissacarídeo (LPS) e peptídeo beta amiloide (oligômeros AB 1-42).

Artigo 2 – Potencial nootrópicos e neuroprotetores da Exenatida e Liraglutida em diferentes parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares no modelo de demência esporádica do tipo Alzheimer (DETA) induzido por estreptozotocina.

VIII) POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO E/OU DIFUSÃO.

Neste projeto, embora existam estudos avaliando a repercussão do efeito de análogos do GLP-1 sobre condições patológicas como a diabetes Mellitus, no sistema nervoso central (SNC), ainda há uma lacuna de trabalhos especializados a ser preenchida. Uma das possibilidades desta pesquisa em rede, é avaliar o impacto desses incretinomiméticos sobre a funcionalidade de regiões cerebrais que são imprescindíveis para a memória e o aprendizado, e que são hoje foco de estudos de imagenologia em humanos. Aliado a isso, as possíveis propriedades neuroprotetoras da Exenatida e Liraglutida apresentam aqui, uma grande importância para a investigação de moléculas capazes de enfrentar alterações tanto morfológicas quanto funcionais nessas regiões cerebrais, considerando os primeiros estágios clínicos da demência, envolvendo é claro, marcante prejuízo de memória de curta e longa duração e também episódios amnésicos. Nosso grupo já possui *expertise* no estudo de incretinomiméticos, realizamos um estudo inédito sobre os efeitos da Exendina-4, molécula também análoga ao GLP-1 e extraída da saliva do *monstro-de-gila* (*Heloderma suspectum*). Esses resultados preliminares com a Exendina-4 são viáveis do ponto de vista científico para estudar os mecanismos da Exendina-4 no SNC. No entanto, os custos para avaliação dessa droga em pesquisas clínicas, por exemplo, são inviáveis economicamente, uma vez que 0,5 mg tem um custo

de 3.601,00 R\$, e para os experimentos preliminares com ratos, nosso o custo total considerando apenas a droga em um tratamento de 30 dias com cobais, foi de R\$18.000,00. Nessas condições, buscamos estudar outros análogos para o GLP-1 e com um custo muito menor. Nosso intuito é definir o potencial inovador para o uso dessas drogas já aprovadas pela anvisa (Exenatida e Liraglutida) no SNC, comparar com os resultados da Exendina-4 e facilitar futuramente, a partir das evidências científicas de base geradas nesse projeto, estudos clínicos de fase 3. Vale ressaltar ainda, que este projeto possui um caráter especial uma vez que busca aproximar pesquisadores de diferentes regiões do estado do RS e em nível internacional, com a participação qualificada da pesquisadora Paula Agostinho da Universidade de Coimbra (estreitamento de laços para análises específicas e um possível doutorado *sandwich*). Esse projeto, é apresentado por nós como uma oportunidade para contribuir com a área e para o fortalecimento da recente rede de colaboradores associados a esta proposta, o que inclui também pesquisadores da Universidade Federal de Santa Maria e Universidade Federal de Pelotas.

Ademais, outro aspecto importante discutido por nós, leva em consideração o impacto final e geral da investigação. As publicações científicas são essenciais para a disseminação dos conhecimentos desenvolvidos e um parâmetro da importância e qualidade do trabalho, contudo, os grupos de pesquisa nas Universidades originam conhecimento de muitas formas, indo além dos artigos científicos. Esse conhecimento gerado deve se aproximar tanto das áreas que tratam dos problemas sociais emergenciais quanto das que tratam das questões do avanço da ciência e tecnologia na saúde. Do ponto de vista da comunicação científica, o nosso grupo de pesquisa tem recentemente desenvolvido estratégias de disseminação do conhecimento através das redes sociais. Nossa principal ferramenta de divulgação científica hoje, é a nossa página no instagram o @neurobio.ufcspa (<https://www.instagram.com/neurobio.ufcspa/>), no qual desenvolvemos material em linguagem leiga para popularizar nossas pesquisas em andamento, projetos já finalizados e conceitos e conteúdos relacionados a neurociência, neuropsicologia e morfologia.

Sendo assim, como indicadores dos resultados, o grupo de pesquisa da proponente do projeto elaborará e publicará nessa página os resultados provenientes desse projeto, bem como valer-se-á de pessoal técnico da área de comunicação para o desenvolvimento de vídeos informativos, coleta de depoimentos e criação de roteiros de divulgação científica, tematizando os resultados obtidos. E, por fim, divulgará os resultados também em linguagem de fácil entendimento para cuidadores e familiares de pacientes com doença de Alzheimer instalados nos serviços de saúde do complexo hospitalar Santa Casa da Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) e anexos (Santa Rita,

Santo Antônio, Don Vicente Scherer, São Francisco, Santa Clara, São José e Pavilhão Pereira Filho). Serão elaborados textos a serem divulgados na mídia, além de preparar atividades ligadas ao projeto em nível de ensino de graduação para alunos de graduação oriundos dos cursos de Farmácia, Psicologia, Biomedicina, Fisioterapia, Nutrição e Medicina da UFCSPA.

j) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2018). **Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes**. Diabetes Care 41(Suppl.1), S73–S85.

ALVAREZ, E., MARTÍNEZ, M. D., RONCERO, I., CHOWEN, J. A., GARCÍA-CUARTERO, B., GISPERT, J. D., *et al.* (2005). **The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem**. J. Neurochem. 92, 798–806.

CABOU, C., VACHOUX, C., CAMPISTRON, G., DRUCKER, D. J., AND BURCELIN, R. (2011). **Brain GLP-1 signaling regulates femoral artery blood flow and insulin sensitivity through hypothalamic PKC- δ** . Diabetes 60, 2245–2256

CORK, S. C., RICHARDS, J. E., HOLT, M. K., GRIBBLE, F. M., REIMANN, F., and TRAPP, S. (2015). **Distribution and characterisation of glucagon-like peptide-1 receptor expressing cells in the mouse brain**. Mol. Metab. 4, 718–731.

DURING, M. J., CAO, L., ZUZGA, D. S., FRANCIS, J. S., FITZSIMONS, H. L., JIAO, X., *et al.* (2003). **Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection**. Nat. Med. 9:1173.

D'HOOGHE, R.; DE DEYN, P. P. (2001). **Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory**. Brain Res Brain Res Rev, v. 36, n. 1, p. 60-90.

DODART, J. C.; MATHIS, C.; UNGERER, A. (1997). **Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice**. Neuroreport, v. 8, n. 5, p. 1173-8.

GENGLER, S., MCCLEAN, P. L., MCCURTIN, R., GAULT, V. A., and HÖLSCHER, C. (2012). **Val(8)GLP-1 rescues synaptic plasticity and reduces dense core plaques in APP/PS1 mice**. Neurobiol. Aging 33, 265–276.

GRAY, S. M., AND BARRETT, E. J. (2018). **Insulin transport into the brain**. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 315, C125–C136.

JORDA, A., ALDASORO, M., ALDASORO, C., GUERRA-OJEDA, S., *et al.* (2020). **Action of low doses of Aspirin in Inflammation and Oxidative Stress induced by $\alpha\beta 1-42$ on Astrocytes in primary culture**. Int J Med Sci; 17(6):834-843)

JAGAN KALIVARATHAN, KALPANA KALAIVANAN, SATHIYA PRIYA CHANDRASEKARAN, DIPTI NANDA, VIDHYA RAMACHANDRAN, ANURADHA CARANI VENKATRAMAN (2020). **Apigenin modulates hippocampal CREB-BDNF signaling in high fat, high fructose diet-fed rats**. Journal of Functional Foods, 68.

KASTIN, A. J., and AKERSTROM, V. (2003). **Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses**. Int. J. Obesity 27:313.

KINZIG, K. P., D'ALESSIO, D. A., HERMAN, J. P., SAKAI, R. R., VAHL, T. P., FIGUEIREDO, H. F., *et al.* (2003). **CNS glucagon-like peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors.** J. Neurosci. 23, 6163–6170.

HAMILTON, A., AND HÖLSCHER, C. (2009). **Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system.** NeuroReport 20, 1161–1166.

HEPPNER, K. M., KIRIGITI, M., SECHER, A., PAULSEN, S. J., BUCKINGHAM, R., PYKE, C., *et al.* (2015). **Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (macaca mulatta) brain.** Endocrinology 156, 255–267.

MEIJER, R. I., GRAY, S. M., AYLOR, K. W., and BARRETT, E. J. (2016). **Pathways for insulin access to the brain: the role of the microvascular endothelial cell.** Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 311, H1132–H1138.

MCCLEAN, P. L., PARTHSARATHY, V., FAIVRE, E., AND HÖLSCHER, C. (2011). **The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease.** J. Neurosci. 31, 6587–6594.

RYU, K., LEE, H., WOO, H., *et al.* (2019). **Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling.** J Neuroinflammation; 16:190.

SANDOVAL, D., and SISLEY, S. R. (2015). **Brain GLP-1 and insulin sensitivity.** Mol. Cell. Endocrinol. 418, 27–32.

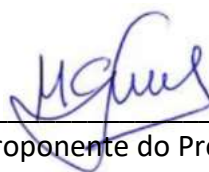
TAO, X., CAI, L., CHEN, L., *et al.* (2019). **Effects of metformin and Exenatide on insulin resistance and AMPK α -SIRT1 molecular pathway in PCOS rats.** Journal of Ovarian Research; 12:86.

TEIXEIRA, M. D. *et al.* (2013). **Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats.** Pharmacol Biochem Behav, v. 110, p. 1-7.

TRAPP, S., AND RICHARDS, J. E. (2013). **The gut hormone glucagon-like peptide-1 produced in brain: is this physiologically relevant?** Curr. Opin. Pharmacol. 13, 964–969.

WANG, X. H., LI, L., HÖLSCHER, C., PAN, Y. F., CHEN, X. R., AND QI, J. S. (2010). **Val8-glucagon-like peptide-1 protects against A β 1–40-induced impairment of hippocampal late-phase long-term potentiation and spatial learning in rats.** Neuroscience 170, 1239–1248.

ZENG, S., BAI, J., JIANG, H., *et al.* (2019). **Treatment With Liraglutide Exerts Neuroprotection After Hypoxic–Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats via the PI3K/AKT/GSK3 β Pathway.** Front Cell Neurosci; 13: 585.



Assinatura do Proponente do Projeto

Hospital da Criança Santo Antônio
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas.

Projeto de Pesquisa

Bruna Lixinski Diniz
Leonardo Augusto Schreiner
Luiza Emy Dorfman
Maiara Anschau Floriani
Rafael Fabiano Machado Rosa
Paulo Ricardo Gazzola Zen

Porto Alegre, 15 de agosto de 2017.

RESUMO

Embora as doenças genéticas sejam individualmente raras, sua frequência conjunta faz com que elas representem um importante problema de saúde pública. De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos. As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente. A cardiopatia congênita é a alteração congênita mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil relacionadas a malformações congênitas. Com incidência de 19 a 75 casos a cada mil nascidos vivos, possui etiologia complexa e multifatorial, com cerca de 80% das cardiopatias congênitas surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratógenos. As doenças genéticas representam um importante problema de saúde pública, pois, além de provocarem uma enorme proporção de mortes infantis, são a causa de grande parte das internações em hospitais pediátricos.

Atualmente são poucos os exames genéticos realizados via SUS. O presente projeto visa a realização de uma abordagem clínica e genética em pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas. A amostra será composta por pacientes do SUS em ambulatório ou internados atendidos pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA no Hospital da Criança Santo Antônio, com suspeita ou diagnóstico clínico de doença genética ou síndrome malformativa. Para aqueles pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas será coletada uma amostra de sangue para cultivo de células e/ou extração de DNA. O material biológico coletado será processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, compondo um biorepositório que será utilizado para a realização de exames genéticos visando a obtenção do diagnóstico. De modo associado, serão coletadas informações clínicas dos pacientes para o desenvolvimento de trabalhos de conclusão de curso, mestrados e doutorados.

Em um primeiro momento serão disponibilizados testes de FISH e MLPA para microdeleções. A realização de testes genéticos específicos possibilita a obtenção de diagnósticos mais precisos, levando a um planejamento terapêutico mais otimizado, além de diminuir o sofrimento de pacientes e suas famílias. Também gera reflexos em relação a diminuição de custos, agilizando o diagnóstico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGH do inglês, <i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CNV do inglês, <i>copy number variation</i>
DNA do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FISH do inglês, <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
LCR do inglês, <i>low copy repeat</i>
MLPA do inglês, <i>Multiplex Ligation-dependent Probes Amplification</i>
PCR do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SGC do inglês, <i>contiguous gene syndromes</i>
SMM do inglês, <i>microdeletion or microduplication syndromes</i>
SNP do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SV do inglês, <i>structural variation</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Exemplos de síndromes de microdeleções e microduplicações mais comuns.....	8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema explicativo de CNVs recorrentes.....	4
Figura 2 Observações experimentais de rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados a distúrbios genômicos.....	5
Figura 3 Visão geral esquemática de todas as regiões de microdeleção e microduplicação genômica.....	7
Figura 4 Ilustração resumida das etapas da Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	16
Figura 5 Esquema explicativo da técnica de MLPA.....	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos moleculares das microduplicações e microdeleções.....	2
1.2	Síndromes de microdeleções/microduplicações.....	6
1.3	Estratégias para investigação de anomalias genômicas.....	9
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivo geral	12
3.2	Objetivos específicos	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1	Amostra	13
4.2	Extração de DNA.....	14
4.3	Cultura de células de sangue periférico.....	15
4.4	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	15
4.5	Análise de microdeleções/microduplicações pela técnica de MLPA.....	17
4.6	Processamento dos dados e análise estatística	19
4.7	Aspectos Éticos	19
4.8	Riscos e benefícios	20
5	CRONOGRAMA	21
6	ORÇAMENTO	22
7	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde define malformação congênita (anomalia congênita, defeito congênito ou distúrbio congênito) como uma anomalia estrutural ou funcional que se manifesta ainda na vida intrauterina, podendo ser diagnosticada no período pré-natal, no nascimento ou até mesmo, durante a infância (WHO, 2016). As manifestações clínicas podem ser muito diversificadas, podendo apresentar dismorfias leves até alterações complexas e raras, acometendo órgãos ou segmentos corporais (Manual de Anomalias Congênicas, 2012).

Embora as doenças genéticas individualmente possam ser raras, sua frequência conjunta faz com que elas sejam uma parte importante da Medicina. Estima-se que 10 a 12% de todos os indivíduos nascidos vivos irão desenvolver uma doença geneticamente influenciada ao longo de suas vidas (Wilson, 2000). De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos (Robinson e Linden, 1993; Wilson, 2000; Stevenson e Hall, 2006; Turnpenny e Ellard, 2016). As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente (Turnpenny e Ellard, 2016). Em países desenvolvidos, os distúrbios genéticos e as malformações congênicas contribuem com 30% de todas as admissões infantis, e cerca de 40 a 50% de todos os óbitos observados nesta faixa etária (Turnpenny e Ellard, 2016). Além de contribuir na incidência de alguma anormalidade anatômica em 2-3% de nascidos vivos e em 10% natimortos (Jones & Jones, 2013). A cardiopatia congênita (CC) é um conjunto de anormalidades estruturais e funcionais do coração e grandes vasos, que podem surgir durante a embriogênese cardíaca (Fahed et al., 2013). É a alteração congênita mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil relacionadas a malformações congênicas. Com incidência de 19 a 75 casos a cada mil nascidos vivos (Bruneau, 2008), possui etiologia complexa e multifatorial, com cerca de 80% das cardiopatias congênicas surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratógenos (Blue et al., 2012).

Segundo o banco de dados da Vigilância Europeia de Anomalias Congênicas (EUROCAT), no ano de 2004, 18% das mortes neonatais com presença de alguma malformação congênita, tem origem cromossômica. Além disso, foi verificado que anomalias cromossômicas são responsáveis por cerca de 15% das principais síndromes congênicas, sendo associadas a 25% das mortes perinatais na Europa (Zeitlin et al., 2009). Já no Brasil, 37% das internações

pediátricas nos sistemas de saúde terciários são representativos de algum defeito congênito ou enfermidade genética (Horovitz et al., 2005). Além disso, essas alterações são ainda responsáveis pela elevação das taxas de cesarianas e nascimentos de recém-nascidos prematuros (Guerra et al., 2008).

Em relação à etiologia para essas malformações, já foram identificadas causas como, mendelianas, cromossômicas, ambientais, entre outros. Porém, muitas vezes é difícil explicar a causa exata dessas doenças. Sugere-se que 6% das malformações congênitas estejam relacionadas a anomalias cromossômicas, podendo esta proporção aumentar quando associado a desequilíbrios genômicos abaixo da resolução (<5Mb), não sendo estes, possíveis de diagnosticar a partir da análise cromossômica padrão. (Schinzel, 2002). As anormalidades cromossômicas no período pré-natal podem variar desequilíbrios genômicos em nível de poliploidia até aneuploidia. Além disso, microdeleções e microduplicações submicroscópicas também podem estar presentes, as quais só são analisadas por métodos mais sofisticados de diagnóstico citogenético, como por exemplo, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou microarray cromossômico (CMA) (Wellesley et al., 2012). As anomalias congênitas podem contribuir para a incapacidade motora de longo prazo, o que pode resultar em impactos significativos nos indivíduos acometidos, além dos familiares, sistemas de saúde e da sociedade como um todo. Com isso, é importante que se faça um diagnóstico completo de cada síndrome, obtendo um maior número de informações possíveis a fim de proporcionar melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes. Assim, a partir de uma atenta avaliação clínica se pode traçar uma estratégia de investigação visando a otimização do uso dos diferentes testes genéticos.

1.1 Aspectos moleculares das microduplicações e microdeleções.

A caracterização das síndromes genéticas se originou através da junção dos achados clínicos comumente encontrados em pacientes afetados, e na capacidade de detectar anormalidades cromossômicas por análise citogenética clássica e molecular. As deleções e duplicações cromossômicas parciais se destacam pela importância para a variabilidade do genoma, podendo ser ou não, patogênicas (Redon et al., 2006). Desde os anos 80, as microduplicações e as microdeleções vêm sendo associadas às formas sindrômicas de deficiência intelectual (DI) e atraso do desenvolvimento (AD) (Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG, 1986). Há aproximadamente 10 anos, estudos começaram a reconhecer a variação abundante de uma classe de tamanho intermediário, conhecida como variantes estruturais (SV),

nas quais possuem uma alta relevância quando associadas a desequilíbrios das dosagens gênicas no genoma em pacientes com malformação congênita ou atraso de desenvolvimento (International HAPMAP Consortium, 2005).

As microduplicações cromossômicas e as microdeleções constituem uma porção de variantes de número de cópias (CNVs) que está relacionada com segmentos de DNA, cujo o número de cópias de um indivíduo se mostra variável devido à perda ou ao ganho de material genético, em relação ao genoma de referência (Sebat et al., 2004; Itsara et al., 2009). O tamanho dessas variantes é >50 pares de bases (pb), nas quais possuem mais pares de bases polimórficas quando comparadas aos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Elementos menores são conhecidos como inserções ou exclusões (MacDonald et al., 2014). A detecção das microduplicações e microdeleções permite identificar rearranjos cromossômicos e CNVs, nos quais estão envolvidos numa parcela significativa das anomalias congênitas. Cerca de 1 – 1,7% de gestantes com idade avançada possuem CNVs patógenas, o que significaria um frequência muito maior comparada a incidência de casos de síndrome de Down. (Van den Veyver et al., 2009; Hillman et al., 2013).

Os rearranjos cromossômicos se originam por dois mecanismos principais, podendo ser balanceados ou desbalanceados. O que difere entre os dois é se há perdas ou ganhos de material genético, embora tenha ocorrido algum rearranjo. No caso, as CNVs estão envolvidas nos rearranjos desbalanceados que podem estar associados a deleções/duplicações, ou a herança de produtos de translocações não balanceadas. Além disso, ambos mecanismos demonstram ter impactos na expressão de genes (Harewood et al., 2012). As CNVs podem ser classificadas em variações benignas, patogênicas ou variações de significância incerta (VOUS), com isso, muitas dessas podem estar associadas a síndromes ou basicamente a deficiências neurocognitivas, como autismo ou atraso do desenvolvimento (Gross et al., 2011).

As CNVs estão estabelecidas em duas classes: as recorrentes e as não recorrentes, ambas mediadas por diferentes mecanismos na formação de rearranjos estruturais (Klopocki & Mundlos, 2011). As variações recorrentes originam-se a partir de recombinações homólogas não-alélicas (NAHR), onde são mediadas por repetições com números de cópias reduzido, conhecidas como LCRs (low-copy repeats) (Figura 1). Os rearranjos genômicos mais recorrentes são causados por NAHR entre duas LCRs. As LCRs são regiões específicas do DNA que possuem geralmente o tamanho de 10-300 kilobases (kb) e 95-97% de similaridade entre si (Shaw & Lupski, 2004; Bailey & Eichler, 2006). Com isso, os pontos de quebra se agrupam em regiões definidas e a extensão das CNVs recorrentes é idêntica em indivíduos distintos (Lupski & Stankiewicz, 2005; Lindsay et al., 2006). Esse tipo de recombinação está

fortemente associado a doenças genômicas, com aproximadamente 37 regiões do genoma já evidenciadas (Liu et al., 2012).

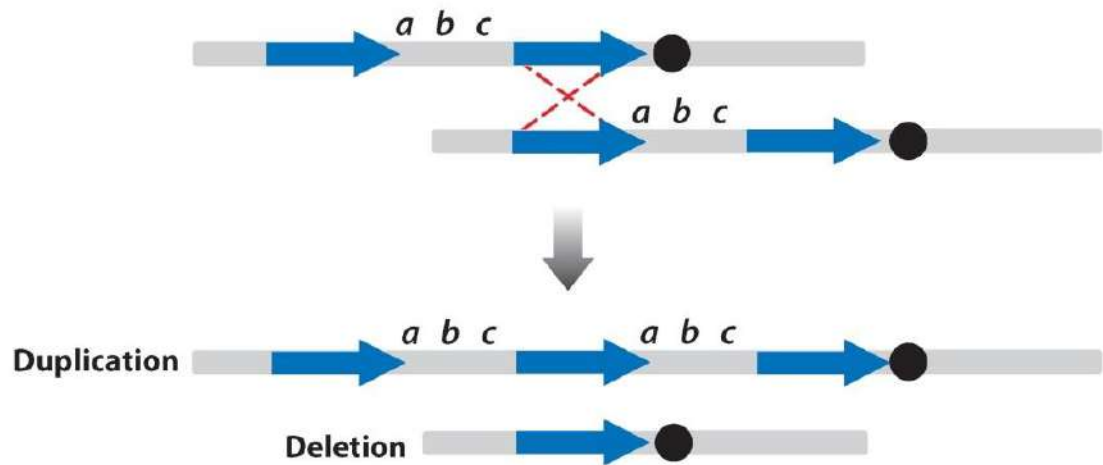


Figura 1. As LCRs representam regiões de sequência altamente repetitivas de baixa cópia que podem fornecer um substrato para rearranjos cromossômicos mediados por NAHR. As setas azuis exemplificam duas grandes duplicações de uma sequência de alta similaridade que flanqueia uma região contendo genes a, b e c. Seguindo o desalinhamento dos homólogos, estas duplicações facilitam as NAHR durante a meiose, auxiliando um evento crossing-over entre duplicações segmentares parálogas, em vez de alélica. Isso resulta em dois produtos recíprocos: um cromossomo que transporta uma duplicação da região intermediária e uma cópia adicional dos genes a, b e c; e um segundo cromossomo que contém uma deleção dessa mesma região. Tais rearranjos são causas comuns de muitos distúrbios genômicos recorrentes, caracterizados por rearranjos recíprocos de regiões cromossômicas específicas. Adaptado de Watson et al., 2014.

As CNVs não recorrentes possuem sequências com similaridade mais limitada que flanqueiam os pontos de quebra, contendo apenas 2-15 pb em sua estrutura. Estes rearranjos podem ocorrer em regiões ricas em LCRs, alterando a arquitetura genômica por estarem em sentido invertido nas sequências de DNA (Stankiewicz et al., 2003; Hastings et al., 2009). Além disso, os rearranjos não recorrentes compartilham uma região genômica comum de sobreposição (SRO, *smallest region of overlap*), que abrange o locus associado ao transtorno genômico (Figura 2) (Gu et al., 2008).

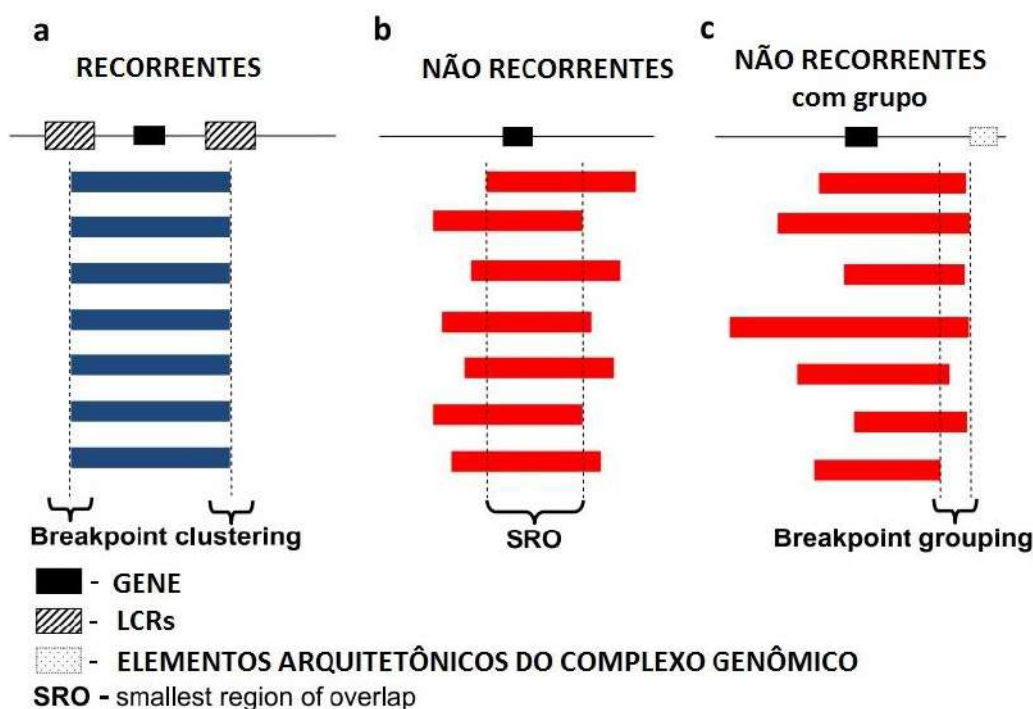


Figura 2. Observações experimentais de rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes associados a distúrbios genômicos. A linha longa e fina significa a região genômica submetida a rearranjos genômicos. O retângulo preto representa um gene que está localizado na região reorganizada e pode ser afetado pelos rearranjos. As barras de azul escuro (em **a**) e vermelho (em **b** e **c**) representam os rearranjos (duplicações, eliminações ou inversões) com seus pontos de interrupção. **a.** Rearranjos recorrentes com um tamanho comum e pontos de quebra agrupados. A maioria dos rearranjos recorrentes resulta da recombinação homóloga não alélica (NAHR). Os dois retângulos listrados que flanqueiam o gene, retratam as repetições de baixa cópia (LCRs) funcionando como substratos para NAHR. Os pontos de quebra do rearranjo são agrupados dentro dos LCRs. **b.** Rearranjos não recorrentes. Os pontos de quebra dos rearranjos não recorrentes são dispersos na região genômica. Nota-se que todos os rearranjos compartilham uma região genômica comum de sobreposição (SRO), que engloba um gene necessário para o traço fenotípico transmitido, o que permite que esses rearranjos sejam determinados. **c.** Rearranjos não recorrentes com agrupamento de um ponto de interrupção. Alguns dos rearranjos não recorrentes têm um de seus pontos de quebra localizados em uma pequena região genômica. Este agrupamento de pontos de quebra é distinto do agrupamento do rearranjo recorrente, mas sendo um agrupamento de quebra, pode refletir na arquitetura genômica subjacente (por exemplo, palíndromo ou cruciforme) importante para o mecanismo de rearranjo, representado como o retângulo pontilhado na Figura 2c. Adaptado de Gu et al., 2008.

As CNVs podem estar presentes em sequências de um gene ou em um gene inteiro, em um segmento contendo vários genes ou, em elementos regulatórios. As variantes intragênicas podem possuir consequências similares as mutações de ponto patogênicas, sendo que as CNVs maiores podem levar a síndromes de genes contíguos devido a sua possível inclusão em múltiplos genes. Com isso, essas variantes estão sendo associadas com o surgimento de doenças devido à influência em alterações de funções fisiológicas (Lee & Scherer, 2010). A expressão

gênica nas regiões de CNVs está fortemente relacionada ao número de cópias de genes, ou seja, quanto maior concentração das variantes maior vai ser a expressão dos genes. Já para deleções, observa-se o oposto desse mecanismo (Stranger et al., 2007; Schlattl et al., 2011).

Há também, genes que podem modificar a sua expressão pelo fato de estarem próximos aos pontos de quebra e presentes em número de cópias normais, como por exemplo, as microdeleções do cromossomo 7q11.23 responsáveis pela síndrome de Williams-Beuren (WBS). Deleções e duplicações relacionadas a alterações na expressão gênica para CNVs também estão sendo citadas em estudos em humanos e camundongos, nas regiões 16p11.2 e 17p11.2, respectivamente (Merla et al., 2006; Ricard et al., 2010; Jacquemont et al., 2011). A herança de produtos não balanceados dos rearranjos cromossômicos, como as translocações, é uma das causas para a origem das alterações nos números de cópias do genoma. Além disso, como resultado, podem-se observar grandes ganhos ou perdas de regiões cromossômicas (Harewood et al., 2010). Portanto, as duplicações e deleções podem influenciar nos níveis normais de expressão gênica, alterando o número de cópias de um gene e assim, resultando em um produto genético diferenciado, além de exercer um efeito em outros genes que estão próximos ou distantes dos pontos de quebra. Possivelmente há também, alteração no tempo e na localização em que há a expressão. Através disso, observa-se a importância do estudo das CNVs em relação à expressão gênica, levando em conta todos os efeitos espaciais e temporais já relatados (Harewood & Fraser, 2014).

1.2 Síndromes de microdeleções/microduplicações.

As pesquisas comparativas entre malformações congênitas e alterações cromossômicas tiveram seu início no ano de 1956, quando o pesquisador Jerome Lejeune identificou um cromossomo 21 adicional, em pacientes com síndrome de Down (Lejeune et al., 1956). A partir dessa descoberta juntamente com o auxílio da citogenética básica e molecular, o tratamento para esses pacientes e o aconselhamento genético foram beneficiados. As microdeleções e microduplicações foram inicialmente detectadas através da criação das técnicas moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se observaram rearranjos menores que antes não eram possíveis de detectar em técnicas menos sofisticadas, como o bandamento G (Krantz & Spinner; 2007).

As síndromes de microdeleções/microduplicações (SMM) originam-se de variações submicroscópicas no número de cópias de uma região do genoma, que por sua vez causam ganhos ou perdas subcromossômicas específicas. Esses distúrbios podem ser chamados de

síndromes de genes contíguos (SGC). As SGCs possuem regiões críticas de dois ou mais genes, com localização próxima, que são responsáveis por anomalias congênitas, atraso do desenvolvimento e transtornos neuropsiquiátricos (Deak et al., 2011). Estatisticamente, para cada síndrome de microdeleção deve haver uma síndrome de microduplicação recíproca, onde uma comparativa atual realizada no ano de 2012, entre as duas alterações cromossômicas, mostra uma relação de 211 microdeleções versus 79 microduplicações relatadas (Weise et al., 2012), conforme demonstrada na Figura 3.

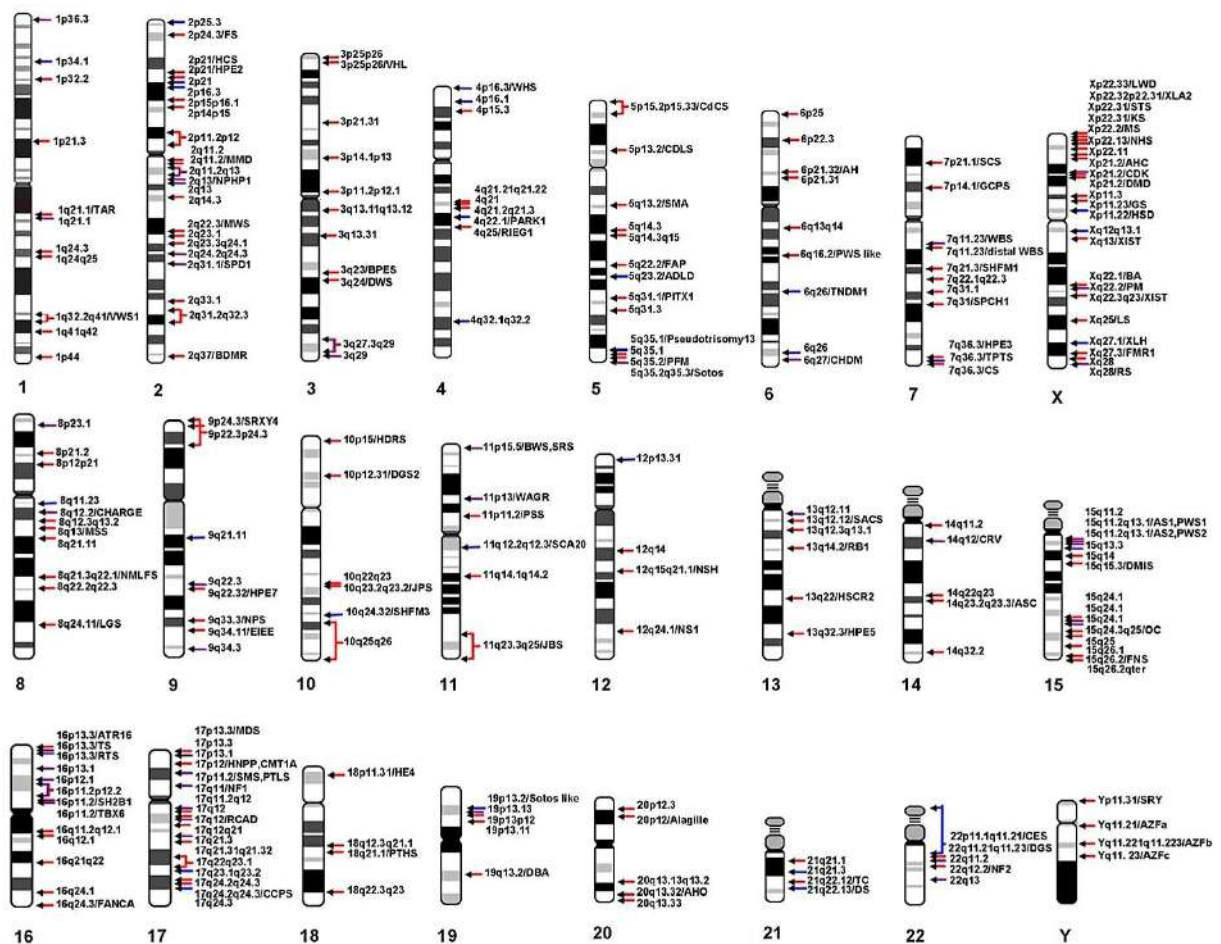


Tabela 1. Exemplos de síndromes de microdeleções e microduplicações mais comuns.

Síndromes	Rearranjo cromossômico	Região crítica cromossômica		Incidência (nascimentos)
Microdeleção 1p36	Deleção	1p36		1 em 5.000–10.000
Microdeleção 3q29	Deleção	3q29		Não informada
Wolf-Hirschhorn	Deleção	4p16.3		1 em 50.000
Cri-du-chat	Deleção	5p15		1 em 20.000–50.000
Sotos	Deleção	5q35.3		1 em 5000–10,000
Willams-Beuren	Deleção	7q11.23		1 em 7.500 (del)
	Duplicação	7q11.23		Não informada (dup)
Kleefstra	Deleção	9q34.3		<1 em 1 milhão
Beckwith-Wiedemann	Duplicação	11p15		Não informada
Jacobsen	Deleção	11q24.1/24.3/25		1 em 100.000
Prader-Willi	Deleção	15q11.2-q13 (paterno)		1 em 10.000–30.000
Angelman	Deleção	15q11.2-q13 (materno)		1 em 12.000–20.000
Rubenstein-Taybi	Deleção	16p13.3		Não informada
Miller-Dieker	Deleção	17p13.3		Não informada
Microduplicação 17p13.3	Duplicação	1	7p13.3	<1 em 1 milhão
Smith-Magenis	Deleção	17p11.2		1 em 25.000
Potocki-Lupski	Duplicação	17p11.2		Não informada
Charcot-Marie-Tooth, tipo 1 (A)	Duplicação	17p11.2-p12		Não informada
Koolen-de Vries	Deleção	17q21.31		1 em 16.000
Alagille	Deleção	20p11.2-p12		Não informada
DiGeorge/Velocardiofacial	Deleção	22q11.2		1 em 2.000 –4.000
DiGeorge 2 (10p13-p14 deletion)	Deleção	10p13 pter		1 em 200.000
Distrofia muscular de Duchenne	Deleção	Xp21		Não informada

Adaptado de Crotwell & Hoyne, 2012; Vialard et al., 2012; Grati et al., 2015.

1.3 Estratégias para investigação de anomalias genômicas.

O início da citogenética clássica deu-se no final do século 19, através da realização de análises microscópicas de cromossomos em células de carcinoma e sarcoma (Arnold, 1879). A partir de então, com o descobrimento de técnicas mais aprimoradas com o intuito de aumentar a resolução dos cromossomos, a citogenética humana tornou-se não só uma ciência valiosa, como uma estratégia de diagnóstico tradicional para detecção de anormalidades cromossômicas pré-natais, pós-natais e adquiridas (Riegel, 2014). A primeira visualização de padrão de bandas cromossômicas foi através do método de bandamento Q (Caspersson et al., 1968), e logo após, desenvolveu-se a técnica mais usada em tempos atuais, o bandamento G (Seabright, 1971). A cariotipagem com bandamento G é considerada padrão-ouro para análises de doenças cromossômicas, como aneuploidias, trissômicas ou monossomias, além de grandes rearranjos estruturais (>5-10Mb). Esta metodologia baseia-se em cultura de células que varia de 3 a 5 dias, com uso de uma enzima proteolítica (tripsina), associado com a confecção de lâminas, coloração de Giemsa e análise microscópica que possibilita a visualização habitual de um padrão de 450 a 550 bandas nos cromossomos. No entanto, a técnica não possibilita a visualização de alterações pequenas, a nível submicroscópico (Bui, 2007).

A introdução e aplicação de abordagens moleculares aprimoraram a resolução da análise de cromossomos, resultando na obtenção rápida de resultados e detecção mais precisa de anormalidades cromossômicas. A FISH foi à primeira metodologia aplicada na pesquisa citogenética (Gall e Pardue, 1969; John et al., 1969), além de ser atualmente uma das principais técnicas para diagnósticos clínicos e análises de pequenas deleções e duplicações (El-Ella et al., 2012). Através da hibridização do DNA alvo com sondas fluorescentes, esta técnica permite identificar cromossomos envolvidos em aneuploidias e rearranjos cromossômicos, podendo ser obtido o resultado em 48h. Por mais que esta abordagem seja de nível mais elevado, a capacidade de detecção é considerada limitada, pois dependendo dos conjuntos de sondas escolhidas, as alterações podem não ser possíveis de análise (Shaffer et al., 2007). Importante salientar que para uma boa análise, tanto de FISH padrão como o avançado, deve-se usar um microscópio de fluorescência bem mantido e calibrado, equipado com conjuntos de filtros ópticos apropriados para os fluoróforos usados e um sistema de gravação de imagens (Liehr, 2009).

Outra tecnologia muito destacada pela pesquisa atual, que permite detectar rearranjos cromossômicos muito pequenos, é a Hibridização Genômica Comparativa por Array (aCGH). Inicialmente esta abordagem era feita para identificar desequilíbrios cromossômicos através da

detecção de CNVs em tumores, no intuito de distinguir genes que poderiam estar envolvidos na patogênese do câncer (Cai et al., 2002; Albertson & Pinkel, 2003). Pouco depois, começou então a ser utilizada como uma poderosa tecnologia genômica, auxiliando o diagnóstico clínico de pacientes que apresentavam atraso mental idiopático, deficiência intelectual (ID), anormalidades congênitas, esquizofrenia e outros transtornos neuropsiquiátricos. Através desta técnica foi possível analisar o genoma inteiro em alta resolução, detectando variações até então desconhecidas, porém mantendo um alto custo para a realização (Lee et al., 2007; Dave & Sanger, 2007).

Em relação à detecção de genes com deleções/duplicações, podemos destacar a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Por ser um método sensível e rápido, simples e econômico, é indicado para caracterizar desordens congênitas e hereditárias, analisando quantitativamente mais de 40 dosagens diferentes de sequências em uma única reação de PCR (Sørensen et al., 2008). Além disso, o MLPA pode analisar até 96 amostras simultaneamente, com resultados em até 24h, seguindo o protocolo descrito em basicamente quatro passos (desnaturação, hibridização do DNA, reação de ligação e amplificação por PCR). Já para interpretação dos resultados, é necessário etapas de separação dos produtos por eletroforese capilar e a análise dos dados por programas específicos. Mais de 300 sondas (probes) estão sendo comercializadas para a investigação de doenças genéticas, porém a técnica é incapaz de detectar rearranjos balanceados e mosaicismos de baixo grau, além de ser sensível a qualidade da amostra de DNA testada (Shouten et al., 2002; Kozłowski et al., 2008; Stuppia et al., 2012).

Adicionalmente e não menos importante, a identificação de síndromes monogênicas pode ser realizada através da identificação de mutações em genes, utilizando técnicas de PCR e sequenciamento, bem como análise do exoma.

2 JUSTIFICATIVA

Embora as doenças genéticas sejam individualmente raras, sua frequência conjunta faz com que elas representem uma parte importante da Medicina. De todos os neonatos, 2 a 3% têm pelo menos uma anormalidade congênita maior, das quais pelo menos 50% são causadas exclusivamente ou parcialmente por fatores genéticos (Robinson e Linden, 1993; Wilson, 2000; Stevenson e Hall, 2005; Turnpenny e Ellard, 2016). As incidências de anomalias cromossômicas e distúrbios monogênicos em neonatos são de aproximadamente 1 em 200 e 1 em 100, respectivamente (Turnpenny e Ellard, 2016). Em países desenvolvidos, os distúrbios genéticos e as malformações congênitas contribuem com 30% de todas as admissões infantis, e cerca de 40 a 50% de todos os óbitos observados nesta faixa etária (Turnpenny e Ellard, 2016).

As doenças genéticas representam também um importante problema de saúde pública, pois, além de provocarem uma enorme proporção de mortes infantis, são a causa de grande parte das internações em hospitais pediátricos. A falta de disponibilização de exames diagnósticos em genética médica torna difícil a realização de testes genéticos para pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). São poucos os exames genéticos cuja realização aos pacientes do SUS é viável.

Assim, a possibilidade de realização de exames como FISH, MLPA, aCGH/SNP array, sequenciamento de genes ou do exoma é muito dependente de projetos de pesquisa. A realização de testes genéticos específicos possibilita a obtenção de diagnósticos mais precisos, levando a um planejamento terapêutico mais otimizado, além de diminuir o sofrimento de pacientes e suas famílias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar investigação clínica e genética de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas, atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar anomalias genéticas utilizando técnicas como FISH, MLPA, arrayCGH e sequenciamento/exoma;
- Descrever relatos de caso e séries de casos envolvendo indivíduos portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas em periódicos científicos;
- Constituir um repositório de amostras de DNA de indivíduos suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas;
- Possibilitar o acesso a novas tecnologias aos pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas;
- Fornecer laudos aos pacientes sobre os procedimentos diagnósticos realizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

A amostra será composta por pacientes atendidos pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA no Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), que apresentarem suspeita ou diagnóstico clínico de uma doença genética ou uma síndrome malformativa. Os atendimentos em genética são realizados pelos professores da disciplina de Genética Clínica do curso de Medicina e da residência médica em Genética Médica da UFCSPA, Paulo Ricardo Gazzola Zen e Rafael Fabiano Machado Rosa, aos pacientes em avaliação genética hospitalizados ou em ambulatório, atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O atendimento médico em genética consiste na realização de entrevista, exame físico dismorfológico e registro fotográfico. Salientamos que imagens fotográficas são parte essencial do atendimento em genética, constituindo parte dos prontuários da genética médica. Assim, dados gerais dos indivíduos, como sexo e idade, história gestacional, familiar e clínica, como medidas antropométricas, presença de dismorfias, resultados de exames e avaliações complementares, e intercorrências, serão anotados (Anexo A).

A partir do atendimento são geradas hipóteses diagnósticas que orientam a investigação laboratorial. Porém, a maioria dos exames em genética médica ainda não são rotineiramente disponíveis pelo SUS. Para aqueles pacientes suspeitos ou com diagnóstico clínico de doenças genéticas ou síndromes malformativas será coletada uma amostra de material biológico (sangue) para cultivo de células e/ou extração de DNA. As coletas de sangue serão realizadas preferencialmente de modo associado a coleta de algum outro exame de sangue de rotina, evitando punções desnecessárias. O sangue será colocado em frascos com heparina e/ou EDTA e será processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, sob a responsabilidade dos professores Paulo Zen e Rafael Rosa. Assim, esse material irá compor um biorepositório que será utilizado para a realização de exames laboratoriais visando a obtenção do diagnóstico nosológico. Uma vez realizado o diagnóstico, o material será descartado. A composição de um biorepositório se deve ao fato de que as doenças genéticas são muito raras e muitas vezes fatais, tornando impossível de se planejar a coleta de uma série de casos em um intervalo de tempo curto. Ao mesmo tempo a obtenção de financiamento por agência de fomento é facilitada em situações em que o biorepositório já está composto. O biorepositório otimiza a utilização dos reagentes, pois com as amostras disponíveis os testes podem ser

realizados imediatamente sem necessidade de nova coleta. Os procedimentos da pesquisa não irão interferir na rotina dos serviços de assistência à saúde.

Em um primeiro momento poderemos coletar amostras e já oferecer alguns testes para verificação de microdeleções cromossômicas utilizando as metodologias de FISH e de MLPA. Esses testes serão oferecidos aos pacientes em acompanhamento com o serviço e com suspeita de síndrome de microdeleção, entre as quais as síndromes de Prader Willi/Angelmann, Williams e deleção 22q11.2.

Os tamanhos amostrais dos trabalhos originários do presente projeto dependerão do número de pacientes com a condição em estudo. Assim, a partir deles, serão realizados tanto relatos de casos como descrição de séries de casos que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de trabalhos de conclusão de curso, mestrados e doutorados. A amostra será de conveniência.

Critério de inclusão: Pacientes atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas e que aceitem participar do estudo.

Critério de exclusão: Pacientes atendidos pelo Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/HCSA suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas e que não aceitem participar do estudo.

O atendimento aos pacientes não será prejudicado independente de sua decisão de participar ou não da pesquisa, essa garantia estará explícita no processo de consentimento e no termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (vide Anexos), quando for o caso.

4.2 Extração de DNA

A partir da amostra de sangue em EDTA (tubo Vacutainer com tampa roxa), será realizada a extração de DNA no Laboratório de Citogenética da UFCSPA de acordo com o protocolo PUREGENE (<https://web.emmes.com/study/hbb/public/EN-Gentra-Puregene-Handbook-2011.pdf>). O DNA extraído será armazenado no próprio Laboratório para análise futura.

4.3 Cultura de células de sangue periférico

A cultura de células é baseada no protocolo de Moorhead et al. (1960), seguindo as etapas:

- 1) Cerca de 0,2 mL de sangue periférico heparinizado são adicionadas a tubo de cultura descartável, estéril de 15 mL, contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 50 µL de fitohemaglutinina M e levados à estufa a 37°C por 72 horas;
- 2) Após 72 horas de cultivo adiciona-se colcemide, para uma concentração final de 0,01 µg/mL, centrifugando-se imediatamente, por 5 minutos;
- 3) O sobrenadante é desprezado e o precipitado celular é ressuspenso em 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075M) e levado ao banho-maria a 37°C por 10 minutos;
- 4) São adicionados 0,5 mL de fixativo (metanol:ácido acético glacial - 3:1). Inverte-se o tubo de cultura 2-3 vezes, levando-se à centrífuga por mais 5 minutos; o sobrenadante é desprezado e o precipitado é ressuspenso com toques leves no tubo, com posterior fixação das células pela adição de 5-8 mL de fixativo, misturando-se com pipeta Pasteur;
- 5) A amostra fixada é levada ao freezer (-20°C), onde é armazenada para posterior preparação de lâminas para os procedimentos de FISH.

4.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica envolve 4 etapas críticas que são a desnaturação, hibridização, lavagens rigorosas e detecção (Figura 4) (Hoovers J.M, 1999; Oostlander A.E., Meijer G.A. & Ylstra B., 2004).

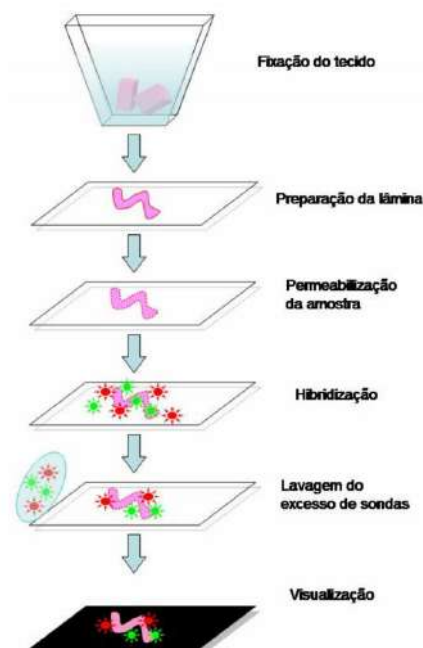


Figura 4 Ilustração resumida das etapas da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Adaptado de Neves & Guedes, 2012.

Para a realização desta metodologia em amostras de suspensão de células fixadas será utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante Abbott Molecular, com aplicação de sondas de DNA marcadas com material fluorescente. Este consiste resumidamente nos seguintes passos:

As amostras a serem estudadas serão as suspensões fixadas obtidas no cultivo de alta resolução. A suspensão é aplicada em lâminas, que são tratadas com 2X SSC e desidratadas em etanol. A sonda de DNA é aplicada à região alvo marcada na lâmina, sendo coberta imediatamente com uma lamínula e selada com cimento de borracha. As lâminas são incubadas em estufa à temperatura de 72-80°C por 2-3 minutos. A seguir, as lâminas são colocadas em uma câmara úmida protegida da luz, em estufa a 37°C, por um período de 16 a 24 horas. Após a hibridização, a lamínula e o cimento de borracha são removidos e as lâminas lavadas sequencialmente em 2X SSC/0,3% Tween 20 a 73°C e em 2X SSC e desidratadas. Ao final, o contra-corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é aplicado às lâminas. Estas são cobertas com lamínulas, deixando-as, a seguir, armazenadas na geladeira a 4°C para posterior análise ao microscópio. A análise será realizada em um microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 Zeiss ou Olympus BX51, ambos disponíveis em nosso laboratório. Em cada caso serão analisadas 20 metáfases e 200 núcleos interfásicos quanto à presença dos respectivos sinais de hibridização das sondas utilizadas. As imagens serão capturadas através de câmera digital de alta resolução acoplada aos microscópios de fluorescência e processadas utilizando-se um software de captura e análise de imagens. As descrições da análise, com a contagem de sinais fluorescentes por metáfase e por núcleo interfásico, serão realizadas em uma ficha padrão.

4.5 Análise de microdeleções/microduplicações pela técnica de MLPA

A MLPA é uma técnica baseada na PCR que realiza uma análise genética semiquantitativa. Possui muitas vantagens como: alta eficiência, facilidade operacional e baixo custo. A MLPA vem sendo aplicada em pesquisas de doenças associadas com CNVs, mutações pontuais e metilação (Zhou & Ren, 2009). É um método sensível, podendo detectar anormalidades no número de cópias do DNA com no mínimo 20 ng de amostra de DNA humano. Nesta técnica, não são as sequências alvo que são amplificadas, mas as sondas que hibridizam com a sequência alvo (Schouten et al., 2002).

Neste estudo serão utilizados o kit *SALSA MLPA probemix P245-B1* (para a detecção de síndromes de microdeleção), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante MRC-Holland. A reação do MLPA é dividida em 5 passos: 1) Desnaturação do DNA e hibridização das sondas de MLPA; 2) Reação de ligação; 3) Reação da PCR; 4) Separação e amplificação dos produtos por eletroforese, e 5) Análise de dados (Figura 2).

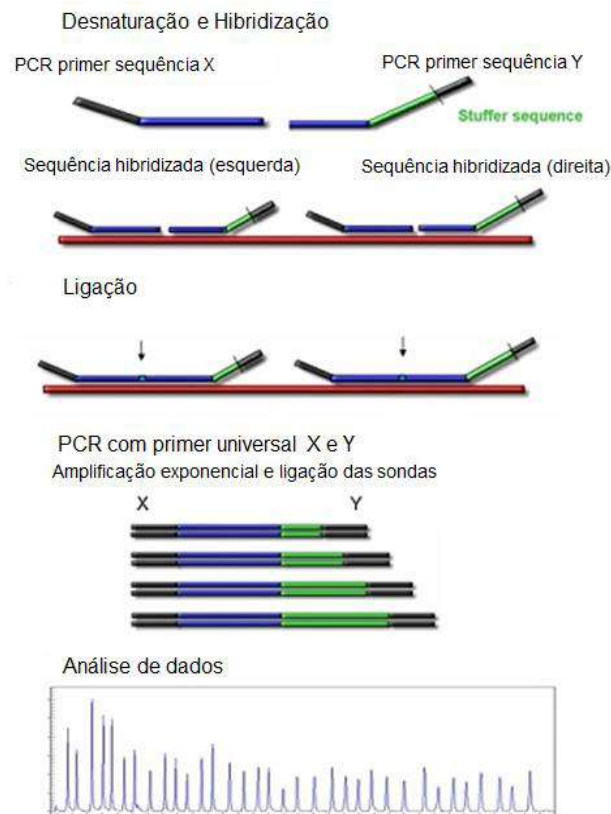


Figura 5. Esquema explicativo da técnica de MLPA. Adaptado de www.mlpa.com

Neste estudo, será diluído de 50 a 100 ng de DNA genômico em 5 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,2 + 0,1 mM de EDTA). É importante que todas as amostras estejam na mesma

concentração para que o resultado não seja duvidoso. As amostras serão desnaturadas no termociclador durante 5 minutos a 98°C e serão deixadas para esfriar a 25°C dentro do equipamento. Serão utilizados tubos controle contendo apenas TE. Serão adicionados 3 µL do mix de hibridização em cada amostra (1,5 µL de *MLPA buffer* (tampa amarela) + 1,5 µL *SALSA probemix* (tampa preta)). As mesmas serão aquecidas por 1 minuto a 95°C, seguido de 16-20 horas a 60°C.

A temperatura será reduzida para 54°C antes de abrir o termociclador. Serão adicionados a cada amostra 32 µL do mix *Ligase-65* para cada amostra (25 µL de dH₂O + 3 µL de *Ligase buffer A* (tampa transparente) + 3 µL de *Ligase buffer B* (tampa branca) + 1 µL da enzima *Ligase-65* (tampa verde)), misturando bem com a pipeta. Serão preparados em menos de 1 hora antes do uso e armazenados em gelo. A seguir, as amostras serão incubadas a 54°C durante 15 minutos (para a ligação) e a 98°C por 5 minutos, para a inativação da enzima pelo calor. As amostras serão resfriadas a 20°C dentro do equipamento, para remoção dos tubos.

Em temperatura ambiente, serão adicionados 10 µL do mix polimerase em cada amostra (7,5 µL de dH₂O + 2 µL de *SALSA PCR primer mix* (tampa marrom) + 0,5 µL de *SALSA Polimerase* (tampa laranja)). As mesmas serão agitadas cuidadosamente com a pipeta e armazenadas em gelo até o uso. Para preparação do mix, deve-se agitar o *SALSA PCR primer mix*, aquecendo a polimerase por 10 segundos na mão, para reduzir a viscosidade. As amostras a seguir serão colocadas no termociclador e será iniciada a reação de PCR: 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, e 60 segundos a 72°C. Ao final, terminar-se-á com 20 minutos de incubação a 72°C, com pausa a 15°C mantendo os tubos fechados para evitar contaminação.

Após a reação de PCR, os tubos serão deixados por 1 hora em um local escuro para diminuir a quantidade de *shoulder peaks* na eletroforese capilar pela adição de nucleotídeos adeninas ao final das cadeias amplificadas. Em seguida, em cada amostra será misturada 0,7 µL da PCR + 0,2 µL de *LIZ GS 500 size standard* ou 0,3 µL de *HOX GS 500 size standard* (Thermo Fisher Scientific) + 9 µL de formamida *Hi-Di*. Aplaca de injeção será selada, sendo a amostra aquecida por 3 minutos a 86°C e resfriada por 2 minutos a 4°C. As amostras serão submetidas à eletroforese capilar no Sequenciador Automático ABI3130, com leitura de comprimento de onda de 488 nm a 650 nm, seguido de análise no software *Gene Mapper* (Applied Biosystems). As amostras deverão ser injetadas no equipamento a 1,6 kilovolt por 15 segundos. A corrida deve ser de 15 kilovolt por 3 minutos.

Os dados brutos gerados pela eletroforese capilar serão importados pelo software *Coffalyser* (MRC-Holland), um programa baseado no Excel, capaz de normalizar todos os

dados e avaliar a qualidade dos scores de cada amostra, auxiliando na interpretação dos resultados. Este programa também é capaz de indicar possíveis erros que ocorreram durante a reação, impedindo que a análise continue ou ainda informando sobre qualquer interferência que possa gerar um resultado duvidoso.

4.6 Processamento dos dados e análise estatística

Os estudos originados do presente projeto (relatos de casos e descrição de séries de casos) serão principalmente descritivos. Para avaliação das características clínicas de grupos maiores de pacientes com um mesmo diagnóstico serão criados bancos de dados nos programas Excel 6.0 e SPSS versão 21.0 para Windows e utilizados testes estatísticos específicos, apropriados para cada situação. Variáveis como idade, sexo, etnia, frequência de características clínicas específicas (como presença, por exemplo, de cardiopatia congênita e anomalias renais) e sobrevida, poderão ser comparadas com as de pacientes com o mesmo diagnóstico descritas na literatura através de testes estatísticos adequados presentes ou nos próprios programas onde os bancos de dados foram formados, ou em programas auxiliares como o PEPI. Isto dependerá somente da variável e do teste estatístico em questão.

4.7 Aspectos Éticos

O atendimento médico aos pacientes do SUS, tanto hospitalizados como em ambulatório, já é realizado no HCSA pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA há mais de 40 anos. Não haverá nenhuma modificação nesse atendimento, independente de os indivíduos serem convidados ou não, e aceitarem ou não, participar do estudo. Também não haverá variação ou influência no número de atendimentos ou nas solicitações de exames complementares disponibilizados pelos diferentes laboratórios do HCSA/ISCOMPA. Ou seja, nenhum exame adicional será realizado às expensas do HCSA/ISCOMPA. Somente serão incluídos na amostra os indivíduos (ou seus responsáveis) que assinarem previamente o termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de assentimento, quando for o caso, para participação na pesquisa (vide Apêndice). A realização dos testes genéticos somente será disponibilizada aos indivíduos com indicação clínica de realização do teste. Para aqueles indivíduos com indicação de realização de teste genético, mas cujo teste ainda não está disponível, como por exemplo arrayCGH e análise do exoma, o material

biológico será coletado, processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Esse material fará parte de um biorepositório que será utilizado assim que os testes estiverem disponíveis e após será descartado. O contato e a coleta das amostras dos indivíduos somente serão iniciados após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCSA.

Após a coleta todos os pacientes serão registrados com a utilização de números, mantendo assim a confidencialidade. Ao final de cada estudo será elaborado um laudo com a descrição dos testes genéticos realizados, bem como seus resultados. Esse laudo será fornecido aos indivíduos ou seus responsáveis durante o atendimento realizado pelos médicos do serviço.

4.8 Riscos e benefícios

O risco físico aos indivíduos está relacionado com a coleta do sangue. Como as coletas serão realizadas de modo associado com as coletas de rotina do hospital, não haverá nenhum risco adicional. O atendimento as possíveis complicações decorrentes da coleta de material se dará do mesmo modo rotineiramente realizado no HCSA.

O material coletado será preservado confidencial, sendo que será sempre assegurado o anonimato dos pacientes envolvidos na pesquisa.

Como benefício direto, o paciente poderá realizar exames genéticos que não são realizados no âmbito do SUS, obtendo laudo diagnóstico descritivo. De modo indireto, a divulgação do conhecimento científico e a transmissão das experiências clínicas vivenciadas pelos mesmos auxiliarão no melhor entendimento das condições genéticas. A participação de alunos no desenvolvimento do projeto contribuirá para a sua formação acadêmica e qualificação profissional. O conhecimento obtido será muito útil no atendimento futuro de pacientes do HCSA.

5 CRONOGRAMA

ANO SEMESTRE ATIVIDADES	2017 2º	2018 1º	2018 2º	2019 1º	2019 2º	2020 1º	2020 2º	2021 1º	2021 2º	2022 1º
Elaboração do projeto	X									
Submissão ao comitê de ética	X									
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta das amostras		X	X							
Execução dos procedimentos laboratoriais		X	X	X	X	X	X	X	X	
Análise e interpretação dos resultados			X	X	X	X	X	X	X	
Defesa de trabalho de conclusão de curso			X				X			
Defesa de dissertação					X			X		
Defesa de Tese										X
Redação de artigos científicos				X		X		X		X

6. ORÇAMENTO

Itens	Valor
CULTURA DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO	
<i>REAGENTES PARA O CULTIVO</i>	R\$ 10.000,00
EXTRAÇÃO DE DNA	
<i>REAGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA</i>	R\$ 9.000,00
FISH	
<i>SONDAS DE MICRODELEÇÕES/MICRODUPLICAÇÕES E DAPI</i>	R\$ 40.091,00
MLPA	
<i>ANÁLISES POR MLPA</i>	R\$ 40.023,00
TOTAL R\$ 99.114,00	

O financiamento da coleta, processamento, armazenamento das amostras e análise por FISH e MLPA será realizado com os recursos já existentes no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, oriundos de edital PROEXT 2016. A realização de análises complementares se dará a partir da obtenção de recursos de agências de fomento.

7. REFERÊNCIAS

- Abbott Molecular. Disponível em: https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/AbbottMolecular_LSI_FISH_Procedure.pdf. Acessado em: 19.07.2017.
- Albertson, D. G., & Pinkel, D., 2003. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human molecular genetics*, 12(suppl_2), pp.R145-R152.
- Arnold, J., 1879. Beobachtungen über Kerntheilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Archiv*, 78(2), pp.279-301.
- Bailey, J. A., & Eichler, E. E., 2006. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nature reviews. Genetics*, 7(7), pp.552.
- Blue, G.M. et al., 2012. Congenital heart disease: Current knowledge about causes and inheritance. *Medical Journal of Australia*, 197(3), pp.155–159.
- Bruneau, B.G., 2008. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, 451(7181), pp.943–948.
- Brunetti-Pierri, N. et al., 2008. Recurrent reciprocal 1q21. 1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nature genetics*, 40(12), pp.1466-1471.
- Bui, T. H., 2007. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon!. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 30(3), pp.247-251.
- Buiting, K., 2010. Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 154(3), pp.365-376.
- Butler, M. G. et al., 1986. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 23(3), pp.793-809.
- Cai, W. W. et al., 2002. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nature biotechnology*, 20(4), pp.393-396.
- Crotwell, P. L., & Hoyme, H. E., 2012. Advances in whole-genome genetic testing: from chromosomes to microarrays. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 42(3), pp.47-73.
- Deak, K. L. et al., 2011. The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: Variable expressivity and genomic complexity. *Clinics in laboratory medicine*, 31(4), pp.543-564.
- El-Ella, S. S. et al., 2012. Chromosome 22 microdeletion in children with syndromic congenital heart disease by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 13(3), pp.313-322.

- Fahed, A.C. et al., 2013. Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. *Circulation Research*, 112(4), pp.707–720.
- Gall, J. G., & Pardue, M. L., 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2), pp.378-383.
- Grati, F. R. et al., 2015. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenatal diagnosis*, 35(8), pp.801-809.
- Gross, S. J. et al., 2011. Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenatal diagnosis*, 31(3), pp.259-266.
- Gu, W. et al., 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 1(1), pp.4.
- Guerra, F. A. R. et al., 2008. Birth defects in Rio de Janeiro, Brazil: an evaluation through birth certificates (2000-2004). *Cadernos de saúde pública*, 24(1), pp.140-149.
- Harewood, L. et al., 2012. Structural variation and its effect on expression. *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols*, pp.173-186.
- Harewood, L. et al., 2010. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome research*, 20(5), pp.554-564.
- Harewood, L., & Fraser, P., 2014. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Human molecular genetics*, 23(R1), pp.R76-R82.
- Hastings, P. J. et al., 2009. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS genetics*, 5(1), p.e1000327.
- Hillman, S. C. et al., 2013. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(6), pp.610-620.
- Horovitz, D. D. G. et al., 2005. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual Birth defects and health strategies in Brazil: an overview. *Cad. saúde pública*, 21(4), pp.1055-1064.
- Hoovers J.M, 1999. Fluorescence in situ hybridization in the study of chromosomal abnormalities [Article in Dutch]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 143, pp.2265-2268.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM et al., 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), p. 1299-1320.
- Itsara, A. et al., 2009. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *The American Journal of Human Genetics*, 84(2), pp.148-161.
- Jacquemont, S. et al., 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11. 2 locus. *Nature*, 478(7367), pp.97.

John, H. A., Birnstiel, M. L., & Jones, K. W., 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223(5206), pp.582-587.

Jones, K. L., Jones, M. C., & Del Campo, M., 2013. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Klopocki, E., & Mundlos, S., 2011. Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annual review of genomics and human genetics*, 12, pp.53-72.

Kozlowski, P., Jasinska, A. J., & Kwiatkowski, D. J., 2008. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 29(23), pp.4627-4636.

Krantz, I. D. & Spinner, N. B., 2007. Novel microdeletion syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 145(4), pp. 323-326.

Lee, C., & Scherer, S. W., 2010. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert reviews in molecular medicine*, 12.

Lee, C., Iafrate, A. J., & Brothman, A. R., 2007. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nature genetics*, 39, pp.S48-S54.

Lejeune, J., Turpin, R., & Gautier, M., 1959. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, 143(11-12), p.256.

Liehr, T., & Pellestor, F., 2009. Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure. *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 23-34.

Lindsay, S. J. et al., 2006. A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. *The American Journal of Human Genetics*, 79(5), pp.890-902.

Liu, P. et al., 2012. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Current opinion in genetics & development*, 22(3), pp.211-220.

Lupski, J. R., & Stankiewicz, P., 2005. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS genetics*, 1(6), e49.

MacDonald, J. R., 2013. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic acids research*, 42(D1), pp.D986-D992.

Merla, G. et al., 2006. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *The American Journal of Human Genetics*, 79(2), pp. 332-341.

Moorhead, P. S. et al., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental cell research*, 20(3), pp.613-616.

MRC-Holland. Disponível em:

http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_fNPBLedDVp38p-

CxU2h0mQ. Acessado em: 01.07.2017.

Neves, S. M. N., & Guedes, R. M. C., 2012. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79(4), pp.627-632.

Oostlander A.E., Meijer G.A. & Ylstra B., 2004. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.*, 66, pp.488-495.

Oskarsdottir, S., Vujic, M., & Fasth, A., 2004. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Archives of Disease in Childhood*, 89(2), pp.148-151.

Redon, R. et al., 2006. Global variation in copy number in the human genome. *nature*, 444(7118), p.444.

Ricard, G. et al., 2010. Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models. *PLoS biology*, 8(11), e1000543.

Riegel, M., 2014. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. *Genetics and molecular biology*, 37(1), pp.194-209.

Robinson A & Linden M.G., 1993 Clinical genetics handbook. Boston, USA: Blackwell Science.

São Paulo (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. Declaração de Nascido Vivo - Manual de Anomalias Congênitas (2012) 2nd edition. Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, 97 pp.

Schinzel, A., 2002. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. *Chromosome Research*, 10(1), pp.1-4.

Schlattl, A. et al., 2011. Relating CNVs to transcriptome data at fine resolution: assessment of the effect of variant size, type, and overlap with functional regions. *Genome research*, 21(12), pp.2004-2013.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J. & Waaijer, R., 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e:57.

Schubert, C., 2009. The genomic basis of the Williams–Beuren syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(7), pp.1178-1197.

Seabright, M., 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, 298(7731), pp.971-972.

Sebat, J. et al., 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305(5683), pp.525-528.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J. & Waaijer, R., 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e:57

Shaffer, L.G. et al., 2007. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, 145(4), pp.335-345.

Shaw, C. J., & Lupski, J. R., 2004. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human molecular genetics*, 13(suppl_1), pp.R57-R64.

Sørensen, K. M. et al., 2008. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Analytical chemistry*, 80(23), pp.9363-9368.

Stankiewicz, P. et al., 2003. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), pp.1101-1116.

Stevenson, R. E., & Hall, J. G., 2005. Human malformations and related anomalies. *Oxford University Press*.

Stranger, B.E. et al., 2007. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 315, pp.848–853.

Stuppia, L et al., 2012. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), pp.3245-3276.

Turnpenny P. D. & Ellard S, 2016. Emery's Elements of Medical Genetics E-Book, *Genética médica*. 15° ed. Elsevier.

Van den Veyver, I. B et al., 2009. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenatal diagnosis*, 29(1), pp.29-39.

Vialard, F. et al., 2012. Prenatal BACs-on-Beads™: the prospective experience of five prenatal diagnosis laboratories. *Prenatal diagnosis*, 32(4), pp.329-335.

Watson, C. T. et al., 2014. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annual review of genomics and human genetics*, 15, pp.215-244.

Wilson, G., 2000. *Clinical genetics: a short course*. Wiley-Liss.

Weise, A. et al., 2012. Microdeletion and microduplication syndromes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(5), pp.346-358.

Wellesley, D. et al., 2012. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *European Journal of Human Genetics*, 20(5), p.521.

World Health Organization. Congenital anomalies. WHO: 2016. [acesso em 01 de jun de 2017]. Disponível em: www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs370/en/ - 47k

Zeitlin, J., Mohangoo, A. & Cuttini, M., 2009. The European Perinatal Health Report: comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe, pp.681-682.

Zhou, D.-W. & Ren, Z.-R., 2009. Multiplex ligation-dependent probe amplification and its application. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 26(1), pp.45–49.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de Pesquisa

Protocolo de Avaliação

Identificação

1. Ficha (Genética Clínica): _____ 2. Sexo: 1. Masculino 2. Feminino
3. Etnia: 1. Eurodescendente 2. Afrodescendente 3. Mista 4. Outra
4. Idade na primeira avaliação: ____ anos ____ meses ____ dias DN: ____ / ____ / ____
5. Motivo do encaminhamento: _____
6. Encaminhado pelo (Especialidade): _____
7. Idade do pai: _____ 8. Idade da mãe: _____
9. Consangüinidade entre os pais: 1. Sim 2. Não
10. História familiar: 1. Sim 2. Não

Exame físico (1º)

1. Idade: ____ anos ____ meses ____ dias Data: ____ / ____ / ____
 2. Medidas antropométricas (primeira avaliação):
- # Altura: ____ cm (P____) # Peso: ____ Kg (P____) # PC: ____ cm (P____)

3. Exame Físico/Dismorfológico:

I. ANORMALIDADES CRANIOFACIAIS

CRÂNIO: _____

FACE: _____

OLHOS: _____

NARIZ: _____

BOCA: _____

ORELHAS: _____

II. TORAX: _____

III. ABDOME: _____

III. ANOGENITAL: _____

IV. MEMBRO SUPERIOR: _____

V. MEMBRO INFERIOR: _____

VI. PELE E ANEXOS: _____

☐ OUTRAS: _____

Exames e avaliações complementares

1. Avaliação Oftalmológica: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

2. Avaliação Otorrinolaringológica: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

3. Raio-X de Coluna: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

4. Avaliação Cardiológica: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

- Ecocardiografia: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

5. Ecografia abdominal: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando (1º)? _____ 1. Normal 2. Alterada

Alteração: _____

6. Provas de Função da Tireóide: 1. Sim 2. Não

Se sim: Quando? _____ 1. Normal 2. Alterada

Teste do Pezinho? 1. Sim 2. Não

Alteração: _____

7. Outros exames e avaliações: 1. Sim 2. Não

Qual(is): _____

Alteração(ões): _____

8. Resultado do cariótipo (paciente): _____

9. Resultado do cariótipo – pais: _____

10. Óbito: 1. Não 2. Sim. Idade: _____ Causa: _____

ANEXO B – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas” (15 de agosto de 2017)

As doenças genéticas são raras e seu diagnóstico é dependente de testes genéticos. Não existe um teste genético único que possibilite o diagnóstico de todas as doenças genéticas. O médico geneticista orienta a investigação mais adequada para cada indivíduo. O acesso a testes genéticos no Sistema Único de Saúde é muito restrito.

Sendo assim você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada **“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas”**. O objetivo do estudo é realizar investigação clínica e genética de indivíduos com suspeita de doença genética. O estudo será realizado durante seu atendimento de rotina pelos médicos geneticistas do HCSA e não irá alterar o tempo de atendimento. Os dados coletados são relacionados com o atendimento médico, como idade, sexo, história da doença, informações familiares, exame físico e exames já realizados. O único procedimento adicional será a coleta de uma amostra de sangue para a realização dos exames genéticos.

A realização do teste genético pode nos auxiliar a obter o diagnóstico do seu filho. Com a confirmação do diagnóstico podemos realizar o aconselhamento genético e ajustar tratamentos que seu filho possa necessitar. Além disso, o diagnóstico de doenças genéticas é importante para a divulgação e ampliação do conhecimento médico e pode ser de grande auxílio na definição diagnóstica de outros indivíduos com a mesma doença.

Os riscos são associados a coleta do sangue, podendo ocorrer desconforto e sangramento mínimos. Nesses casos a assistência será gratuita e realizada pela própria equipe. Todas as informações coletadas são protegidas pelo sigilo médico. As informações serão colocadas em tabelas e identificadas somente por números. A sua identidade e de seu filho(a) não será revelada.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo casual comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Somente os custos relacionados aos testes genéticos serão cobertos pela pesquisa.

A sua participação e de seu filho(a) é voluntária e a decisão de não participar do estudo não afetará em nada o seu atendimento no hospital. Além disso, você pode desistir da pesquisa a qualquer momento.

O seu nome e de seu filho(a) não serão revelados em momento algum. As informações utilizadas para publicação não permitirão que ele seja identificado. As imagens fotográficas poderão ser utilizadas em publicações, após a assinatura do TCLE, respeitando sempre o anonimato. Os dados serão utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde.

Telefones de contato:

- Investigador principal: Prof. Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen (51) 99982.9322; (51) 33038774.

- Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Criança Santo Antônio – sob coordenação de Catiane Zanin Cabral, telefone 3214.8997 – para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa.

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações fornecidas e que decidiu participar voluntariamente deste estudo. Uma via será entregue a você e outra será arquivada pelo investigador principal.

Nome do Sujeito de Pesquisa (letra de forma)

Data _____

Representante legal

Responsável pela aplicação do TCLE

Data _____

Assinatura

ANEXO C – Termo de assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas”**. Seus pais permitiram que você participe.

Queremos saber **o que tem causado o seu mal estar. Qual o motivo que faz com que você não se sinta bem e necessite realizar consultas e ficar no hospital.**

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de **dias de vida a 17** anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita no **Hospital da Criança Santo Antônio**, onde as crianças **fazem as suas consultas e tratamentos**. Para isso, será usado **sangue**. O uso do **sangue** é considerado seguro, mas é possível ocorrer **desconforto ou sangramento mínimos na coleta**. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones **(51-33038774) (51-999829322)** do pesquisador **Paulo Zen**.

Mas há coisas boas que podem acontecer como **descobrir o motivo que faz com que você precise consultar ou internar no hospital e melhorar o seu tratamento.**

Se você morar longe do **Hospital da Criança Santo Antônio**, nós daremos a seus pais dinheiro suficiente para transporte, para também acompanhar a pesquisa.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa **nós explicaremos para você e seus pais todos os resultados encontrados em seu exame.**

Eu escrevi os telefones acima caso tenha alguma dúvida.

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas ou síndromes malformativas”**, que tem o objetivo de **“investigar qual o motivo que faz com que eu precise consultar e internar no hospital”**. Entendi as coisas ruins e as coisas boas

que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Porto Alegre, ____ de ____ de ____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

PROJETO DE PESQUISA

I. Identificação do Projeto de Pesquisa:

Título do Projeto: Avaliação de Mutações nos genes *BRAF*, *RAS* e *TERT* em Nódulos de Tireoide. Este projeto é integrante do projeto maior “Avaliação de aspectos clínicos, ultrassonográficos, citopatológicos e moleculares na doença nodular de tireoide”.

Palavras-chave: nódulos de tireoide, mutações, *BRAF*, *RAS*, *TERT*, câncer de tireoide.

Resumo do Projeto:

O nódulo de tireoide é uma condição clínica frequente, podendo atingir cerca de 2/3 da população quando avaliada por ultrassonografia, que necessita avaliação específica para descartar a presença do carcinoma da tireoide (CT). Pode representar um desafio para os clínicos, em especial nos casos de citologia indeterminada, em que os métodos diagnósticos disponíveis não definem a natureza do nódulo, o que ocorre em aproximadamente 20 - 25% das punções de tireoide (PAAF). Atualmente a cirurgia diagnóstica é a conduta recomendada na maioria dos nódulos com citologia indeterminada, podendo ser evitada se a avaliação pré-operatória estabelecer com confiabilidade o diagnóstico de lesão benigna. A indicação cirúrgica para fins diagnósticos aumenta o risco de comorbidades aos pacientes e gera maiores custos. Ainda, o diagnóstico pré-operatório indeterminado pode levar ao planejamento cirúrgico inadequado em pacientes com câncer de tireoide, com necessidade de cirurgia adicional. As mutações *BRAF* e *RAS* são as alterações genéticas mais frequentemente detectadas no carcinoma diferenciado de tireoide (CDT), e mutações no *TERT* têm sido associadas com piora significativa no prognóstico do CDT. A avaliação de mutações nos genes *BRAF*, *TERT* e *RAS* pode ser realizada no material proveniente da PAAF-US, aumentando a acurácia e fornecendo importantes informações diagnósticas e terapêuticas. O objetivo do presente projeto é avaliar a frequência das mutações no *BRAF* (V600E) e *RAS* (*NRAS* códon 61, *HRAS* códon 61, e *KRAS* códon 12/13), e *TERT* (C228T e C250T) nos nódulos de tireoide, bem como a significância clínica de sua identificação e sua associação com as características clínicas,

ultrassonográficas e citopatológicas. A avaliação molecular dos nódulos tireoidianos nos casos selecionados visaria reduzir os procedimentos diagnósticos adicionais e encaminhamentos cirúrgicos desnecessários, buscando uma significativa qualidade de vida dos pacientes e a desoneração do Sistema Único de Saúde.

II. Dados do proponente e equipe:

Vanessa Suñé Mattevi – Graduada em Farmácia e em Bioquímica, Mestra e Doutora em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS, professora associada da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) na disciplina de Biologia Molecular. É orientadora nos Programas de Pós-graduação em Biociências e em Patologia da UFCSPA e responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular da mesma instituição.

Lenara Golbert - Médica Endocrinologista, Doutora em Ciência Médicas: Endocrinologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), professora adjunta do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo Ambulatório de Tireoide e de Câncer de Tireoide do Serviço de Endocrinologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).

Erika Laurini de Souza Meyer - Médica Endocrinologista, Doutora em Ciência Médicas: Endocrinologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), professora associada do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), responsável pelo Ambulatório de Tireoide e de Câncer de Tireoide do Serviço de Endocrinologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).

Laura Berton Eidt – Médica Endocrinologista, aluna do PPG Patologia sob orientação da Dra. Vanessa Mattevi.

Fabiana Jaeger - Médica Endocrinologista, aluna do PPG Patologia sob orientação da Dra. Vanessa Mattevi.

Colaborações ou parcerias já estabelecidas para a execução do projeto:

O presente projeto é fruto de uma parceria entre o Laboratório de Biologia Molecular e o Serviço de Endocrinologia da Irmandade da Santa Casa de Porto Alegre (ISCMPA). Os pacientes serão recrutados junto ao Serviço de Endocrinologia da Irmandade da Santa Casa de Porto Alegre (ISCMPA). As análises citológicas e histológicas serão realizadas no Serviço de Patologia da ISCMPA e as análises moleculares serão realizadas no Laboratório de Biologia Molecular.

III. Caracterização da Proposta:

Doença Nodular da Tireoide

O nódulo de tireoide é frequente, detectado pela palpação em cerca de 4 a 5% das mulheres e 1% dos homens adultos (1). No entanto, com a maior utilização da ultrassonografia (US) de região cervical em avaliações de rotina nas várias especialidades médicas, a prevalência de nódulos na tireoide aumenta, variando de 20 a 67%, sendo as frequências mais elevadas em mulheres e idosos (2). Aproximadamente, 5 a 15% dos nódulos tireoidianos são malignos. A incidência de câncer de tireoide vem aumentando significativamente em várias regiões do mundo, devido, principalmente, à identificação de doença subclínica pela melhora dos métodos de imagem e, também, pelo seu uso indiscriminado, sem tradução em modificações na mortalidade (3,4). Dados da América Latina (Argentina, Brasil e Chile) corroboram estes resultados em mulheres (5).

O câncer de tireoide (CT), na maioria dos casos, apresenta-se como um nódulo que pode ser indistinguível clinicamente de um nódulo benigno. Dessa forma, o objetivo da avaliação frente à descoberta de nódulo(s) na tireoide, é distinguir os nódulos benignos dos malignos (1,3), esses últimos tratados cirurgicamente. Uma avaliação criteriosa da doença nodular da tireoide, seguindo protocolos estabelecidos na literatura, pode evitar cirurgias desnecessárias e aumentar a confiabilidade do acompanhamento clínico dos pacientes com nódulos benignos nos vários níveis de atendimento (3,6).

Avaliação da Doença Nodular de Tireoide

Os parâmetros clínicos reconhecidos de aumento da suspeita de malignidade são pouco específicos e, alguns, incomuns ao diagnóstico (3,5,7). A US da tireoide é um método diagnóstico de baixo custo, simples e com alta acurácia para avaliação dos nódulos de tireoide, sendo útil na indicação de qual(is) nódulo(s) serão puncionados para avaliação citopatológica (3,6,8,9). Vários estudos prévios avaliaram a importância dos achados ultrassonográficos como fatores preditores de malignidade dos nódulos tireoidianos (6-8). Os sistemas de classificação ecográfica, como o TIRADS-ACR (Colégio Americano de Radiologia), e o EU-TIRADS (Associação Europeia de Tireoide), têm sido alvo de avaliação em diversos grupos, incluindo o nosso, demonstrado que sua utilização na padronização dos dados ecográficos auxilia na indicação de biópsia e no seguimento de pacientes com nódulo de tireoide (8-10).

A punção aspirativa com agulha fina guiada pela US (PAAF-US) é o método de escolha para avaliação da natureza dos nódulos tireoidianos e seleção dos casos para tratamento cirúrgico (3,6). A avaliação citológica estabelece o diagnóstico com confiabilidade em 70-80% dos casos, o que implica no tratamento precoce do câncer de tireoide ainda em estágio inicial e, por outro lado, evita os procedimentos cirúrgicos desnecessários e suas complicações. Os resultados da citologia tireoidiana são classificados pelo sistema *Bethesda* (11), otimizando o compartilhamento de dados e estudos entre diferentes laboratórios em âmbito nacional e internacional, bem como a estimativa da probabilidade de câncer.

Citologia Indeterminada

Em aproximadamente 20-25% das PAAF-US de nódulos de tireoide, a citologia não pode descartar o câncer de tireoide, ou por material insuficiente (*Bethesda* I) ou pela citologia indeterminada (12). De acordo com o atual sistema de classificação, o Sistema *Bethesda*, a citologia indeterminada inclui três diagnósticos citológicos específicos: atipia ou lesão folicular de significado indeterminado (III), neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia folicular (IV) e suspeita de malignidade (V). Deve-se atentar à grande variabilidade de risco de malignidade em nódulos retirados cirurgicamente nos casos com citologia indeterminada (*Bethesda* III, IV e V) (12). Isso pode ser decorrente de uma variabilidade entre citologistas, do grau de experiência e excesso do uso da categoria III, bem como de fatores ambientais (12). Neste sentido, é importante que se conheça a prevalência local de malignidade nas diversas categorias do Sistema *Bethesda*. Dados locais demonstram que nos anos de 2015 e 2016, 1.394 pacientes foram submetidos a PAAF-US na Santa Casa de Porto Alegre. A prevalência de câncer foi de 25% na citologia indeterminada, 35% na neoplasia folicular, 95% na suspeita de malignidade e 100% na citologia maligna (dados não publicados). Dados recentes do nosso grupo em projeto relacionado à presente proposta corroboram esses dados. Uma vez que a citologia não provê o diagnóstico definitivo destes nódulos, a maioria dos pacientes com citologia indeterminada é encaminhada à cirurgia para a elucidação do diagnóstico histológico (padrão-ouro). Entretanto, apenas 10-40% destes nódulos (*Bethesda* III, IV e V) são malignos ao exame anatomopatológico (3, 6,12). A cirurgia diagnóstica poderia ser evitada se a avaliação pré-operatória estabelecer com confiabilidade o diagnóstico de lesão benigna. Ainda, o diagnóstico pré-operatório indeterminado pode levar a adoção de

extensão cirúrgica inadequada (tireoidectomia parcial) em pacientes com câncer de tireoide, levando à necessidade de cirurgia em dois tempos.

Avaliação Molecular dos Nódulos de Tireoide

A avaliação molecular pode ser realizada no material proveniente da PAAF-US, aumentando a acurácia e fornecendo importantes informações diagnósticas. As alterações genéticas mais frequentemente detectadas no CDT são as mutações no gene *BRAF* (V600E) e no proto-oncogene *RAS* (*NRAS* códon 61, *HRAS* códon 61, e *KRAS* códon 12/13), os rearranjos RET/PTC e PAX8/PPAR (13-15). A detecção de qualquer uma destas mutações é um forte preditor de malignidade, independentemente do diagnóstico citológico, sendo que mutações no gene *BRAF* correlacionam-se com desfecho maligno em aproximadamente 100% dos casos (13-15). Com base nesta elevada probabilidade, pacientes com citologia indeterminada e com estas alterações moleculares devem ser encaminhados para tratamento cirúrgico (13-17). Já as mutações no proto-oncogene *RAS* têm sido encontradas nas neoplasias de padrão folicular, tanto benignas (adenoma folicular) como malignas (Carcinoma Folicular e variante folicular do Carcinoma Papilar de Tireoide), mas sua prevalência é maior no CT (14,19). Sua avaliação nos nódulos indeterminados ainda é tema de grande controvérsia. Recentemente as mutações citadas no *RAS* foram detectadas em nódulos malignos de citologia benigna encaminhados a cirurgia (18). Esse dado sugere que características clínicas e resultados moleculares podem trazer informações adicionais na identificação de subgrupo de nódulos, que apesar da citologia benigna tem risco elevado de malignidade.

Nos últimos anos, mutações no promotor do gene *TERT* foram propostas como marcador molecular prognóstico no CT, especialmente quando associadas às mutações no gene *BRAF*. As mutações descritas no CT foram mutações C228T e C250T no promotor do gene e são predominantemente encontradas em doenças mais agressivas, como variantes histológicas de pior prognóstico (CPT variante células altas), CFT amplamente invasivo e carcinomas pobremente diferenciados (19-22). A prevalência das mutações no promotor do *TERT* é variável nos diversos países (de 7,5% a 25,5%). Os dados nacionais são escassos, bem como o estudo da sua avaliação na investigação de nódulos de tireoide indeterminados, suspeitos e malignos (21-23). Alguns autores têm estudado o valor da avaliação das mutações no *TERT* na avaliação pré-operatória, com fins diagnósticos e

prognósticos, e sua avaliação na PAAF-US tem sido considerada, num cenário clínico-patológico adequado (20-23).

Além de auxiliar no esclarecimento diagnóstico, a detecção de mutações *BRAF* e no promotor *TERT*, associadas com pior prognóstico, pode indicar a correta extensão cirúrgica, favorecendo à tireoidectomia total ao invés de cirurgias parciais (indicadas mais frequentemente nos últimos anos para carcinomas restritos a glândula tireoide). Sendo assim, a pesquisa de mutações no *BRAF* e *TERT* pode ter importância nos casos suspeitos e de câncer de tireoide (Bethesda classe III, IV, V e VI), mas sua recomendação necessita ser melhor investigada (21-23).

Dessa forma, o uso das tecnologias moleculares no diagnóstico, prognóstico e na avaliação da melhor opção terapêutica, aliados à elevada prevalência e projeção de incremento na incidência dos nódulos e câncer de tireoide, demonstram a relevância do presente projeto. Ressalta-se, a importância da pesquisa translacional, valorizando-se características demográficas, clínicas, ecográficas e citológicas para a indicação e avaliação dos testes moleculares num cenário de importante impacto na prática clínica.

IV. Objetivos

Geral: Avaliar a frequência e a significância das mutações nos genes *BRAF* (V600E), *TERT* (C228T e C250T), *H-RAS* (códon 61), *N-RAS* (códon 61) e *K-RAS* (nos códons 12/13) em nódulos de tireoide submetidos a avaliação citológica numa amostra de pacientes atendidos no ambulatório de Endocrinologia da Santa Casa de Porto Alegre, RS.

Específicos:

- Avaliar a presença da mutação V600E no gene *BRAF* nos nódulos de tireoide com citologia indeterminada, suspeita e maligna;
- Avaliar a presença de mutações C228T e C250T no promotor do gene *TERT* nos nódulos de tireoide com citologia indeterminada, suspeita e maligna;
- Avaliar a presença de mutações no códon 61 do proto-oncogene *N-RAS*, no códon 61 do proto-oncogene *H-RAS* e nos códons 12/13 do proto-oncogene *KRAS* nos nódulos de tireoide com citologia indeterminada;
- Avaliar a utilidade clínica da inclusão da análise das mutações nos genes *BRAF*, *TERT* e *RAS* nos nódulos com citologia indeterminada;

- Avaliar a utilidade clínica da inclusão da análise das mutações nos genes BRAF e TERT nos nódulos com citologia suspeita e maligna;
- Estabelecer quais pacientes com citologia indeterminada que se beneficiarão dos testes moleculares, levando em consideração os dados clínicos e ecográficos.

V. Metodologia proposta:

1. Delineamento da pesquisa: Estudo biprospectivo, observacional, com amostra consecutiva não-probabilística de todos os pacientes com nódulos de tireoide atendidos no Serviço de Endocrinologia encaminhados para avaliação citológica, que aceitarem participar do estudo.

2 Amostra: Foi calculada amostra consecutiva de 100 pacientes submetidos à PAAF_US para avaliação citológica. Até o momento foram coletadas amostras de 68 nódulos, em projetos relacionados à presente proposta.

2.1. Critérios de Inclusão e exclusão:

Critérios de Inclusão: Pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos, com diagnóstico clínico e/ou ultrassonográfico de nódulo(s) de tireoide, encaminhados para avaliação complementar (ecográfica e citológica)

Critérios de Exclusão: Pacientes com câncer de tireoide prévio.

3. Fatores de estudo

3.1 Dados clínicos e demográficos: Dados clínicos e demográficos são coletados em ficha clínica estruturada na avaliação inicial dos pacientes com nódulos de tireoide, de acordo com a rotina no ambulatório do Serviço de Endocrinologia.

3.2 Ultrassonografia (US) da tireoide e Punção Aspirativa com Agulha Fina guiada pela US (PAAF-US): Todos os participantes serão submetidos ao exame ultrassonográfico da tireoide (conforme recomendação do Consenso Brasileiro sobre Nódulos Tireoidianos e Câncer de Tireoide) por médico radiologista associado ao projeto. Dados ecográficos relacionados à malignidade e indicação de punção (PAAF-US) serão analisados e

preenchidos na ficha clínica. Avaliar-se-á o número de nódulos, tamanho, forma, ecogenicidade, presença de halo, regularidade, presença de microcalcificações e de linfonodomegalia em região cervical. O paciente será submetido à PAAF-US conforme indicação clínica pré-estabelecida (*Guideline* da Associação Americana de Tireoide e Consenso Brasileiro de Nódulo e Câncer de tireoide), sendo realizada aspiração multidirecional em: nódulos dominantes em pacientes com bócio multinodular; nódulos com achados suspeitos na US. A avaliação da eficácia dos sistemas de classificação US para seleção de pacientes a PAAF-US é objeto de mestrado de aluna sob orientação das proponentes no PPG de Patologia da UFCSPA, em fase de conclusão.

3.3 A análise citológica e histológica: a citologia será classificada segundo o Sistema Bethesda para Classificação Citológica de Nódulos de Tireoide. O exame anatomopatológico do material cirúrgico será realizado de acordo com a OMS e o diagnóstico patológico será considerado o padrão-ouro para diagnóstico do nódulo de tireoide.

3.4 Análise Molecular: As amostras coletadas através de PAAF serão encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), onde será realizada a extração de DNA e do RNA dos nódulos de tireoide através do protocolo descrito por Kizys *et al.* (2012). As amostras de RNA serão utilizadas para análise da expressão do gene da citoqueratina 7 (*KRT7*) através da metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando-se o gene GAPDH como controle constitutivo, para confirmação da presença de células da tireóide no aspirado. As amostras de DNA extraídas do aspirado serão submetidas ao sequenciamento de Sanger para busca das mutações V006E no gene BRAF, C228T e C250T no promotor do gene TERT, no códon 61 do proto-oncogene *N-RAS*, no códon 61 do proto-oncogene *H-RAS* e nos códons 12/13 do proto-oncogene *KRAS*.

3.5 Orçamento: Apresentado no Anexo 7-B. Salienta-se que alguns materiais necessários e que não estão incluídos no Anexo 7-B já estão disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

VI. Etapas de execução da proposta com respectivo cronograma de atividades:

Meta	Atividade	Semestre	
		1	2

	Seminário de acompanhamento e avaliação	X	X
1 Inclusão de amostras	Recrutamento de pacientes no Serviço de Endocrinologia (já em andamento em projeto Avaliação Molecular da Doença Nodular de Tireoide, do qual o presente é derivado)	X	X
	Coleta de dados clínicos, ultrassonográficos e citológicos (já em andamento em projeto Avaliação Molecular da Doença Nodular de Tireoide, do qual o presente é derivado)	X	X
	Preenchimento do banco de dados (já em andamento em projeto Avaliação Molecular da Doença Nodular de Tireoide, do qual o presente é derivado)	X	X
2. Análise molecular	2.1. Isolamento de ácidos nucleicos (já padronizadas no projeto Avaliação Molecular da Doença Nodular de Tireoide, do qual o presente é derivado)	X	X
	2.2. Detecção de mutações específicas dos genes <i>BRAF</i> , <i>RAS</i> e <i>TERT</i> .	X	X
3. Análise dos resultados	Avaliação da presença de mutações nos genes estudados, dos dados clínicos, ultrassonográficos, citopatológicos e anatomopatológicos		X
	Análise da presença de mutações nas citologias indeterminadas, suspeitas e malignas.		X
	Análise da presença de mutações nas diversas características clínicas e ultrassonográficas.		X
	Redação de artigos e divulgação dos resultados. Seminário de avaliação final		X

VII. Produtos esperados como resultado da execução do projeto, com previsão de cronograma de entregas anuais:

Os produtos esperados como resultado do presente projeto são:

- Elaboração de estudo de viabilidade e efetividade da implementação da detecção das mutações descritas nos genes *BRAF*, *TERT* e *RAS* para avaliação de nódulos de tireoide em nosso meio.

VIII. Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação, difusão socioeconômico e ambiental:

Este projeto tem potencial de impacto no desenvolvimento da linha de pesquisa de avaliação molecular do nódulo de tireoide. Pretende-se seguir avaliando o custo-efetividade da pesquisa molecular, modificação na conduta com a disponibilidade dos testes moleculares (número de cirurgias evitadas pela análise molecular e número de cirurgias corretas pelo uso da análise) a partir do presente estudo.

Os resultados e impactos esperados com a execução desse projeto e os subsequentes são:

- Redução dos custos relativos à avaliação e tratamento da doença nodular da tireoide, decorrente especialmente na redução de indicações de tireoidectomias diagnósticas, que somando-se com o alto custo hospitalar, apresenta o custo de dias não trabalhados para a recuperação cirúrgica e o tratamento hormonal do hipotireoidismo ao longo da vida. Deve-se considerar ainda no impacto custo-efetivo, as taxas e o alto custo das complicações cirúrgicas da tireoidectomia total, como o hipoparatiroidismo por lesão das glândulas paratireoides e a paralisia de cordas vocais, que chegam a 20,4% cirurgias de tireoide (24), e acarretam importante diminuição da qualidade de vida.
- Busca de um sistema de análise molecular custo-efetiva no nosso meio para ser utilizada no SUS.
- Formação de recursos humanos para atuação multidisciplinar na avaliação dessa condição;
- Diagnóstico precoce do câncer de tireoide em suas fases iniciais;
- Análise epidemiológica local de aspectos clínicos, patológicos e moleculares do nódulo de tireoide.

Referências Bibliográficas:

Referências Bibliográficas:

1. John B. Vander, Eugene A. Gaston, Thomas R. Dawber; The Significance of Nontoxic Thyroid Nodules Final Report of a 15-Year Study of the Incidence of Thyroid Malignancy. *Annals of Internal Medicine*. 1968;69(3):537-40.
2. Guth S, Theune U, Aberle J, Galach A, Bamberger CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(8):699–706.
3. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty G, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2015;26(1):thy.2015.0020.
4. Joseph J. Wiltshire Thomas M. Drake, Lesley Uttley, and Sabapathy P. Balasubramanian. Systematic Review of Trends in the Incidence Rates of Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26:11.

5. Mónica S. Sierra, Isabelle Soerjomataram, David Forman. Thyroid cancer burden in Central and South America, , Cancer Epidemiology 44S (2016) S150–S157).
6. Rosário PW, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RMB, Maciel LMZ, Maia AL, Vaisman M. Nódulo tireoidiano e cancer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. Arq Bras Endocrinol Metab. 2013; 57: 240-64.
7. Golbert L, de Cristo AP, Faccin CS, Farenzena M, Folgieriini H, Graudenz MS, et al. (2017) Serum TSH levels as a predictor of malignancy in thyroid nodules: A prospective study. PLoS ONE 12(11): e0188123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188123>
8. ACR Thyroid Imaging, Reporting and Data System (TI-RADS): White Paper of the ACR TI-RADS Committee. Franklin N. Tessler, MD, CMA, William D. Middleton, MD, Edward G. Grant, MD, Jenny K. Hoang, MBBS, Lincoln L. Berland, MD, Sharlene A. Teefey, MD, John J. Cronan, MD, Michael D. Beland, MD, Terry S. Desser, MD, Mary C. Frates, MD, Lynwood W. Hammers, DO, Ulrike M. Hamper, MD, Jill E. Langer, MD, Carl C. Reading, MD, Leslie M. Scoutt, MD, A. Thomas Stavros, MD
9. Gilles Russa Steen J. Bonnemab Murat Faik Erdogan Cosimo Duranted Rose Ngue Laurence Leenhardt. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. Eur Thyroid J 2017;6:225–237 DOI: 10.1159/000478927
10. Bruno Mussoi de Macedo, Rogério F. Izquierdo, Lenara Golbert, Erika L. Souza Meyer. Reliability of Thyroid Imaging Reporting and Data System (TI-RADS), and ultrasonographic classification of the American Thyroid Association (ATA) in differentiating benign from malignant thyroid nodules. Arch Endocrinol Metab. 2018;62/2
11. Cibas E S and Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Thyroid. 2017;11: 1341-1346.
12. Ohori NP, Schoedel K. Variability in the atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance diagnosis in the Bethesda System for Reporting thyroid cytopathology: sources and recommendations. Acta Cytol. 2011;55:492–8.
13. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikirov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Res 2003; 63: 1454-57.
14. Dragomira Nikolaeva Nikolova Hitoshi Zembutsu Tanio Sechanov Kalin Vidinov Low Siew Kee Radina Ivanova Elitza Becheva Miriana Kocova Draga Toncheva Yusuke Nakamura. Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of

molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. *Oncology Reports*; 2008: 105-121.
<https://doi.org/10.3892/or.20.1>.

15. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, Tallini G, et al. RAS point mutation and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2318-26.

16. Chudova D, Wilde JI, Wang ET, Wang H, Rabbee N, Egidio CM, et al. Molecular Classification of Thyroid Nodules Using High-Dimensionality Genomic Data. *J Clin Endocrinol Metab* 2010.

17. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Impact of Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid* 2015; 25: 1217-1223.

18. E. Macerola, T. Rago, A. Proietti, F. Basolo, P. Vitti. mutational analysis in the diagnostic work up of thyroid nodules: the real impact in a center with large experience in thyroid cytopathology. 2018; *Journal of Endocrinological Investigation* (<https://doi.org/10.1007/s40618-018-0895-z>).

19. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, Ribeiro C, Carrilho F, Leite V, Lobo C et al. TERT, BRAF, and NRAS in primary thyroid cancer and metastatic disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2017 102 1898–1907. (<https://doi.org/10.1210/jc.2016-2785>).

20. Censi S, Cavedon E, Bertazza L, Galuppini F, Watutantrige-Fernando S, De Lazzari P, Nacamulli D, Pennelli G, Fassina A, Iacobone M, Casal Ide E, Vianello F, Barollo S, Mian C, Frequency and Significance of Ras, Tert Promoter, and Braf Mutations in Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: A Monocentric Case Series at a Tertiary-Level 2017; *Front. Endocrinol* (<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00273>).

21. Decaussin-Petrucci M, Descotes F, Depaepe L, Lapras V, Denier M-L, Borson-Chazot F, Lifante J.-C, Lopez J. Molecular testing of BRAF, RAS and TERT on thyroid FNAs with indeterminate cytology improves diagnostic accuracy. 2017; *Cytopathology*, 1–6 (DOI: 10.1111/cyt.12493).

22. Censi S, Barollo S, Grespan E, Watutantrige-Fernando S, Manso J, Iacobone M, Ide EC, Galuppini F, Fassina A, Bertazza L, Vianello F, Pennelli G, Mian C. Prognostic significance of TERT promoter and BRAF mutations in TIR-4 and TIR-5 thyroid cytology. 2019; Eur J endocrinol, (<https://eje.bioscientifica.com>).
24. Hauch A1, Al-Qurayshi Z, Randolph G, Kandil E. Total thyroidectomy is associated with increased risk of complications for low- and high-volume surgeons. 2014; (12):3844-52 (doi: 10.1245/s10434-014-3846-8).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROJETO DE DOUTORADO

**Avaliação dos danos sobre a saúde decorrente da exposição
ocupacional aos poluentes atmosféricos em duas categorias de
motoristas profissionais**

Roseana Boek Carvalho

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Ramos Rhoden

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Amantea

Porto Alegre, 2018

RESUMO

A poluição atmosférica é considerada um problema de saúde pública mundial sendo que diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que os poluentes do ar são potencialmente mutagênicos, carcinogênicos e agentes de desregulação endócrina. A poluição do ar causada por atividades domésticas tem diminuído em todo o mundo enquanto a causada principalmente pelo uso crescente de veículos motorizados vem crescendo de forma alarmante, isso porque nossa sociedade ainda depende fortemente de combustíveis fósseis para geração de energia em várias aplicações, tais como os transportes. O aumento da frota automotiva está intimamente ligado com o aumento da classe profissional dos motoristas, o que ocorre principalmente devido ao aumento e a evolução dos serviços de transporte e entrega, levando esses trabalhadores a permanecerem expostos cronicamente aos tóxicos do ar. A classe profissional de motociclistas profissionais vem crescendo principalmente devido à necessidade de serviços de entregas, bem como a classe profissional dos motoristas de caminhões, sobretudo aqueles que destinam-se a realizar pequenas entregas diárias. Estudos relacionados aos profissionais do setor de transporte que comparam indivíduos que usam veículos fechados ou abertos ainda são bem contraditórios no que diz respeito à conclusão de qual classe profissional é mais afetada pela exposição aos poluentes do ar. Além disso, também há escassa literatura que compare a diferença da exposição a poluentes atmosféricos provenientes da queima de diferentes combustíveis fósseis. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar o dano sobre a saúde de motoristas profissionais, de caminhões e de motocicletas, causado pela exposição crônica a poluentes atmosféricos em uma região urbana com elevado fluxo veicular. Para alcançar o objetivo proposto será realizado um estudo transversal com 150 indivíduos para compor os seguintes grupos: motociclistas profissionais, motoristas profissionais de caminhão e funcionários administrativos (grupo controle). Os participantes responderão questionários de perfil sócio-demográfico, de sintomas respiratórios e de consumo de álcool. Será realizada: anamnese ocupacional para verificação do estado de saúde; avaliação de sintomas respiratórios; investigação do consumo de álcool; avaliação nutricional; avaliação cardiopulmonar; monitoramento passivo e ativo de poluentes do ar; exposição ao fumo; glicemia e perfil lipídico; marcadores de estresse oxidativo; perfil inflamatório; toxicidade pulmonar; determinação de metais e dano genotóxico.

Palavras-chave: poluição do ar; exposição ocupacional; monitoramento do ar; estresse oxidativo; genotoxicidade; metais pesados.

1 INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica é considerada um problema de saúde pública mundial, sendo que no ano de 2105 foi responsável por aproximadamente 6,4 milhões de mortes prematuras no mundo e 52.300 mortes prematuras no Brasil (GBD, 2016; LANDRIGAN, 2017). Estudos projetam que, se um rigoroso controle não for feito a poluição atmosférica irá causar cerca de 9 milhões de mortes por ano no mundo em meados de 2060 (OECD, 2016). Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que os poluentes do ar são potencialmente mutagênicos, carcinogênicos e agentes de desregulação endócrina (RENGARAI *et al.*, 2014; HASSANVAND *et al.*, 2018; SHEN, 2017). A poluição atmosférica foi responsável, em 2015, em nível mundial, por: 19% de mortes relacionadas com eventos cardiovasculares, 24% de mortes relacionadas a doenças isquêmicas, 21% de mortes relacionadas a acidentes vasculares cerebrais e 23% de mortes relacionadas a câncer de pulmão (GRANDJEAN & LANDRIGAN, 2014; LANDRIGAN, 2017).

A poluição do ar é definida, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) como:

A contaminação da atmosfera com qualquer agente químico, físico e/ou biológico que modifica as características originais da mesma, podendo representar riscos à saúde humana e ao ambiente.

Segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente 003/1990 (BRASIL, 1990) a poluição do ar é conceituada como:

Qualquer forma de matéria ou energia com intensidade, concentração, tempo ou características que possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e à qualidade de vida da comunidade.

Conhecendo essas definições podemos concluir que a exposição a uma atmosfera poluída faz com que não inalemos apenas o oxigênio necessário à manutenção da vida, mas também poeira, fumaça, produtos químicos, micro-organismos e outras partículas nocivas que estão suspensas no ar (RIOS & BOECHAT, 2011). Dentre os principais poluentes atmosféricos, destacam-se: material particulado (MP), ozônio (O₃), óxidos de enxofre, óxidos de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), voláteis orgânicos e metais em concentrações fora dos limites recomendados (AKIMOTO, 2003).

A poluição atmosférica causada por atividades domésticas tem diminuído em todo o mundo desde o ano de 1990, no entanto, a poluição do ar impulsionada pela rápida expansão das cidades, pela globalização da produção industrial, pela proliferação do uso de pesticidas e produtos químicos tóxicos, e principalmente pelo uso crescente de veículos motorizados vem crescendo de forma alarmante e espantosa (SMITH & EZZATI, 2005). Apesar do aumento dos esforços para minimizar os efeitos nocivos da poluição do ar, proveniente de fontes antropogênicas, nossa sociedade ainda depende fortemente de combustíveis fósseis para geração de energia em várias aplicações, tais como transportes, indústrias, aquecimento, entre outras (LEUNG, 2015; WEI *et al.*, 2016).

Os poluentes atmosféricos liberados pelos veículos automotores têm como origem não apenas a queima do combustível fóssil, mas também o desgaste gerado pelo atrito dos pneus nas estradas e das pastilhas e discos de freios (ADAMIEC *et al.*, 2016; KHAN & FREY, 2017). Em diversos locais, os motores veiculares, que liberam uma mistura complexa de gases e material particulado, tornaram-se a principal fonte de poluentes do ar (LEWNÉ *et al.*, 2007; SCHRANK & LOMAX, 2007). Dados apontam que o tráfego de veículos automotores tem aumentado de forma significativa, principalmente nos últimos 20 anos, dados mais recentes mostram que em novembro de 2017 a frota veicular brasileira alcançou o número de 96.790,495 veículos, e em

2016 a frota veicular mundial alcançou o número de mais de 1,6 bilhão de veículos circulantes (GENTNER *et al.*, 2016, BRASIL, 2017). O aumento da frota automotiva está intimamente ligado com o aumento expressivo da classe profissional dos motoristas, o que ocorre principalmente devido ao aumento e a evolução dos serviços de transporte e entrega (NASEM, 2016).

Os motoristas profissionais, trabalhadores que estão continuamente expostos aos poluentes relacionados ao tráfego de veículos, sofrem exposições notavelmente superiores quando comparados àqueles profissionais não ocupacionalmente expostos (KNIBBS & MORAWSKA, 2012). Esses trabalhadores possuem uma longa jornada de trabalho diária, permanecendo em contato, por grandes períodos, a uma ampla gama de tóxicos atmosféricos. Devemos também considerar que esses trabalhadores não possuem um ponto e/ou local definido durante sua jornada de trabalho, diferente da grande maioria das outras profissões que permitem ao trabalhador exercer suas funções em locais climatizados e agradáveis (ALQUIMIM *et al.*, 2012). Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado efeitos adversos à saúde em motoristas profissionais, e a exposição aos poluentes veiculares tem sido sugerida como uma das possíveis causas de diminuição da qualidade de vida desses trabalhadores (KNIBBS & MORAWSKA, 2012; VAN DER BEEK, 2012; GHORANI-AZAM *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018). O incremento gradual da circulação veicular e da competitividade do setor de transportes aumentou o estresse aos quais os motoristas profissionais têm sido submetidos diariamente nas últimas décadas (KOH *et al.*, 2015). Além disso, a poluição advinda do trânsito acrescenta outras preocupações relacionadas a esta classe profissional, como por exemplo, o fato de que a atividade por eles desenvolvida é caracterizada como uma ocupação sedentária, representando um adicional risco à saúde dos mesmos (TAYLOR & DORN, 2006). Este cenário leva a pensarmos seriamente sobre a questão da exposição crônica destes trabalhadores aos poluentes ambientais, principalmente pelo fato de que a mesma tem sido amplamente relacionada com efeitos deletérios significativos em vários sistemas do organismo (GHORANI-AZAM *et al.*, 2016; COLE-HUNTER *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

Em regiões mais desenvolvidas das grandes cidades encontramos problemas com a fluidez do trânsito, o qual é congestionado principalmente nas horas de *rush* (IVANCO, 2017). Devido a este fato, a classe dos motociclistas profissionais tem aumentado visivelmente nos últimos anos, pois os mesmos fornecem serviços de deslocamento e entregas rápidas mesmo em áreas com intenso fluxo veicular (PLATT, 2014). Arphorn e colaboradores demonstraram que indivíduos que utilizam veículos “descobertos” (como por exemplo, as motocicletas e os carros conversíveis) são expostos a concentrações mais elevadas de material particulado (MP 10 μ m), do que àqueles que utilizam veículos “cobertos” (como por exemplo, carros, ônibus e caminhões). Foi verificado também que a função pulmonar dos indivíduos que exercem funções em veículos abertos demonstrou tendência em diminuir quando comparada a indivíduos exercendo suas funções em veículos fechados (ARPHORN ET al., 2018).

Em contrapartida, os motoristas de caminhões exercem suas funções laborais em veículos fechados, os quais, devido a essa característica, possuem concentrações de poluentes que tendem a diferir daquelas encontradas no exterior dos veículos, sendo normalmente mais baixas (BRUNEKREEF *et al.*, 2005). No entanto, já existem diversos estudos que discordam dessa teoria, afirmando que altas exposições a poluentes atmosféricos ocorrem tanto dentro quanto fora dos veículos automotores (DONS *et al.*, 2013; JOHANSSON *et al.*, 2017). Um estudo realizado pelo Conselho de Defesa dos Recursos Naturais (NRDC, 2007) mostrou que a concentração média de *black carbon* dentro das cabines de caminhões de frete eram até 10 vezes maiores do que a concentração encontrada fora do veículo. Outro ponto a ser destacado é o fato de que a maioria quantidade de caminhões utiliza como combustível o diesel, diferentemente de carros e motocicletas que usam em sua maior parte a gasolina (KACHURI *et al.*, 2016). O problema central deste fato é os motoristas de caminhão ficam não só expostos aos efeitos da poluição do ar gerada pelos veículos ao seu redor, mas também aos gases e particulados tóxicos gerados pela combustão do diesel do seu próprio veículo (NRDC, 2007).

A queima do diesel origina partículas que contêm compostos mutagênicos e carcinogênicos, os quais têm sido ligados ao aumento do risco de mortalidade por câncer de pulmão em mais de 35 diferentes estudos epidemiológicos (DELVA *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2017; KOWALSKA *et al.*, 2017; MÖHNER & WENDT, 2017; TAXELL & SANTONEN,

2017). As emissões provenientes da queima do diesel foram alocadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2014) no grupo 1, quando há evidências suficientes de que o composto é carcinogênico aos humanos.

Já as emissões provenientes da combustão da gasolina foram classificadas como possíveis causadoras de câncer em humanos, (grupo 2) pelo IARC, no ano de 1989 e novamente no ano de 2012, baseada em evidências insuficientes e inadequadas em humanos porém suficientes o bastante em experimentos animais (IARC, 2014). Em relação às emissões de MP 2,5 µm, aproximadamente 90% são de origem da combustão do diesel, produzindo de 2-10 vezes mais emissões de particulados do que a combustão da gasolina em veículos sem catalisadores e de 2-40 vezes mais em veículos já equipados com catalisadores (IARC, 2014). Contraditoriamente, há estudos que relatam que os sistemas modernos de transportes, como carros e motocicletas, seriam os principais causadores de uma maior exposição à poluição relacionada com o tráfego, fato esse que talvez seja explicado pela maior quantidade desse tipo de veículos quando comparados com veículos de maior porte, como ônibus e caminhões (KIM *et al.*, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A preocupação com a poluição atmosférica e as consequências da poluição ambiental sobre a saúde humana vem tomando grande importância nos últimos anos, quando passamos a ter um novo olhar sobre nossa relação com o ambiente. Tal mudança de pensamento demanda melhor conhecimento sobre os toxicantes presentes no ar para a adoção de múltiplas medidas de controle dos mesmos. Diante das evidências já expostas, fica claro o grande salto, em pequeno espaço de tempo, do aumento de veículos automotores, os quais eram personagens raros nas ruas e agora estão presentes no cotidiano de cidades de todos os portes. Juntamente com isso o aumento de motoristas profissionais é explícito em todos os locais habitados juntamente com os controversos estudos relativos à concentração de poluentes dentro e fora dos veículos automotores.

A partir dessas contestações este trabalho tem como objetivo estudar o impacto da exposição crônica de motoristas profissionais aos poluentes atmosféricos, gerando dados que possam ser usados futuramente no desenvolvimento de projetos de mitigação de danos à saúde dos mesmos e equipamentos de proteção mais eficazes para evitar ou minimizar a inalação de intoxicantes.

3 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o dano sobre a saúde de motoristas profissionais, de caminhões e de motocicletas, causado pela exposição crônica a poluentes atmosféricos em uma região urbana com elevado fluxo veicular.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as condições sócio-demográficas através de questionário específico;
- Verificar o histórico de saúde através da aplicação do questionário de Anamnese Ocupacional;
- Avaliar os sintomas respiratórios através da aplicação do *questionário British Medical Research Council*;
- Investigar o consumo de álcool através da aplicação do questionário *Alcohol Use Disorders Identification Test*;
- Realizar avaliação nutricional através da avaliação antropométrica e do consumo alimentar);
- Realizar avaliação cardiopulmonar através da aferição da pressão arterial e da frequência cardíaca e da realização de prova ventilatória (espirometria);
- Realizar o monitoramento dos poluentes atmosféricos através de amostragem passiva (NO₂ e O₃) e de amostragem ativa (MP 2,5 µm);
- Realizar o monitoramento das condições meteorológicas;
- Avaliar os seguintes parâmetros bioquímicos em plasma: cotinina, glicose, perfil lipídico, biomarcadores de estresse oxidativo, resposta pró-inflamatória e toxicidade pulmonar;

- Realizar biomonitoramento humano através da determinação de metais pesados e metalóides em unhas e do efeito genotóxico através do ensaio do micronúcleo em células de mucosa bucal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo prospectivo, analítico, controlado do tipo transversal.

4.2 Caracterização da amostra e amostragem

Para a realização deste estudo serão selecionados motoristas profissionais de motocicletas e caminhões, classificados como adultos jovens, de 18 – 35 anos, registrados e recrutados no sindicato profissional de cada categoria específica (Sindicato dos Motociclistas Profissionais do Rio Grande do Sul – SINDIMOTO – e Sindicato dos Caminhoneiros Transportadores Autônomos de Cargas em Geral de Porto Alegre e Região Metropolitana - SINDITACPOAPOA). Os critérios de inclusão serão: ser do sexo masculino, estar desempenhando a atividade profissional por pelo menos 6 meses, possuir jornada de trabalho mínima de 6h/dia e possuir zoneamento da atividade profissional em Porto Alegre e Região Metropolitana, a qual é considerada uma zona de elevada concentração de poluentes atmosféricos (FLECK, *et al.*, 2014). O uso de suplementos antioxidantes e/ou complexos vitamínicos, bem como a presença de qualquer tipo de doença crônica será considerado critério de exclusão para a alocação do sujeito na pesquisa.

O processo de amostragem será contínuo, seguindo lista de numeração dos profissionais cedida pela direção do SINDIMOTO e SINDITACPOA. A negativa em participar da pesquisa ou perdas de participantes automaticamente nos remeterão ao próximo membro da lista.

O grupo controle será formado por pessoas que desempenham atividade em área administrativa, recrutados na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA - Porto Alegre– RS), em ambiente fechado, seguindo os mesmos critérios de inclusão dos grupos formados pelos motoristas profissionais. A amostragem do grupo controle também será realizada de forma contínua, seguindo lista de numeração dos profissionais cedida pela direção da empresa administrativa, igualmente localizada em região de elevada densidade populacional e com reconhecida poluição ambiental. O ambiente de trabalho deverá ser desprovido de fontes emissoras de poluição. A negativa em participar da pesquisa ou perdas de participantes automaticamente nos remeterão ao próximo membro da lista.

Todos os voluntários serão abordados e convidados verbalmente para participar da pesquisa. Os sujeitos que forem incluídos na pesquisa responderão a um questionário sócio-demográfico padronizado (ANEXO I). O tamanho amostral e o questionário a ser aplicado foram definidos com base em estudos semelhantes realizados com trabalhadores de postos de combustíveis (frentistas) e outros indivíduos expostos a poluentes semelhantes ao que o grupo de interesse do presente projeto se refere (COZZA, 2013; MORO, *et al.*, 2015; CARVALHO, *et al.*, 2017).

4.3 Anamnese ocupacional

Será realizada por profissional habilitado (CRBM-5 1195) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA), utilizando o protocolo de anamnese ocupacional desenvolvido e validado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) a fim de conhecer, sistematizar, agilizar, homogeneizar e intercambiar dados e informações úteis dos participantes do estudo (ANEXO II).

4.4 Avaliação de sintomas respiratórios

Sintomas respiratórios, fatores de exposição ocupacional a poluentes inaláveis e fumo serão avaliados com uso do *British Medical Research Council questionnaire* (MRCQ) (ANEXO III), validado para o português (Questionário sobre sinais e sintomas respiratórios) (RAMOS, 1983). O mesmo será aplicado por profissional habilitado (CRBM-5 1195) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA)

4.5 Investigação sobre o consumo de álcool

Será utilizado o questionário AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*) (ANEXO IV) o qual avalia diversos níveis de uso de álcool, desde o uso sem risco até a provável dependência, validado em português por Lima e colaboradores (Teste de Identificação de Desordens Devido ao Uso de Álcool) (2005). O mesmo será aplicado por profissional habilitado (CRBM-5 1195) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA).

4.6 Avaliação Nutricional

4.6.1 Consumo alimentar

Será utilizado o protocolo do recordatório alimentar de 24h (BURKE, 1947) e a aplicação do Índice de Alimentação Saudável adaptado para a população brasileira do *Healthy Eating Index* (PREVIATO *et al.*, 2014). Ambas as metodologias serão realizadas por profissional habilitado (CRN-2 12349) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA).

4.6.2 Avaliação antropométrica

Será realizada por profissional habilitado (CRN-2 12349) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA). Na avaliação antropométrica será realizada a determinação de:

- peso (kg) e altura (cm) com auxílio de balança digital e estadiômetro, respectivamente. Para a tomada dessas medidas o participante da pesquisa deverá estar descalço, com o mínimo de acessórios possíveis e roupas preferencialmente leves;

- Índice de Massa Corporal (IMC), o qual corresponderá a razão entre o peso e a altura ao quadrado, sendo seu resultado expresso em kg/m² e classificados segundo a Organização Mundial da Saúde (1995);

- circunferência da cintura, braço, quadril, coxa e panturrilha, as quais serão realizadas com uso de fita antropométrica. Serão realizadas duas medidas e utilizada a média da mensuração destas duas. O medidor irá se posicionar lateralmente ao indivíduo para as aferições, sendo a circunferência da cintura classificada de acordo com Organização Mundial da Saúde (1998) (Norgan, 1988);

- dobras cutâneas tricipital, subescapular, peitoral, axilar média, abdominal, supra-íliaca e da coxa utilizando um adipômetro seguindo a metodologia de Harrison e colaboradores (1988). A aferição das pregas será realizada três vezes e utilizada a média da mensuração destas três medidas. Os valores de dobras cutâneas serão utilizados para estimar a % de gordura corporal através da equação de Jackson e Pollock (1985).

4.7 Avaliação cardiopulmonar

4.7.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

A aferição da pressão arterial bem como da frequência cardíaca será realizada com o indivíduo na posição sentada, evitando cruzar as pernas, após 5 a 10 minutos de repouso. O ambiente escolhido será tranquilo e com temperatura agradável. O voluntário será orientado a estar com a bexiga vazia, não ter praticado exercícios físicos e/ou ingerido bebidas alcoólicas e/ou café até 30 minutos antes da aferição. A mesma será realizada com uso de medidor de pressão arterial automático de pulso - HEM 631 INT - da marca Omron®. Ambas as mensurações serão realizadas por profissional habilitado (CRBM-5 1195) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA).

4.7.2 Prova ventilatória

A função pulmonar será avaliada através da espirometria, um exame que permite medir o volume de ar inspirado e expirado e os fluxos respiratórios dos indivíduos, usando um espirômetro de mesa Spirovit SP-1 da marca Schiller®. Os cuidados para a realização do exame serão os mesmos tomados para a aferição da pressão arterial e da frequência cardíaca. A espirometria será realizada por profissional habilitado (CRBio-03 28715-0) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA),

4.8 Monitoramento dos poluentes atmosféricos

Os filtros serão colocados e posteriormente retirados dos indivíduos no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA), sendo após analisados no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSPA).

4.8.1 Amostragem passiva de NO₂

A amostragem do NO₂ será realizada por monitoramento passivo utilizando o princípio da difusão do NO₂ atmosférico em filtros de celulose (37mm, Energética, Rio de Janeiro, Brasil) os quais serão impregnados com uma solução absorvente de trietanolamina (2mL) e secos na temperatura de 37°C por 24 horas. Os filtros serão então inseridos em tubos de difusão abertos e posicionados no guarda-volume da moto, na cabine do caminhão ou na mesa do funcionário administrativo, permanecendo no local pelo período de 7 dias. O filtro branco será exposto nas mesmas condições, mas selado de contato atmosférico. Os íons nitrito são produzidos quando o NO₂ atmosférico reage com a trietanolamina. Esses íons são extraídos com metanol e reagem com a sulfanilamida e ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico (LODGE, 1988). As soluções serão analisadas com uso de espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil).

4.8.2 Amostragem passiva de O₃

A amostragem do O₃ será realizada por monitoramento passivo utilizando filtros de celulose (37 mm, Energética, Rio de Janeiro, Brasil), os quais serão impregnados com solução de dissulfato de indigotina (400 µL) inseridos em tubos de difusão abertos e posicionados no guarda-volume da moto, na cabine do caminhão ou na mesa do funcionário administrativo, permanecendo no local pelo período de 8hs. O filtro branco será exposto nas mesmas condições, mas selado de contato atmosférico. Após a exposição, os filtros serão removidos, colocados em tubos de vidro com água destilada (5 mL) e sonicados por 5 min. Os tubos serão então centrifugados por 10 min a 3800 rpm. O sobrenadante será analisado com uso de espectrofotômetro no comprimento de onda de 610 nm (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil) (MICIETA & MURÍN, 1996).

4.8.3 Monitoramento de MP_{2,5}

O monitoramento de MP_{2,5} será realizado com o uso do aparelho AirChek XR5000 (com faixa de vazão de 5 a 5000 mL/min-1 e controle digital de fluxo), o qual será disponibilizado aos sujeitos de pesquisa e afixados nos mesmos para o monitoramento individual de material particulado pelo período de 24 horas.

4.9 Monitoramento das condições meteorológicas

Durante o monitoramento passivo e ativo dos poluentes atmosféricos será também realizado o monitoramento das condições meteorológicas, através dos dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), através do site: www.inmet.gov.br.

4.10 Análises bioquímicas

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado (CRBM-5 1195) no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA). O indivíduo será solicitado a responder previamente sobre o uso prévio de substâncias como fármacos e drogas de abuso, bem como o uso recente de álcool. **O jejum....**

O paciente será orientado a sentar-se confortavelmente em uma cadeira própria para coleta de sangue. A punção sanguínea ocorrerá em veia do membro superior, o qual será previamente higienizado (álcool etílico 70%) com movimentos circulares do centro para fora. Em seguida, o braço do indivíduo será inclinado para baixo, a partir da altura do ombro e então ocorrerá o posicionamento do torniquete (nesse momento será solicitado que o sujeito feche a mão para evidenciar a veia). Será realizada a punção venosa com a agulha em uma angulação de 30 graus, estando o bisel voltado para cima. Logo após que o sangue comece a fluir o braço do indivíduo será desgarroteado, e o sangue aspirado devagar até atingir o volume necessário. A agulha será então retirada da veia do paciente, e o profissional pedirá que o mesmo exerça pressão no local da punção, em geral, de 1 a 2 minutos, evitando, assim, a formação de hematomas e sangramentos. O indivíduo será orientado a não dobrar o braço, não carregar peso ou bolsa a

tiracolo no mesmo lado da punção por, no mínimo, 1 hora, e não manter a manga dobrada, pois pode funcionar como torniquete. A amostra será colocada em tubo devidamente identificado, contendo anticoagulante, sendo invertida suavemente de 5-10 vezes e armazenada em biofreezer (-22°C) (CLSI, 2003).

4.10.1 Cotinina

A determinação de cotinina será realizada no plasma através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSA). O procedimento analítico envolve extração líquido-líquido, separação em coluna de fase reversa sob fluxo isocrático e detecção por ultravioleta (WATTS *et al.*, 1990).

4.10.2 Glicose

A determinação de glicose será realizada em plasma com uso do kit Glicose Monoreagente – K082 (Bioclin®) no Laboratório de Análises Clínicas (UFCSA).

4.10.3 Perfil lipídico

A determinação do perfil lipídico será realizada em plasma com uso dos kits: colesterol monoreagente K083 (Bioclin®), HDL direto – K071 (Bioclin®), LDL direto – K088 (Bioclin®) e triglicerídeos monoreagente (Bioclin®), no Laboratório de Análises Clínicas (UFCSA).

4.10.4 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT será determinada em plasma de acordo com Aebi (1984), no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSA). Resumidamente, será verificada a decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT a 25°C durante 120 segundos será determinada a 240 nm em espectrofotômetro (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil).

4.10.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A análise da SOD será realizada em plasma de acordo com a técnica de auto-oxidação do pirogalol, o qual é um substrato da SOD (MARKLUND, *et al.*, 1974), no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSA). Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da reação. As absorbâncias das amostras serão determinadas em espectrofotômetro (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil) a 420 nm em 60 e 120 s.

4.10.6 Atividade da Glutathione Peroxidase

A atividade da GPx será avaliada em plasma utilizando-se o kit “Glutathione Peroxidase, Cellular Colorimetric Assay” da marca BioAssay®, no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSA).

4.10.7 Determinação do composto malondialdeído (MDA)

A quantificação ocorrerá no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSA), através de uma técnica que se baseia no princípio de que o MDA forma complexos ácidos de coloração rósea com o ácido tiobarbitúrico que absorvem fortemente a 535 nm (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1976). Será realizada a precipitação de proteínas promovida pela adição de solução de ácido tricloroacético em plasma. Serão agitados no vórtex e centrifugados em centrífuga refrigerada a 3.000g por 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante será adicionado ácido tiobarbitúrico 0,670% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e a solução será agitada no vórtex por 10s e aquecida a 100°C em banho-maria por 15 minutos, para extrair o malondialdeído (MDA) acrescenta-se 750 µl de n-butanol. Após a agitação no vórtex por 10s e centrifugação a 3.000g por 5 minutos a 4°C será feita a leitura em espectrofotômetro (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil).

4.10.8 Determinação da capacidade antioxidante total

A determinação da capacidade antioxidante total será realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSA), através da capacidade de redução de íons férricos em ferrosos pela adição do plasma em estudo que possui atividade redutora, o que resulta em uma intensa

coloração azul que pode ser mensurada pela leitura por espectrofotometria a 593 nm (Perkin-Elmer Lambda 35, São Paulo, SP, Brasil) (BENZIE & STRAIN, 1999).

3.10.9 Atividade inflamatória

A concentração de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 serão realizadas no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSPA), com uso de plasma, através do método de ELISA. Os marcadores serão avaliados pela Técnica Multiplex com o uso dos kits MilliplexTM MAP rat cytokine kits (RCYT0'80k) (Millipore, Billerica, MA, USA). As análises serão realizadas conforme as recomendações do fabricante.

4.10.10 Toxicidade pulmonar

A determinação da proteína de células de claras 16 kDa (CC16) sérica será realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica (UFCSPA), através da utilização do kit de ELISA “*Human Clara Cell Protein*” da marca BioVendor®.

4.11 Biomonitoramento humano

4.11.1 Elementos traço

As amostras de unhas serão coletadas por profissional habilitado (CRBM-5 1195), no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA), sendo essas provenientes da mão do indivíduo. Será realizado um corte da borda livre da unha com auxílio de um cortador de unha descartável, posteriormente a amostra será armazenada em invólucro de plástico, livre de metais, devidamente identificado. A caracterização de elementos acumulados em unha segue o protocolo descrito por Carneiro (2011). Após algumas lavagens (acetona/água/acetona), as amostras serão secas e logo então digeridas. Será colocada a quantidade de 10-20 g da amostra em tubos cônicos, nos quais será adicionado 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH 25%), logo após os tubos ficarão em temperatura ambiente por 12 h. Então, será adicionado 10 mL de ácido nítrico (HNO₃ 1%) seguido diretamente da análise por ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) no Laboratório de ????????????? da Universidade Federal do Rio Grande.

4.11.2 Genotoxicidade

O ensaio do micronúcleo seguirá o protocolo de Holland e colaboradores (2008). As células provenientes da mucosa bucal serão obtidas por profissional habilitado (CRBM-5 1195), no local de trabalho de cada grupo específico (SINDIMOTO, SINDITACPOA ou UFCSPA), com uma leve escovação do interior da mucosa bucal com uma mini-escova citológica (*cytobrush*). Previamente a coleta será solicitado que o voluntário realize um enxague bucal intenso da boca com água. Após coletadas, as células serão armazenadas em um microtubo contendo 3 mL de fixador Carnoy (metanol e ácido acético glacial na proporção de 3:1). Após duas lavagens, aproximadamente 100 μ L da suspensão de células serão gotejadas em uma lâmina que secará a temperatura ambiente. As células fixadas serão hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) e coradas segundo o método de Feulgen. Para cada indivíduo, a presença de MN será avaliada microscopicamente através da análise de 1000 células.

4.11 Estatística

Por não dispormos de dados de literatura capazes de fundamentar com segurança um cálculo amostral, optamos por delinear um estudo piloto composto por 100 casos e 50 controles, a partir de dados de estudos realizados com frentistas de postos de gasolina e outros indivíduos expostos a toxicantes atmosféricos (COZZA, 2013; MORO, *et al.*, 2015). Após essa análise preliminar restabeleceremos tamanho amostral necessário para configuração de poder das diferenças detectadas.

Será realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Após, para a descrição das características dos grupos, quando as variáveis forem quantitativas, serão utilizados os testes: ANOVA de 1 via (média e desvio padrão), no caso de distribuições paramétrica, ou Kruskal-Wallis (mediana e intervalo interquartil [25-75]), no caso de distribuições não paramétricas. Para

variáveis categóricas será utilizado o teste do Qui-quadrado. O nível de significância adotado será de 95% ($p < 0.05$) e o software utilizado para as análises será o IBM SPSS Statistics.

4.12 Ética

O estudo será submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa da UFCSPA, a fim que seja autorizado seu desenvolvimento.

Todos os participantes firmarão Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), motoristas profissionais (ANEXO V) e funcionários administrativos, (ANEXO VI) autorizando sua inclusão na pesquisa.

Em etapa prévia a seleção dos indivíduos, obteremos autorização formal por parte da chefia administrativa do grupo controle, a qual firmará Termo de Anuência (ANEXO VII). Da mesma forma, os Laboratórios e Sindicatos envolvidos na execução do projeto também firmarão Termo de Anuência (ANEXOS VII à XII).

4 CRONOGRAMA

MESES ATIVIDADES	03/18	04/18	05/18	06/18	07/18	08/18	09/18	10/18	11/18	12/18
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Submissão ao CEP	x	x	x	x	x	x				
Seleção amostral e aplicação de questionários							x	x	x	x
Realização de anamnese ocupacional							x	x	x	x
Realização de avaliação nutricional							x	x	x	x
Aferição de pressão arterial e frequência cardíaca							x	x	x	x
Espirometria							x	x	x	x
Colheita de materiais biológicos							x	x	x	x
Monitoramento de poluentes atmosféricos							x	x	x	x
Monitoramento das condições meteorológicas							x	x	x	x
Análise dos poluentes atmosféricos							x	x	x	x
Avaliação de genotoxicidade							x	x	x	x

MESES ATIVIDADES	01/19	02/19	03/19	04/19	05/19	06/19	07/19	08/19	09/19	10/19	11/19	12/19
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Seleção amostral e aplicação de questionários	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Realização de anamnese ocupacional	x	x	x	x	x	x	x	x				
Realização de avaliação nutricional	x	x	x	x	x	x	x	x				
Aferição de pressão arterial e	x	x	x	x	x	x	x	x				

frequência cardíaca												
Espirometria	x	x	x	x	x	x	x	x				
Colheita de materiais biológicos	x	x	x	x	x	x	x	x				
Monitoramento de poluentes atmosféricos	x	x	x	x	x	x	x	x				
Monitoramento das condições meteorológicas	x	x	x	x	x	x	x	x				
Análise dos poluentes atmosféricos	x	x	x	x	x	x	x	x				
Análise do perfil tabágico								x	x			
Análises bioquímicas									x			
Avaliação de genotoxicidade	x	x	x	x	x	x	x	x				
Quantificação de marcadores de estresse oxidativo										x	x	x

MESES ATIVIDADES	01/20	02/20	03/20	04/20	05/20	06/20	07/20	08/20	09/20	10/20	11/20	12/20
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Quantificação de marcadores de estresse oxidativo	x	x	x	x								
Análise de atividade inflamatória			x	x								
Análise de toxicidade pulmonar				x	x							
Quantificação de elementos traço						x	x	x	x	x	x	x

MESES ATIVIDADES	01/20	02/20	03/20	04/20	05/20	06/20	07/20	08/20	09/20	10/20	11/20	12/20
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Compilação dos dados e análise estatística	x	x										
Elaboração da tese			x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Apresentação da tese												x

5 ORÇAMENTO

Material	Quantidade	Custo
Kit de Material para Avaliação Antropométrica *	1 Balança digital 1 Estadiômetro 1 Fita antropométrica 1 Adipômetro	R\$ 911,40

Aparelho de Pressão Digital Automático de Braço Omron® - HEM 631 INT *	1 unidade	R\$ 89,90
Espirômetro de mesa Schiller® - Spirovit SP-1 *	1 unidade	R\$ 8.373,00
Bocal descartável p/ Espirômetro de mesa Schiller® Spirovit SP-1 *	2 pacotes (100 unidades/pct)	R\$ 110,00
Amostragem passiva de NO₂		
Trietanolamina SYNTH®	1000 ml	R\$ 64,55
Guaiacol Alphatec®	100 ml	R\$ 82,25
Metabissulfito de sódio SYNTH®	500 g	R\$ 20,26
Peróxido de hidrogênio 30% SYNTH®	1000 ml	R\$ 20,64
Sulfanilamida Avantor®	100 g	R\$ 600,00
8-anilina-1-naftaleno ácido sulfônico Dinâmica® (ANSA)	25 g	R\$ 347,00
Nitrito de Sódio Quimisul®	1000 g	R\$ 34,00
Álcool metílico Nacional®	10.000 ml	R\$ 320,00
Filtros de celulose 37mm Whatmann®	200 unidades	R\$ 200,00
Amostragem passiva de O₃		
Indigo carmin Alphatec®	25 g	R\$ 60,00
Etilenoglicol SYNTH®	5.000 ml	R\$ 130,00
Acetona PhLab®	1.000ml	R\$ 30,00
Filtros de celulose 37mm Whatmann®	200 unidades	R\$ 200,00
Tubos para coleta de sangue 6ml / Tam: 13x100mm / Tampa Roxa BD Vacutainer®	200 unidades	R\$ 160,00
Seringa descartável 5ml - Descarpac - Bico Luer Slip	2 Caixas (200 unidades)	R\$ 60,00
Cotinina (HPLC) *	Coluna, membrana e reagentes (200 análises)	R\$ 3.142,00
Glicose monoreagente K082 - Bioclin® *	2 Kits – 248 análises*	R\$ 156,00
Colesterol monoreagente K083 - Bioclin® *	2 Kits - 248 análises*	R\$ 200,00
HDL direto – K071 - Bioclin®	2 Kits - 248 análises*	R\$ 520,00
LDL direto – K088 -Bioclin®	2 Kits - 248 análises*	R\$ 640,00
Triglicerídeos monoreagente Bioclin®	2 Kits - 248 análises*	R\$ 272,00
Cloreto de Sódio SYNTH®	100 ml	R\$ 13,82
Ácido Ortofosfórico Avantor®	1.000 ml	R\$ 213,18
Commassie Brilliant Blue G250 BioRad®	10 g	R\$ 145, 00
Albumina Bovina Sérica MpBio®	10 g	R\$ 330 00
Butanol Vetec®	1.000 ml	R\$ 39,00
Tris (hidroximetil) aminometano SYNTH®	100 g	R\$ 50,00
Atividade da Catalase		
Fosfato de potássio monobásico Avantor®	1.000 g	R\$ 270,00
Fosfato de sódio dibásico Avantor®	1.000 g	R\$ 270,00
Peróxido de hidrogênio 30% SYNTH®	1000 ml	R\$ 20,64
SOD S2515 Sigma®	1 Unidade	R\$ 370,00
Atividade da Superóxido Dismutase		

Pirogalol Sigma®	25 g	R\$ 235,00
Catalase®	100 mg	R\$ 436,00
Kit Glutathiona - BioAssay®	2 Kits – 200 análises	R\$ 5.090,00
Malondialdeído		
Ácido tricloroacético Dinâmica®	1.000 ml	R\$ 80,00
Ácido tiobarbitúrico Merck®	25 g	R\$ 591,00
1,1,3,3-tetrametoxipropano Sigma®	500 ml	R\$ 700,00
Capacidade antioxidante total		
Acetato de sódio trihidratado SYNTH® *	1.000 g	R\$ 22,70
Ácido acético Avantor® *	1.000 ml	R\$ 83,00
2-4-6-tripiridil-s-triazina Sigma® *	1 g	R\$ 486,00
Ácido clorídrico Quemis® *	1.000 ml	R\$ 22,00
Cloreto férrico hexahidratado Merck® *	250 g	R\$ 40,00
Ácido ascórbico Alphatec® *	250 g	R\$ 18,00
Ácido úrico *		
Solução calibradora de bilirrubina Bioclin® *	0,30 mg	R\$ 224,00
Trolox *	500 mg	R\$ 90,00
Kit ELISA IL-6 Milliplex™ MAP rat cytokine kits *	2 Kits - 290 análises	R\$ 6.958,00
Kit ELISA TNF- α Milliplex™ MAP rat cytokine kits *	2 Kits – 192 análises	R\$ 5.000,00
Kit ELISA “Human Clara Cell Protein” (BioVendor® Laboratory Medicine, Inc., Brno, Czech Republic) *	2 Kits – 192 análises	R\$ 5.000,00
Micronúcleo		
Fucsina básica		
Metabissulfito de sódio SYNTH®	500 g	R\$ 20,26
Fast Green		
Endobrush escova citológica estéril	2 pacotes (100 unidades/pct)	R\$ 100,00
Álcool etílico Nacional®	10.000 ml	R\$ 320,00
Ácido acético Avantor®	1.000 ml	R\$ 83,00
Ácido clorídrico Nacional®	1.000 ml	R\$ 90,00
Bens permanentes		
Espectrofotômetro Perkin-Elmer® Lambda 35	1 unidade	
Sonicador Ultra Cleaner Unique®	1 unidade	
Centrífuga Excelsa® 4 Mod 280R	1 unidade	
Aparelho Bioquímica		
Aparelho FURG		
Estufa Fanem®	1 unidade	
Microscópio Olympus® BX51	1 unidade	
AirChek XR5000	1 unidade	R\$ 5.500,00
VALOR TOTAL DO ORÇAMENTO		
VALOR TOTAL DE MATERIAIS A SEREM ADQUIRIDOS		

* os kits que não estão disponíveis no Laboratório de Poluição Atmosférica – UFCSPA serão adquiridos com recurso do próprio pesquisador.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* v. 105, p. 121-126, 1984.

ADAMIEC, E.; JAROSZ-KRZEMIŃSKA, E.; WIESZAŁA, R. Heavy metals from non-exhaust vehicle emissions in urban and motorway road dusts. *Environ Monit Assess.* v. 188, p. 369-370, 2016.

AKIMOTO, H. Global air quality and pollution. *Science.* v. 302, n. 5651, p. 1716-1719, 2003.

ALQUIMIM, A. F.; Barral, A. B.; Gomes, K. C.; Rezende, M. C. Evaluation of labor-related and physical risk factors for cardiovascular disease in drivers of urban transport buses in Montes Claros in the state of Minas Gerais. *Cien Saude Colet.* v. 17, n. 8, p. 2151-8, Ago 2012.

ARPHORN, S.; ISHIMARU, T.; HARA, K.; MAHASANDANA, S. Considering the effects of ambient particulate matter on the lung function of motorcycle taxi drivers in Bangkok, Thailand. *J Air Waste Manag Assoc.* v. 68, n. 2, p. 139-145, 2018.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* v. 299, p. 15-27, 1999.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 03, de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=100>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Anamnese Ocupacional - Manual de Preenchimento da Ficha Resumo de Atendimento Ambulatorial em Saúde do Trabalhador (Firaast). Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anamnese_ocupacional_ficha_atendimento_trabalhador.pdf>.

BRASIL. Ministério das Cidades. Departamento Nacional de Trânsito - DETRAN. Frota de Veículos, 2017. Disponível em: <<http://www.denatran.gov.br/index.php/estatistica/237-frota-veiculos>>.

BRUNEKREEF, B.; JANSSEN, N. A.; DE HARTOG, J. J.; OLDENWENING, M.; MELIEFSTE, K.; HOEK, G.; LANKI, T.; TIMONEN, K. L.; VALLIUS, M.; PEKKANEN, J.; VAN GRIEKEN, R. Personal, indoor, and outdoor exposures to PM_{2.5} and its components for groups of cardiovascular patients in Amsterdam and Helsinki. *Res Rep Health Eff Inst.* p. 70-79, 2005.

BURKE, B. S. The dietary history as a tool in research. *J Am Diet Assoc.* v. 23, p. 1041-1046, 1947.

CAO, X.; MACNAUGHTON, P.; LAURENT, J. C.; ALLEN, J. G. Radon-induced lung cancer deaths may be overestimated due to failure to account for confounding by exposure to diesel engine exhaust in BEIR VI miner studies. *PLoS One.* v. 12, n. 9, 2017.

CARNEIRO, M. F. H.; GROTO, D.; BATISTA, B. L.; RHODEN, C. R.; BARBOSA, F. Background values for essential and toxic elements in children's nails and correlation with hair levels. *Biological Trace Element Research.* v. 144, n. 1-3, p. 339-350, 2011.

CARVALHO, R. B. Avaliação da Exposição de Motociclistas Profissionais aos Poluentes Atmosféricos Urbanos. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre.

CHOI, Y. H.; PARK, S. J.; PAIK, H. J.; KIM, M. K.; WEE, W. R.; KIM, D. H. Unexpected potential protective associations between outdoor air pollution and cataracts. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 2018.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. NCCLS H3-A5. 5 ed. 2003.

COLE-HUNTER, T.; DE NAZELLE, A.; DONAIRE-GONZALEZ, D.; KUBESCH, N.; CARRASCO-TURIGAS, G.; MATT, F.; FORASTER, M.; MARTÍNEZ, T.; AMBROS, A.; CIRACH, M.; MARTINEZ, D.; BELMONTE, J.; NIEUWENHUIJSEN, M. Estimated effects of air pollution and space-time-activity on cardiopulmonary outcomes in healthy adults: A repeated measures study. *Environ Int.* v. 111, p. 247-259, 2018.

COZZA, I. C. Estimativa da carga de exposição diária a material particulado em indivíduos expostos a poluição ambiental de origem veicular. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2013.

DELVA, F.; ANDUJAR, P.; LACOURT, A.; BROCHARD, P.; PAIRON, J. C. Occupational risk factors for lung cancer. *Rev Mal Respir.* v. 33, n. 6, p. 444-459, 2016.

DONS, E.; TEMMERMAN, P.; VAN POPPEL, M.; BELLEMANS, T.; WETS, G.; INT PANIS, L. Street characteristics and traffic factors determining road users' exposure to black carbon. *Sci Total Environ.* v. 447, p. :72-79, 2013.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* v. 186, p. 407-421, 1976.

FLECK, A. DA S.; VIEIRA, M.; AMANTÉA, S. L.; RHODEN, C. R. A comparison of the human buccal cell assay and the pollen abortion assay in assessing genotoxicity in an urban-rural gradient. *Int J Environ Res Public Health.* v. 11, n. 9, p. 8825-8838, 2014.

GENTNER, D. R.; JATHAR, S. H.; GORDON, T. D.; BAHREINI, R.; DAY, D. A.; HADDAD, I. E.; HAYES, P. L.; PIEBER, S. M.; PLATT, S. M.; DE GOUW, J.; GOLDSTEIN, A. H.; HARLEY, R. A.; JIMENEZ, J. L.; PRÉVÔT, A. S. H.; ROBINSON, A. L. Review of Urban Secondary Organic Aerosol Formation from Gasoline and Diesel Motor Vehicle Emissions. *Environ Sc. Technol.* v. 51, n. 3, p. 1074-1093, 2017.

GLOBAL BURDEN DISEASE (GBD) - MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* v. 388, p. 1459–1544, 2016.

GHORANI-AZAM, A.; RIAHI-ZANJANI, B.; BALALI-MOOD, M. Effects of air pollution on human health and practical measures for prevention in Iran. *J Res Med Sci.* p. 21-65, 2016.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurodevelopmental toxicity: still more questions than answers--authors' response. *Lancet Neuro.* v. 13, n. 7, p. 648-649, 2014.

HARRISON, G. G.; BUSKIRK, E. R.; CARTER, L. J. E.; JOHSTON, F. E.; LOHMAN, T. G.; POLLOCK, M. L. Skinfold thicknesses and measurement technique. In: Lohman, T. G.; Roche,

A. F.; Martorell, R. editors. Anthropometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics Books, 55-70. 1991

HASSANVAND, M. S.; NADDAFI, K.; MALEK, M.; VALOJERDI, A. E.; MIRZADEH, M.; SAMAVAT, T.; HEZAVEH, A. M.; HODJATZADEH, A. KHAMSEH, M. E. Effect of long-term exposure to ambient particulate matter on prevalence of type 2 diabetes and hypertension in Iranian adults: an ecologic study. *Environ Sci Pollut Res Int.* v. 25, n. 2, p. 1713-1718, 2018.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* v. 659, p. 93-108, 2008.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v. 105, Lyon, France, 2014.

IVANCO, A. Fleet analysis of headway distance for autonomous driving. *J Safety Res.* v. 63, p. 145-148, 2017.

JACKSON, A. S.; POLLOCK, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr.* v. 40, p. 497-504, 1978.

JOHANSSON, C.; LÖVENHEIM, B.; SCHANTZ, P.; WAHLGREN, L.; ALMSTRÖM, P.; MARKSTEDT, A.; STRÖMGREN, M.; FORSBERG, B.; SOMMAR, J. N. Impacts on air pollution and health by changing commuting from car to bicycle. *Sci Total Environ.* v. 584-585, p. 55-63, 2017.

KACHURI, L.; VILLENEUVE, P. J.; KENNETH, M. P.; JOHNSON, C. Workplace exposure to diesel and gasoline engine exhausts and the risk of colorectal cancer in Canadian men. *Environ Health.* v. 14 p. 15-24, 2016.

KIM, K.; KUMAR, P.; SZULEJKO, J.; ADELODUN, A.; JUNAID, M.; UCHIMIYA, M.; CHAMBERS, S. Toward a better understanding of the impact of mass transit air pollutants on human health. *Chemosphere.* v.174, p. 268-279, 2017.

KOH, D.; KONG, H.; OH, C.; JUNG, K.; PARK, D.; WON, Y. Lung cancer risk in professional drivers in Korea: A population-based proportionate cancer incidence ratio study. *J Occup Health.* v. 57, p. 324-330, 2015.

KOWALSKA, M.; WEGIEREK-CIUK, A.; BRZOSKA, K.; WOJEWODZKA, M.; MECZYNSKA-WIELGOSZ, S.; GROMADZKA-OSTROWSKA, J.; MRUK, R.; ØVREVIK, J.; KRUSZEWSKI, M.; LANKOFF, A. Genotoxic potential of diesel exhaust particles from the combustion of first- and second-generation biodiesel fuels-the FuelHealth project. *Environ Sci Pollut Res Int.* v. 24, n. 31, p. 24223-24234, 2017.

KHAN, T. H.; FREY, C. Comparison of real-world and certification emission rates for light duty gasoline vehicles. *Sci Total Environ.* p. 622-623:790-800, 2017.

KNIBBS, L. D.; MORAWSKA, L. Traffic-related fine and ultrafine particle exposures of professional drivers and illness: An opportunity to better link exposure science and epidemiology to address an occupational hazard? *Environ Int.* v. 15, n. 49, p. 110-114, 2012.

LANDRIGAN, P. J. Air pollution and health. *Lancet Public Health.* v. 2, n. 1, p. e4-e5, 2017.

LEUNG, D. Y. C. Outdoor-indoor air pollution in urban environment: challenges and opportunity. *Front Environ Sci.* Jan 2015.

LEWNÉ, M.; PLATO, N.; GUSTAVSSON, P. Exposure to particles, elemental carbon and nitrogen dioxide in workers exposed to motor exhaust. *Ann Occup Hyg.* v. 51, n. 8, p. 693-701, 2007.

LODGE, J.P.A. *Methods of Air Sampling and Analysis*; Lewis Publisher Inc.: Chelsea, MI, USA, 1988.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* v. 47, p. 469-474, 1974.

MICIETA, K.; MURÍN, G. Microspore analysis for genotoxicity of a polluted environment. *Environ Exp Bot.* v. 36, n. 1, p. 21-27, 1996.

MÖHNER, M.; WENDT, A. A critical review of the relationship between occupational exposure to diesel emissions and lung cancer risk. *Crit Rev Toxicol.* v. 47, n. 3, p. 185-224, 2017.

MORO, A. M; BRUCKER, N, CHARÃO, M. F; SAUER, E; FREITAS, F; DURGANTE, J; BUBOLS, G; CAMPANHARO, S; LINDEN, R; SOUZA, A. P; BONORINO, C; MORESCO, R; PILGER, D; GIODA, A; FARSKY, S; DUSCHL. A; GARCIA, S. C. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. *Environ Res.* v. 137, n. 1, p. 349-356, 2015.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE (NASEM). *Commercial Motor Vehicle Driver Fatigue, Long-Term Health, and Highway Safety*, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK384957/>>.

NATURAL RESOURCES DEFENSE COUNCIL (NRDC). *Truck Drivers Face Elevated Health Risks from Diesel Pollution*, 2007. Disponível em: <<https://www.nrdc.org/sites/default/files/driving.pdf>>.

NORGAN, N. G. A review of: *Anthropometric Standardization Reference Manual*. Edited by T. G. LOHMAN, A. F. ROCHE and R. MARTORELL. (Champaign, IL.: Human Kinetics Books, 1988). *Ergonomics*, v. 31, n. 10, p. 1493-1494, 1988.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. *The Economic Consequences of Outdoor Air Pollution*. OECD Publishing, Paris, 2016.

PLATT, S. M.; HADDAD, I. E.; PIEBER, S. M.; HUANG, R. J.; ZARDINI, A. A.; CLAIROTTE, M.; SUAREZ-BERTO, R.; BARMET, P.; PFAFFENBERGER, L.; WOLF, R.; SLOWIK, J. G.; FULLER, S. J.; KALBERER, M.; CHIRICO, R.; DOMMEN, J.; ASTORGA, C.; ZIMMERMANN, R.; MARCHAND, N.; HELLEBUST, S.; TEMIME-ROUSSEL, B.; BALTENSPERGER, U.; PRÉVÔT A. S. Two-stroke scooters are a dominant source of air pollution in many cities. *Nat Commun.* v. 13, n. 5, p. 37-49, 2014.

PREVIATO, H. D. R. A.; VOLP, A. C. P.; FREITAS, R. N. Avaliação da qualidade da dieta pelo Índice de Alimentação Saudável e suas variações: uma revisão bibliográfica. *Nutr Clin Diet Hosp.* v. 34, n. 2, p. 88-96, 2014.

RAMOS, M. C. Sintomas respiratórios na população da cidade de Ribeirão Preto, SP (Brasil): resultados da aplicação de um questionário padronizado. *Rev Saúde Pública.* v. 17, n. 1, p. 41-50, 1983.

RENGARAI D, KWON W.S, PANG, M.G. Effects of Motor Vehicle Exhaust on Male Reproductive Function and Associated Proteins. *J Proteome Res.* 2014.

RIOS, J. L.; BOECHAT, J. L. Indoor and outdoor pollution. *Rev Bras Alergia Immunopatol.* v. 34, n. 2, p. 42-48, 2011. Disponível em: <http://www.asbai.org.br/revistas/vol342/poluicao_34_2_2-13.pdf>.

SCHRANK, D.; LOMAX, T. The 2007 Urban Mobility Report. Texas Transportation Institute, 2007.

SHEN, G. Mutagenicity of particle emissions from solid fuel cookstoves: A literature review and research perspective. *Environ Res.* n. 156, p. 761-769, 2017.

SMITH, K. R.; EZZATI, M. How environmental health risks change with development: The Epidemiologic and Environmental Risk Transitions Revisited. *Annu Rev Environ Resour.* v. 32, p. 345-373, 2005.

TAXELL, P.; SANTONEN T. Diesel Engine Exhaust: Basis for Occupational Exposure Limit Value. *Toxicol Sci.* v. 158, n. 2, p. 243-251, 2017.

TAYLOR, A. H.; DORN, L. Stress, fatigue, health, and risk of road traffic accidents among professional drivers: the contribution of physical inactivity. *Annu Rev Public Health.* v. 27, p. 371-391, 2006.

VAN DER BEEK A. J. World at work: truck drivers. *Occup Environ Med.* v. 9, n. 4, p.291-295, 2012.

WANG, X. C.; TIAN, X. J.; YE, B.; MA, L.; ZHANG, Y.; YANG, J. The effect of ambient PM(10) on sperm quality in Wuhan. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* v. 52, n. 1, p. 73-78, 2018.

WATTS, R. R.; LANGONE, J. J.; KNIGHT, G. J.; LEWTAST, J. Cotinine Analytical Workshop Report: Consideration of Analytical Methods for Determining Cotinine In Human Body Fluids as a Measure of Passive Exposure to Tobacco Smoke. *Environ Health Perspect.* v. 84, p. 173-182, 1990.

WEI, Y.; ZHANG, J. J.; LI, Z.; GOW, A.; CHUNG, K. F.; HU, M.; SUN, Z.; ZENG, L.; ZHU, T.; JIA, G.; LI, X.; DUARTE, M.; TANG, X. Chronic exposure to air pollution particles increases the risk of obesity and metabolic syndrome: findings from a natural experiment in Beijing. *FASEB J.* v. 30, n. 6, p. 2115-2222, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series, Geneva, n. 894, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and Sulfur dioxide. Global update 2005. Geneva: WHO, 2006. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/107823>>.

ANEXOS

Anexo I. Questionário sócio-demográfico.



Universidade Federal de Ciências da Saúde De Porto Alegre
Laboratório de Poluição Atmosférica

QUESTIONÁRIO SÓCIO-DEMOGRÁFICO

DATA: / /

IDENTIFICAÇÃO: _____

NOME		CONTATO:
IDADE	SEXO	ESTADO CIVIL
GRAU DE INSTRUÇÃO () 1º grau completo () 2º grau completo () 3º grau completo () Nenhuma das opções anteriores		
OCUPAÇÃO ATUAL	TEMPO DE ATIVIDADE	
RENDIA		

HÁBITO DE FUMAR:

- () fuma ----- há quanto tempo?
() nunca fumou
() já fumou -----há quanto tempo não fuma mais?

USO DE MEDICAMENTOS E/OU SUPLEMENTOS:

() Sim () Não

Se sim:

Qual/quais? Frequência?

PRESENÇA DE DOENÇA CRÔNICA:

() Sim () Não

Qual/quais?

Anexo II. Anamnese ocupacional.

Relação de Trabalho

- ☐ Proprietário ☐ Empregado ☐ Autônomo ☐ Profissional liberal
☐ Desempregado
☐ Aposentado

Vínculo Empregatício

- ☐ Não se aplica (proprietário / autônomo / desempregado / aposentado)
☐ Empregado urbano com carteira de trabalho assinada
☐ Empregado urbano sem carteira de trabalho assinada
☐ Trabalhador rural com carteira de trabalho assinada
☐ Trabalhador rural sem carteira de trabalho assinada
☐ Meiro ou arrendatário
☐ Funcionário público estatutário
☐ Cooperado
☐ Outro (especificar)

Salário Ou Rendimento Mensal: _____

Descrição do trabalho realizado pelo paciente:

O que faz? _____
Onde faz? _____
Por quanto tempo faz (horas/dia)? _____
Há quanto tempo faz? _____

Ambiente físico de trabalho

Instalações da empresa (área física, tipo de construção, ruído, ventilação e iluminação):

Condições de conforto e higiene (banheiros, lavatórios, bebedouros, vestiário, refeitório, lazer, etc):

Processo de produção:

Matérias-primas; instrumentos e máquinas; produto final, subproduto e resíduos:

Organização do trabalho:

Jornada semanal: _____

Turnos: _____

Duração de jornadas: _____

Horários de trabalho: _____

Folgas: _____

Horas extras: _____

Férias: _____

Clima social de trabalho:

Relacionamento com colegas e chefias: _____

Tipo de supervisão: _____

Suporte social no trabalho: _____

Percepção do trabalhador sobre seu trabalho

Grau de satisfação no trabalho

- ☐ muito satisfeito
☐ satisfeito
☐ regular
☐ insatisfeito
☐ muito insatisfeito

Medidas de proteção coletiva e individual:

- ☐ não
☐ sim

Quais? _____

Exames médicos:

- ☐ exames médicos pré-admissional
☐ exame periódico
☐ exame demissional

Recebe cópia do Atestado de Saúde Ocupacional: ☐ sim ☐ não

É informado sobre e compreende significado dos resultados: ☐ sim ☐ não

Acidente do trabalho:

Já sofreu algum? ☐ sim ☐ não

Apresenta sequelas? ☐ sim ☐ não

Quais? _____

Houve adoção de medidas de prevenção e proteção? ☐ sim ☐ não

Quais? _____

Realizações de avaliações ambientais pela empresa:

A empresa realiza avaliações (medições) ambientais? ☐ sim ☐ não

1 Identificação

Nome:

Telefone:

Endereço:

2 Sinais e sintomas respiratórios

2.3. Costuma tossir por um período de 3 meses ao ano?

() Sim () Não

2.4. Costuma expectorar (catarro) por um período de 3 meses ao ano?

() Sim () Não

2.5. De 1 ano para cá, tem tido chiado no peito?

() Sim () Não

2.6. Costuma tossir logo ao acordar pela manhã?

() Sim () Não

2.7. Costuma tossir durante o dia ou noite?

() Sim () Não

2.8. Há quanto tempo vem tendo essa tosse?

2.9. Costuma expectorar (catarro) ao acordar e a expectoração (catarro) vem do peito?

() Sim () Não

2.10. Costuma expectorar (catarro) durante o dia ou noite?

() Sim () Não

2.11. Há quanto tempo vem tendo essa expectoração?

2.12. Sente falta de ar?

() Sim () Não

2.13. Tem crises de falta de ar?

() Sim () Não

2.14. Costuma ter falta de ar nos intervalos das crises?

() Sim () Não

2.15. Sente falta de ar quando está andando no plano?

() Sim () Não

2.16. Já sentiu falta de ar enquanto subia alguma ladeira?

() Sim () Não

2.17. Costuma ter chiado no peito?

() Sim () Não

2.18. Somente quando está resfriado?

() Sim () Não

2.19. Ocasionalmente, mesmo sem estar resfriado?

() Sim () Não

2.20. Na maioria dos dias ou das noites?

() Sim () Não

2.21. Tem mais crises de falta de ar e chiado em meses frios?

() Sim () Não

2.22. Você teve, nos últimos anos, alguma doença respiratória que o obrigou a se afastar do trabalho/estudo por mais de uma semana?

() Sim () Não

2.23. Durante a doença, você teve mais catarro do que normalmente apresenta?

() Sim () Não

2.24. Qual o diagnóstico dado pelo médico?

2.25. Você fuma atualmente?

() Sim () Não () Sim, outros

2.26. Quantos cigarros você fuma atualmente?

2.27. Já fumou mais de um cigarro por dia por mais de 1 ano?

() Sim () Não

2.28. Com que idade começou a fumar?

2.29. Com que idade parou de fumar?

2.30. Costuma praticar alguma atividade física?

() Sim () Não

2.31. Qual a frequência?

() 1 vez por semana

() 2 ou mais vezes por semana

2.32. Data de nascimento

2.33. Sexo

() Masculino () Feminino

2.34. Nível de escolaridade

() 0-8 anos

() 9-11 anos

() acima de 12 anos

2.35. Qual a sua formação?

2.36. Qual a sua atividade/ocupação?

2.37. Em qual região da Grande Porto alegre você mora?

Cidade: _____

() Norte () Sul

() Leste () Oeste

() Central

2.38. Qual é o tipo de construção de sua residência?

() Alvenaria () Madeira () Outros

2.39. Há quanto tempo mora neste mesmo local?

() 1 ano ou menos () 2 anos () 3 anos () 4 anos () 5 anos

2.40. Utiliza atualmente em sua residência fogão a lenha, carvão ou madeira?

() Sim () Não

2.41. Próximo à sua residência há fábricas, indústrias ou grandes construções que liberam muita fumaça ou poeira?

() Sim () Não

2.42. Tempo de frequência na instituição?

() 4-8 h

() 8-12 h

() acima de 12 h

2.43. Há quanto tempo trabalha/estuda nesta instituição?

() 6 meses-1 ano

() 1 ano-2 anos

() 2 anos-4 anos

() 4 anos ou mais

Instruções para preenchimento:

- b) veja na figura abaixo o que é uma dose;
- a) escolha uma opção para cada pergunta e assinale;
- c) após a última questão some os números que assinalou.



1) Com que frequência você toma bebidas alcoólicas?

- 0 Nunca
- 1 Uma vez por mês ou menos
- 2 Duas a quatro vezes por mês
- 3 Duas a três vezes por semana
- 4 Quatro ou mais vezes por semana

2) Nas ocasiões em que bebe, quantas doses você costuma tomar?

- 0 1 a 2 doses
- 1 3 ou 4 doses
- 2 5 ou 6 doses
- 3 7 a 9 doses
- 4 10 ou mais doses

3) Com que frequência você toma “seis ou mais doses” em uma ocasião?

- 0 Nunca
- 1 Uma vez por mês ou menos
- 2 Duas a quatro vezes por mês
- 3 Duas a três vezes por semana
- 4 Quatro ou mais vezes por semana

4) Com que frequência, durante o último ano, você achou que não seria capaz de controlar a quantidade de bebida depois de começar?

- 0 Nunca
- 1 Uma vez por mês ou menos
- 2 Duas a quatro vezes por mês
- 3 Duas a três vezes por semana
- 4 Quatro ou mais vezes por semana

5) Com que frequência, durante o último ano, você não conseguiu cumprir com algum compromisso por causa da bebida?

- 0 Nunca
- 1 Uma vez por mês ou menos
- 2 Duas a quatro vezes por mês
- 3 Duas a três vezes por semana
- 4 Quatro ou mais vezes por semana

6) Com que frequência, durante o último ano, depois de ter bebido muito, você precisou beber pela manhã para se sentir melhor?

0 Nunca

1 Uma vez por mês ou menos

2 Duas a quatro vezes por mês

3 Duas a três vezes por semana

4 Quatro ou mais vezes por semana

7) Com que frequência, durante o último ano, você sentiu culpa ou remorso depois de beber?

0 Nunca

1 Uma vez por mês ou menos

2 Duas a quatro vezes por mês

3 Duas a três vezes por semana

4 Quatro ou mais vezes por semana

8) Com que frequência, durante o último ano, você não conseguiu se lembrar do que aconteceu na noite anterior por causa da bebida?

0 Nunca

1 Uma vez por mês ou menos

2 Duas a quatro vezes por mês

3 Duas a três vezes por semana

4 Quatro ou mais vezes por semana

9) Alguma vez na vida você ou alguma outra pessoa já se machucou, se prejudicou por causa de você ter bebido ?

0 Não

1 Sim, mas não no último ano

4 Sim, durante o último ano

10) Alguma vez na vida algum parente, amigo, médico ou outro profissional da saúde já se preocupou com você por causa de bebida ou lhe disse para parar de beber?

0 Não

1 Sim, mas não no último ano

4 Sim, durante o último ano

TOTAL: _____

Prezado,

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado: “Avaliação de despechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”.

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda as explicações. Esta declaração descreve os objetivos, os procedimentos a serem realizados e potenciais riscos e benefícios em participar do estudo. Também esclarece que você tem o direito de, a qualquer momento, abandonar o estudo.

O objetivo deste estudo quantificar a exposição de profissionais de diferentes áreas (motoboys, caminhoneiros e funcionários administrativos) aos poluentes do ar na cidade de Porto Alegre e região metropolitana e relacionar esses resultados com o estado de saúde de cada profissional.

Procedimento: Para participar da pesquisa você precisará de mais ou menos 1 hora livre na sua empresa. Será necessária a colocação de filtros de papel específicos na sua moto, caso seja motoboy, ou no seu caminhão, caso seja caminhoneiro. Os filtros permanecerão com você por um tempo determinado (8hs ou 7-14 dias, dependendo da análise) de forma a não atrapalhar o seu trabalho. Também será necessário que você use por 1 (um) dia um pequeno equipamento que medirá o quanto você está sendo exposto aos poluentes do ar. Além disso, você irá responder a alguns questionários sobre informações básicas de sua vida, sobre hábito de beber, sobre sintomas respiratórios e sobre alguns aspectos do seu trabalho. Logo após, você passará por uma avaliação de saúde, onde avaliaremos seu peso e gordura corporal, hábitos alimentares, mediremos sua pressão, seus batimentos cardíacos e avaliaremos sua respiração. Será necessária a coleta de células da sua boca. Essa coleta é feita com uma mini escovinha de dente que irá ser friccionada levemente na parte interna da sua bochecha e ficará com sua saliva. Será feita uma coleta de unha, com um cortador de unha convencional (porém, descartável) e exame de sangue, onde será retirada uma pequena quantidade de sangue da veia do seu braço, mais ou menos uns 5 ml, usando uma agulha descartável. Todos esses seus materiais biológicos serão analisados e logo após descartados, não sendo feito nenhum uso comercial deste material.

Confidencialidade: você terá garantia do sigilo da sua identidade. As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Solicitamos também a autorização do participante para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto e você não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Desconfortos e riscos esperados: Você poderá sentir um pequeno desconforto no momento da coleta de sangue, pelo uso de agulha, podendo surgir um hematoma (roxo) no local onde foi retirado o sangue, tal fato se justifica pela importância de coletar o sangue para a realização das análises. Caso apareça um roxo no local de coleta você será orientado a fazer compressas de gelo no local. Também asseguramos que a equipe de pesquisa dará orientação e assistência de acordo com sua necessidade, caso houver algum desconforto ou prejuízo diretamente derivado da pesquisa.

Os benefícios que se pode obter: você será informado sobre todos os resultados da pesquisa após a análise de todos os dados em conjunto, não havendo benefícios individuais diretos

relacionados aos dados obtidos na pesquisa. Entretanto salienta-se que o monitoramento e avaliação da qualidade do ar podem contribuir para mudança de práticas rotineira e adoção de novas medidas preventivas. Não há despesas pessoais para os participantes em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada a esta participação. O pesquisador se compromete em utilizar os dados coletados no estudo somente para fins da pesquisa.

Garantia de resposta a qualquer pergunta: em qualquer etapa do estudo o participante terá acesso aos pesquisadores para esclarecer qualquer dúvida. O investigador coordenador do projeto é a Professora Doutora Cláudia Ramos Rhoden, que poderá ser encontrada no endereço: Rua Sarmento Leite, 245, Bairro Centro, Laboratório 602, Prédio III, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), CEP 90050-170, e/ou pelo telefone (51) 3303-8800. Também poderá ser consultado o Comitê de Ética da UFCSPA, o qual é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O endereço do Comitê é o seguinte: Rua Sarmento Leite, 245, Bairro Centro, Sala 407, Prédio III, telefone (51) 3303-8804.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si: você poderá decidir em não mais participar do estudo em qualquer momento, sem qualquer penalidade ou prejuízo. Fica também garantida a indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa.

Adesão à pesquisa

Eu,.....(nome do participante) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito da pesquisa e esclareci minhas dúvidas. Estou ciente de que este termo possui 2 (duas) vias, sendo uma ficará com o pesquisador e a outra de minha posse. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. **A biomédica Roseana Boek Carvalho** certificou-me de que todos os dados que forneci serão confidenciais e só serão utilizados para fins de pesquisa.

Data: ____/____/____

Nome e assinatura do participante

Nome e assinatura do pesquisador

Anexo VI. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo dos funcionários administrativos.

Prezado,

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado: “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”.

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda as explicações. Esta declaração descreve os objetivos, os procedimentos a serem realizados e potenciais riscos e benefícios em participar do estudo. Também esclarece que você tem o direito de, a qualquer momento, abandonar o estudo.

O objetivo deste estudo quantificar a exposição de profissionais de diferentes áreas (motoboys, caminhoneiros e funcionários administrativos) aos poluentes do ar na cidade de Porto Alegre e região metropolitana e relacionar esses resultados com o estado de saúde de cada profissional.

Procedimento: Para participar da pesquisa você precisará de mais ou menos 1 hora livre na sua empresa. Será necessária a colocação de filtros de papel específicos na sua mesa de trabalho. Os filtros permanecerão com você por um tempo determinado (8hs ou 7-14 dias, dependendo da análise) de forma a não atrapalhar o seu trabalho. Também será necessário que você use por 1 (um) dia um pequeno equipamento que medirá o quanto você está sendo exposto aos poluentes do ar. Além disso, você irá responder a alguns questionários sobre informações básicas de sua vida, sobre hábito de beber, sobre sintomas respiratórios e sobre alguns aspectos do seu trabalho. Logo após, você passará por uma avaliação de saúde, onde avaliaremos seu peso e gordura corporal, hábitos alimentares, mediremos sua pressão, seus batimentos cardíacos e avaliaremos sua respiração. Será necessária a coleta de células da sua boca. Essa coleta é feita com uma mini escovinha de dente que irá ser friccionada levemente na parte interna da sua bochecha e ficará com sua saliva. Será feita uma coleta de unha, com um cortador de unha convencional (porém, descartável) e exame de sangue, onde será retirada uma pequena quantidade de sangue da veia do seu braço, mais ou menos uns 5 ml, usando uma agulha descartável. Todos esses seus materiais biológicos serão analisados e logo após descartados, não sendo feito nenhum uso comercial deste material.

Confidencialidade: você terá garantia do sigilo da sua identidade. As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Solicitamos também a autorização do participante para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto e você não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Desconfortos e riscos esperados: Você poderá sentir um pequeno desconforto no momento da coleta de sangue, pelo uso de agulha, podendo surgir um hematoma (roxo) no local onde foi retirado o sangue, tal fato se justifica pela importância de coletar o sangue para a realização das análises. Caso apareça um roxo no local de coleta você será orientado a fazer compressas de gelo no local. Também asseguramos que a equipe de pesquisa dará orientação e assistência de acordo com sua necessidade, caso houver algum desconforto ou prejuízo diretamente derivado da pesquisa.

Os benefícios que se pode obter: você será informado sobre todos os resultados da pesquisa após a análise de todos os dados em conjunto, não havendo benefícios individuais diretos relacionados aos dados obtidos na pesquisa. Entretanto salienta-se que o monitoramento e avaliação da qualidade do ar podem contribuir para mudança de práticas rotineira e adoção de novas medidas preventivas. Não há despesas pessoais para os participantes em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada a esta participação. O pesquisador se compromete em utilizar os dados coletados no estudo somente para fins da pesquisa.

Garantia de resposta a qualquer pergunta: em qualquer etapa do estudo o participante terá acesso aos pesquisadores para esclarecer qualquer dúvida. O investigador coordenador do projeto é a Professora Doutora Cláudia Ramos Rhoden, que poderá ser encontrada no endereço: Rua Sarmento Leite, 245, Bairro Centro, Laboratório 602, Prédio III, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), CEP 90050-170, e/ou pelo telefone (51) 3303-8800. Também poderá ser consultado o Comitê de Ética da UFCSPA, o qual é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O endereço do Comitê é o seguinte: Rua Sarmento Leite, 245, Bairro Centro, Sala 407, Prédio III, telefone (51) 3303-8804.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si: você poderá decidir em não mais participar do estudo em qualquer momento, sem qualquer penalidade ou prejuízo. Fica também garantida a indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa.

Adesão à pesquisa

Eu,.....(nome do participante) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito da pesquisa e esclareci minhas dúvidas. Estou ciente de que este termo possui 2 (duas) vias, sendo uma ficará com o pesquisador e a outra de minha posse. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. **A biomédica Roseana Boek Carvalho** certificou-me de que todos os dados que forneci serão confidenciais e só serão utilizados para fins de pesquisa.

Data: ____/____/____

Nome e assinatura do participante

Nome e assinatura do pesquisador

Anexo VII. Termo de Anuência – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual terá o apoio desta Instituição.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2018.

Nome – cargo/função

Anexo VIII. Termo de Anuência – Laboratório de Poluição Atmosférica (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual será realizado nas dependências do Laboratório de Poluição Atmosférica (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre).

Porto Alegre, ____ de _____ de 2018.

Nome – cargo/função

Anexo IX. Termo de Anuência – Laboratório de Análises Clínicas (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual será realizado nas dependências do Laboratório de Análises Clínicas (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre).

Porto Alegre, ____ de _____ de 2018.

Nome – cargo/função

Anexo X. Termo de Anuência – Laboratório ?????????????????? (Universidade Federal do Rio Grande)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual será realizado nas dependências do Laboratório ?????????????????????? (Universidade Federal do Rio Grande).

Porto Alegre, ____ de _____ de 2018.

Nome – cargo/função

Anexo XI. Termo de Anuência – Sindicato dos Motociclistas Profissionais do Rio Grande do Sul (SINDIMOTO)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual será realizado nas dependências do Sindicato dos Motociclistas Profissionais do Rio Grande do Sul (SINDIMOTO).

Porto Alegre, ____ de _____ de 2018.

Nome – cargo/função

Anexo XII. Termo de Anuência – Sindicato dos Caminhoneiros Transportadores Autônomos de Cargas em Geral de Porto Alegre e Região Metropolitana (SINDITACPOA)

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de desfechos decorrentes da exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos em motoristas profissionais”, sob a coordenação e a responsabilidade da Profª Drª. Cláudia Ramos Rhoden da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, o qual será realizado nas dependências do Sindicato dos Caminhoneiros Transportadores Autônomos de Cargas em Geral de Porto Alegre e Região Metropolitana (SINDITACPOA).

Porto Alegre, ____ de _____ de 2018.

Nome – cargo/função

Título:

Realidade Virtual para Pacientes com Amputação de Membro Inferior

RESUMO

A incidência estimada de amputações de membros no mundo — 10^6 pessoas/ano, sendo 85% referentes a amputação de membros inferiores — clama por novas alternativas para a melhoria dos processos de reabilitação deste público. Nesse contexto, os potenciais terapêuticos da Realidade Virtual Imersiva (RVI) apontam o uso dessa tecnologia como uma estratégia promissora em reabilitação, no entanto mais estudos são necessários para atestar sua eficácia. À vista disso, este projeto tem como objetivo avaliar os efeitos do uso de RVI no processo de reabilitação de pacientes com amputação maior de membro inferior (AMMI). A pesquisa será realizada com adultos com AMMI vinculados a um Centro Especializado em Reabilitação (CER) II da cidade de Encantado, RS. Os participantes serão separados em grupos por etapa de reabilitação — pré-protetização, treino protético (TP) com dispositivo auxiliar e TP sem dispositivo auxiliar — e cada grupo, por sua vez, terá seus participantes randomizados e separados entre Grupo de Intervenção (GI) utilizando RVI em Ambiente Virtual (AV) de exercício físico, GI em AV de caminhada relaxante, e grupo controle (GC). Os dois GI receberão 16 sessões de RVI além dos atendimentos convencionais, enquanto o GC permanecerá recebendo apenas os atendimentos convencionais. Os participantes serão avaliados antes e depois das 16 sessões, através da aplicação dos seguintes instrumentos: Entrevista inicial, Questionário de Dor McGill, Escala de Equilíbrio de Berg, Escala de Confiança no Equilíbrio específica para a Atividade, teste em L, Questionário de Medida Funcional para Amputados, Questionário de Avaliação Protética, Teste da Balança e *Prosthesis Embodiment Scale*. Espera-se que os pacientes que receberão a intervenção com RVI apresentem redução na sensação de membro e dor fantasma, expressem maior engajamento na terapia e melhores escores nas avaliações de descarga de peso, equilíbrio e funcionalidade.

INTRODUÇÃO

A amputação, definida como a retirada total ou parcial de um membro, trata-se de um recurso utilizado para o restabelecimento da saúde de um sujeito para o qual não há outras opções viáveis de recuperação de um membro lesado (SOUZA et al., 2019). Configura-se como importante problema de saúde pública, sendo responsável por altas taxas de morbimortalidade, além de causar impactos negativos em aspectos socioeconômicos e de saúde da pessoa amputada (SOUZA et al., 2019; JESUS-SILVA et al., 2017). Estima-se que um milhão de pessoas, mundialmente, sofrem amputação de membros a cada ano (SOUZA et al., 2019), sendo a amputação de membros inferiores correspondente a aproximadamente 85% dessa incidência (JESUS-SILVA et al., 2017). No Brasil, cerca de 13,9 a cada 1 milhão de habitantes anualmente são submetidos a amputações (JESUS-SILVA et al., 2017), tendo sido registradas, em 2018, mais de 59 mil amputações (SOUZA et al., 2019).

As amputações de membro inferior são classificadas em maiores e menores. Estas últimas, referem-se a amputações que em geral não requerem obrigatoriamente a utilização de prótese para a deambulação, e são elas as amputações metatársicas, de Lisfranc e de Chopart. Já as maiores, referem-se as amputações que ocorrem acima do nível do tornozelo, que podem ser classificadas em transtibiais, desarticulação de joelho, transfemorais e desarticulação de quadril (JESUS-SILVA et al., 2017). No contexto das amputações maiores, os serviços de protetização são importantes na melhora da mobilidade, e por consequência da funcionalidade da pessoa amputada, proporcionando maior independência, autonomia, bem-estar e participação social (WHO, 2017). Estima-se que 0,5% da população global necessita da utilização de próteses ou órteses, e esta estimativa tende a dobrar na metade deste século, diante do aumento populacional e da expectativa de vida (WHO, 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde desenvolveu a Rede de Cuidados à Saúde da Pessoa com Deficiência, com objetivo de ampliar e qualificar o acesso e atendimento a esse público dentro do Sistema Único de Saúde (SUS). A rede é composta por pontos de atenção hospitalar e de urgência e emergência; atenção básica; e atenção especializada (BRASIL, 2013). A prescrição, concessão, adaptação e manutenção de próteses, bem como a habilitação do indivíduo amputado para o uso desse dispositivo são ações garantidas por essa rede de cuidados (BRASIL, 2014). Todavia, um dos desafios que ainda necessita ser superado nesse cenário diz respeito às taxas de abandono das próteses, situação desencadeada pela baixa percepção da prótese como parte do próprio corpo

(RASPOPOVIC, 2020) e outros problemas como dificuldade em vestir o dispositivo; dispositivo muito pesado; sintomas de cansaço, tontura, e/ou descompensação da pressão arterial durante o uso; dor fantasma; e medo de cair (CHAMLIAM, 2014).

Esta conjuntura requer novas alternativas para a melhoria dos processos de reabilitação, e uma das opções emergentes trata-se da Realidade Virtual (RV) (STANICA, 2020). Além dos equipamentos estarem tornando-se cada vez mais qualificados, financeiramente acessíveis e fáceis de utilizar (BOHIL, 2011), aponta-se a otimização do treinamento individualizado e o aumento do entretenimento e da motivação na terapia como benefícios do uso da RV enquanto recurso terapêutico em reabilitação (STANICA, 2020). A realidade virtual torna possível a manipulação de ambientes inacessíveis e/ou perigosos na realidade, proporcionando potenciais melhorias na avaliação e treinamento do sistema multissensorial cognitivo-motor (CANNING et al., 2020).

Amputação de Membros Inferiores: Desafios à nova realidade corporal

A amputação de membros inferiores (AMI) acarreta diretamente em limitações de mobilidade, e está relacionada a uma diminuição de informações percebidas pelo sistema nervoso periférico (SNP), especialmente em relação às entradas táteis e proprioceptivas (ESCAMILLA-NUNEZ, 2020). A instabilidade de marcha, devido à ausência do membro e ao provável uso de dispositivos de mobilidade auxiliar ao qual a pessoa não era habituada, e a necessidade de maior atenção durante a caminhada, para compensação das entradas sensoriais ausentes ou imprecisas, fazem com que sujeitos com AMI deambulem mais lentamente e gastem mais energia quando comparados a sujeitos não amputados (CHARKHKAR et al., 2020; ESCAMILLA-NUNEZ et al., 2020).

É comum que se desenvolva um padrão de marcha atípico, com maior carga de peso no membro intacto (CHARKHKAR et al., 2020; ESCAMILLA-NUNEZ et al., 2020). Essa atitude, por sua vez, culmina em problemas de saúde secundários a longo prazo. O uso excessivo do membro intacto pode levar ao desenvolvimento de osteoartrite de joelho e quadril neste membro, enquanto o lado que recebe carga de peso diminuída tende ao desenvolvimento de osteopenia e, consequente, osteoporose (CHARKHKAR et al., 2020). Dores crônicas nas costas também são um reflexo desse padrão assimétrico de descarga de peso e marcha atípica (ESCAMILLA-NUNEZ et al., 2020).

Outra preocupação é em relação ao equilíbrio (PICKLE et al., 2019). Uma vez que há diminuição de informações percebidas pelo SNP, o sistema nervoso central (SNC) gera novas estratégias de movimento para manutenção da estabilidade postural, as quais

geralmente incluem aumento da oscilação (CHARKHKAR et al., 2020). Nem sempre essas estratégias funcionam, acarretando perda de equilíbrio, queda, aumento do medo de cair, diminuição da atividade física, retraimento social e desuso da prótese (BOURQUE et al., 2019; CHARKHKAR et al., 2020; ESCAMILLA-NUNEZ et al., 2020). Assim, a capacidade do indivíduo com AMI de recuperar-se, tanto física quanto psicologicamente torna-se limitada (ESCAMILLA-NUNEZ, 2020).

Além disso, o sujeito amputado pode perceber o membro ausente como se ainda estivesse fazendo parte de seu corpo, o que se denomina de fenômeno do membro fantasma (ESCAMILLA-NUNEZ, 2020). Essa sensação comumente inicia após 1 semana posterior a amputação, porém existem relatos que descrevem seu início meses ou anos após a amputação (AMBRON et al., 2018). Enquanto alguns sujeitos referem conseguir movimentar o membro fantasma, outros referem que o membro se encontra paralisado, geralmente em uma posição estranha (RAMACHANDRAN e ALTSCHULER, 2009). A frequência – esporádica ou estável – e as características da sensação do membro fantasma variam de pessoa para pessoa e relaciona-se com uma ampla gama de percepções sensoriais, entre cinestesia, calor, frio, formigamento e cócegas; pode também levar a sensações dolorosas – queimação, cãibra, compressão, lancinante, choque ou tiros – condição conhecida como dor do membro fantasma (DMF) (AMBRON et al., 2018; COLMENERO et al., 2018; LENDARO et al., 2017; RAMACHANDRAN e ALTSCHULER, 2009). Existe ainda a possibilidade de o membro fantasma ser percebido de maneira encurtada, fenômeno conhecido como telescopagem, e que está associado ao aumento da DMF (AMBRON et al., 2018).

Reabilitação de Pessoas com AMI

A reabilitação envolve diferentes abordagens terapêuticas que visam ampliar ao máximo as capacidades do sujeito, com enfoque na recuperação da mobilidade funcional, minimizando a dependência e melhorando a qualidade de vida da pessoa após a amputação. Em geral, assim que o sujeito se recupera da cirurgia de amputação, é realizada a prescrição da prótese por profissional da saúde, e a reabilitação envolverá intervenções que auxiliam o paciente a se familiarizar com suas próteses, e superar complicações que acompanham seu uso. Considera-se importante a abordagem com enfoque no cuidado físico e psicológico da pessoa com amputação (ÜLGER et al., 2018).

A prática repetida, ou seja, o treinamento regular de uso da prótese demonstra bons resultados para aquisição de habilidades (YOSHIMURA et al., 2020). Dentre as

técnicas utilizadas, a literatura aponta métodos como exercícios de fortalecimento, vídeo games, realidade virtual, terapia do espelho, exercícios de descarga de peso, treinamento de caminhada, treinamento de bicicleta ergométrica, exercícios de coordenação e treinamento de marcha associado a atividades funcionais na vida diária (SOYER et al, 2016; ÜLGER et al., 2018). A avaliação da marcha e do equilíbrio, através de observação de desvios da marcha ou padrões de movimento atípicos, e o fornecimento de orientação verbal para promover correções também é uma abordagem utilizada em reabilitação (ESCAMILLA-NUNEZ et al., 2020).

Como limitações à reabilitação, observa-se a limitação da duração e frequência das sessões de treinamento. Nem sempre os sistemas de saúde têm recursos suficientes para disponibilizar de níveis ideais de serviços terapêuticos (ESCAMILLA-NUNEZ et al., 2020). Além disso, o treinamento repetido requer motivação, portanto é essencial que se possa desenvolver métodos de treinamento que possibilitem melhorar o controle da prótese em menos tempo (YOSHIMURA et al., 2020).

Realidade Virtual

Os sistemas de realidade virtual (RV) buscam produzir imagens suficientemente realistas, a ponto de gerar em um usuário do sistema a sensação de presença física em um ambiente virtual, o qual é simulado por meio de um dispositivo que projeta as imagens para o campo visual (LOMBART et al., 2020). Os componentes deste sistema funcionam em conjunto, para criar ilusões sensoriais e produzir simulações verossímeis da realidade, nas quais o usuário consegue controlar e/ou interagir com o meio e os objetos virtuais de cada ambiente. Assim, a intenção é que se possa produzir no usuário, respostas cerebrais e comportamentais no ambiente virtual que sejam equivalentes ao que ocorreria em um ambiente real (BOHIL et al., 2011).

A tecnologia funciona com a utilização de uma tela proximal, composta de lentes convexas responsáveis pela percepção realista da experiência virtual. Pode ser classificada como RV não-imersiva – na qual o ângulo de visão é fixo e paralelo ao solo – ou imersiva – onde a visão consegue girar livremente (YOON et al., 2020). A aplicação da RV em diferentes atividades e contextos humanos têm se expandido na última década (LOMBART et al., 2020). As possibilidades são inúmeras, visto que em ambientes virtuais é possível transformar cenários e combinar estímulos que seriam impossíveis de serem manipulados em ambientes reais (BOHIL et al., 2011). A tendência é de que, dentro de alguns anos, navegar em ambientes virtuais se torne tão corriqueiro quanto o uso de computadores se tornou para os dias atuais (NATHAN et al., 2019).

Na RV Imersiva (RVI) o usuário tem a experiência de estar visualmente imerso no ambiente simulado, através da utilização de um monitor do tipo *head-mounted display* (HMD), que cobre todo o campo visual (SALAMONA et al., 2018). A visão é o sentido mais comumente associado ao conceito de imersão. Contudo, outras formas de input também são utilizadas para aumentar a experiência virtual. Assim, os *inputs* auditivos e hápticos como o toque, a sensação de movimento, a olfação e o paladar, são testados para qualificar a experiência (SALAMONA et al., 2018).

Alguns estudos utilizando RV em reabilitação sugerem a viabilidade desta tecnologia como potencial estratégia terapêutica (MACHADO e OLIVEIRA, 2016). A RV em reabilitação demonstra viabilidade para pesquisas que envolvem sua relação com processos de conectividade neuronal, de dinâmica de desenvolvimento, de impulsos de saída neuromuscular e de impulsos introdutórios a cascatas moleculares (BOHIL et al., 2011). Mesmo que a pessoa esteja sentada em uma cadeira, visualizar o corpo caminhando aponta para altos índices de propriedade corporal e autopercepção da caminhada, o que está associado a reações tanto subjetivas quanto fisiológicas (KOKKINARA et al., 2016).

Estudos já demonstraram a eficácia da RV para aplicações terapêuticas, sendo a neuro reabilitação um dos domínios de aplicação (BOHIL et al., 2011). O treinamento utilizando a RV em pacientes com Parkinson e com sequelas de AVC, por exemplo, produziu a recuperação de funções motoras (YOSHIMURA et al., 2020). Um dos benefícios do uso da RV em reabilitação refere-se à motivação proporcionada pela sensação de envolvimento que a simulação da RV produz. Assim, o paciente mantém-se mais tempo engajado em práticas consistentes e repetitivas que são necessárias a reabilitação (BOHIL et al., 2011; YOSHIMURA et al., 2020). Há também indícios que a imersão em ambiente virtual a fim de visualizar uma ação, sem necessariamente estar reproduzindo a ação com o corpo real, também facilite a aprendizagem motora (YOSHIMURA et al., 2020).

Em relação à dor neuropática, estudos demonstram eficácia do uso de movimentos virtuais de caminhada na diminuição da dor em pacientes paraplégicos (KOKKINARA et al., 2016). A utilização da RV para modular a percepção de dor nociceptiva, por sua vez, também apontou para resultados importantes, uma vez que os sinais multissensoriais que influenciam a percepção da dor e ativam a matriz de dor em áreas corticais e subcorticais do cérebro, podem ser integrados e manipulados no ambiente virtual (MATAMALA-GOMEZ et al., 2020).

O sucesso da reabilitação de pacientes com AMI envolve necessariamente a motivação do paciente para caminhar como fator preditivo (ESCAMILLA-NUNEZ, 2020), e o treino de marcha em ambientes virtuais vem sendo apontado em pesquisa como uma técnica inovadora para a reabilitação do movimento humano (NATHAN et al., 2019). As abordagens que envolvem RV mostram-se promissoras como estratégias na aprendizagem motora, podendo inclusive promover uma maior adesão ao programa de reabilitação, e acelerar a reabilitação da marcha (ESCAMILLA-NUNEZ, 2020).

Mesmo quando os pacientes não estão de fato realizando o treino com o corpo real, o fluxo óptico gerado pelo ambiente de RVI produz a ilusão de andar (KOKKINARA et al., 2016). O treinamento indireto, através da observação da ação por meio da RV, pode facilitar a aprendizagem de habilidades necessárias ao controle protético (YOSHIMURA et al., 2020). Mesmo que os indivíduos permaneçam sem se movimentar, a observação da ação tem potencial para produzir a mesma atividade neural que o desempenho da tarefa em si. Áreas específicas dentro dos córtices pré-motor, motor e parietal ativam-se durante o planejamento, execução e observação de tarefas de controle motor cognitivo, e essa associação entre as áreas define-se por sistema de neurônios-espelho (SNE) (YOSHIMURA et al., 2020).

No que concerne a dor fantasma, as intervenções clínicas que utilizam ilusões visuais mostram-se eficazes para trabalhar o manejo sintomático da dor. Dentre as intervenções existentes para a criação dessa ilusão, a RVI mostra-se como a mais promissora, uma vez que torna possível ilusões simétricas, que independem do posicionamento do paciente. Em comparação com outras técnicas, como terapia do espelho e imagens mentais, a RVI não requer tanto esforço mental do paciente para autopercepção corporal (COLMENERO, 2018). Ainda assim, os parâmetros de treinamento precisam de aprimoramento para que de fato a RVI possa ser elencada como uma estratégia válida e com efeitos na sensação de dor e na plasticidade cortical (FLOR, 2008).

JUSTIFICATIVA

Ao considerarmos as nuances a respeito da amputação, sujeitos amputados e sociedade, podemos levantar duas perspectivas que conduzem a inúmeros benefícios. A primeira, refere-se ao sucesso da reabilitação de pacientes amputados, independente do tempo de reabilitação. Esse sucesso obviamente reflete de maneira positiva na qualidade de vida dessa população, uma vez que ao aumentar a mobilidade e independência desses sujeitos, amplia-se seu acesso à educação, trabalho, e participação social, possibilitando-os de gozar dos direitos humanos como qualquer outra pessoa na comunidade (WHO, 2017). Além disso, esse sucesso também reflete em benefícios financeiros ao sujeito amputado – que estará apto a exercer um trabalho remunerado – e ao Estado – na medida em que reduzirá custos de auxílios financeiros e de serviços de saúde proporcionalmente a melhora da independência e da saúde das pessoas amputadas (WHO, 2017). O sucesso da protetização e a diminuição do abandono deste dispositivo, por sua vez, garantem o bom uso do dinheiro público, uma vez que o custo das próteses dispensadas é bastante oneroso para o SUS.

Outra perspectiva refere-se a melhoraria da qualidade dos serviços, através da disponibilidade de métodos mais eficazes em reabilitação da pessoa amputada. Assim, pode-se acelerar o tempo de recuperação e diminuir as taxas de readmissão nos serviços, o que pode refletir em benefícios financeiros aos serviços de saúde (WHO, 2017). Além disso, no contexto do SUS, a maior rotatividade de pacientes nos serviços especializados em reabilitação e a não necessidade de readmissão destes mesmos pacientes no serviço aumenta o número de pessoas com acesso ao serviço, e diminui o tempo de espera para início da reabilitação.

Acredita-se que o uso da RVI na reabilitação de pacientes amputados pode ser uma técnica promissora para o sucesso da reabilitação deste público, e pode também acelerar os resultados positivos da reabilitação. Assim sendo, ela contribui no alcance de todos os benefícios supracitados. No entanto, apesar de existirem apontamentos exitosos em relação ao uso dessa técnica em prática clínica e pesquisa, a literatura ainda carece de evidências conclusivas a respeito da intervenção com RVI em pacientes amputados, bem como dos protocolos utilizados (COLMENERO, 2018). Este trabalho contribuirá para a construção de conhecimento nessa área de pesquisa, além de desenvolver e avaliar um protocolo de uso de uma abordagem terapêutica emergente que poderá contribuir na reabilitação dos sujeitos amputados a nível prático.

Ademais, está previsto pelo Ministério da Saúde que os serviços da rede de atenção à pessoa com deficiência possam participar e/ou promover estudo e pesquisa em parceria com instituições de ensino (BRASIL, 2014). Esse projeto possibilitará essa parceria, envolvendo a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) com o CER II de Encantado, que sediará a intervenção dessa pesquisa. O serviço em questão nunca participou de nenhuma pesquisa acadêmica, provavelmente devido à distância geográfica deste em relação às instituições de ensino e ao curto tempo de implementação do serviço. Este estudo possibilitará, portanto, a diminuição de barreiras entre a clínica e a academia, abrindo espaço para trocas importantes entre a teoria e a prática nas instituições envolvidas.

Em especial, o uso de programas de reabilitação com utilização de RV imersiva (RVI) – sistemas que permitem imersão total no ambiente virtual através da utilização de óculos de realidade virtual – apontam aumento da capacidade de plasticidade cerebral, perante o reconhecimento de si mesmo no corpo virtual, como ocorre na terapia de espelho (LEE, 2019). Posto isso, esse projeto propõe avaliar os efeitos de um protocolo envolvendo o uso de RVI na reabilitação de pacientes amputados vinculados a um Centro Especializado em Reabilitação II (CER II) no interior do estado do Rio Grande do Sul (RS), no Brasil.

3. REVISÃO DE LITERATURA

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do uso de realidade virtual imersiva no processo de reabilitação de pacientes com amputação maior de membro inferior.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto do uso de RV na sensação de membro fantasma em pacientes com amputação maior de membro inferior;

- Avaliar o impacto do uso de RV na sensação de dor fantasma em pacientes com amputação maior de membro inferior;

- Avaliar o impacto do uso de RV na descarga de peso sobre a prótese em pacientes com amputação maior de membro inferior;

- Avaliar o impacto do uso de RV no equilíbrio de pacientes com amputação maior de membro inferior;

- Avaliar o impacto do uso de RV no medo de cair de pacientes com amputação maior de membro inferior;

- Avaliar o impacto do uso de RV na funcionalidade de pacientes com amputação maior de membro inferior;

- Avaliar o impacto do uso de RV no engajamento e motivação com a terapia em pacientes com amputação maior de membro inferior;

5. HIPÓTESE

Realidade virtual imersiva é capaz de produzir redução na sensação de membro e dor fantasma em pacientes amputados. Também é capaz de produzir engajamento terapêutico e melhoria nos escores de descarga de peso, equilíbrio e funcionalidade nos amputados.

6. MÉTODO

6.1 Delineamento da Pesquisa

Ensaio Clínico Randomizado Paralelo (ECRP).

6.2 População

A amostra será composta por indivíduos adultos de ambos os sexos, vinculados ao CER II de Encantado/RS, com prontuários ativos no momento da intervenção e que concordem com a participação no estudo, documentada pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6.3 Cálculo amostral

O CER II de Encantado mantém uma média de 80 prontuários ativos de pacientes com AMI. Buscando uma diferença na funcionalidade entre os grupos (3,2 (2,8) vs 5,1(2,9)) (ROTHGANGEL et al., 2018), com significância e poder de 5% e 80%, acrescidos 20% de perdas, a amostra foi estimada em 30 pacientes que receberão intervenção e 30 Controles. Como a intervenção será conforme a etapa de reabilitação (3 etapas) e serão desenvolvidas duas intervenções, serão 5 pessoas por intervenção em cada etapa, e 10 controles, também conforme a etapa.

6.4 Critérios de Inclusão

- 1) Ter 18 anos ou mais;
- 2) Ter realizado amputação maior de membro inferior, uni ou bilateral;

6.5 Critérios de Exclusão

Pacientes que apresentam quaisquer comorbidades que impossibilitem a aplicação do protocolo de RV:

1. Déficit sensoriais que impossibilitem o uso do equipamento de RV;
2. Déficit cognitivo que impeça a compreensão dos protocolos da RV;
3. Diagnóstico de depressão grave ou severa desordem psiquiátrica, conforme descrito no prontuário;

4. Disfunção de qualquer nível do sistema vestibular;
5. Presença de crises convulsivas, náuseas e/ou vômitos em histórico clínico pregresso.

6.6 Estratificação e randomização

Após o aceite em participar da pesquisa, os participantes serão separados em três grupos, conforme o momento de reabilitação em que se encontram: pré-protetização (PP), treino de prótese com uso de dispositivo auxiliar (TPCDA), treino de prótese sem uso de dispositivo auxiliar (TPSDA). Cada um desses grupos, por sua vez, será novamente distribuído em outros três grupos de forma aleatória: Grupo de Realidade Virtual Imersiva de Exercício Físico (GRVI-EF), Grupo de Realidade Virtual Imersiva de Caminhada (GRVI-C) e Grupo Controle (GC). Os pacientes serão randomizados em uma proporção de 1:1:2, utilizando-se um software para alocar randomicamente os participantes nos grupos.

6.7 Desenho experimental

Primeiramente, será realizada uma pesquisa prévia nos prontuários dos pacientes vinculados ao serviço, com o intuito de verificar os critérios de inclusão e exclusão já estabelecidos anteriormente. Os voluntários que estiverem aptos a participar do estudo, conforme os critérios de elegibilidade, serão contatados pela equipe responsável e convidados a participar no estudo. Aqueles que concordarem serão solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I).

Na sequência, uma ficha de avaliação será preenchida conforme o prontuário e entrevista (Anexo II), incluindo dados pessoais e clínicos. Os pacientes do grupo PP serão avaliados através do Questionário de Dor McGill (QDM), da Escala de Avaliação Numérica (EAN), e de pergunta direta sobre o local do membro fantasma. Já os pacientes do grupo TPCDA e TPSDA serão avaliados através dos seguintes instrumentos: QDM, EAN, pergunta direta sobre o local do membro fantasma, Escala de Equilíbrio de Berg (EEB), Escala de Confiança no Equilíbrio específica para a Atividade (Escala ABC), teste em L, Questionário de Medida Funcional para Amputados (QMFA), Questionário de Avaliação Protética (PEQ-PT), Teste da Balança e *Prosthesis Embodiment Scale* (PES)

Após a randomização dos participantes, será realizado o protocolo de intervenção proposto, e as mesmas avaliações serão repetidas após a finalização da intervenção. Um avaliador que não tem conhecimento sobre o protocolo do estudo realizará as avaliações antes e depois da intervenção. Durante a intervenção será controlada a frequência cardíaca dos participantes. Antes e depois de cada sessão da intervenção, os participantes terão a pressão arterial aferida e serão questionados a respeito de dor e de imersão utilizando-se a Escala de Avaliação Numérica (EAN). Após as sessões, semanalmente, o participante responderá o *Virtual Reality Sickness Questionnaire* (VRSQ).

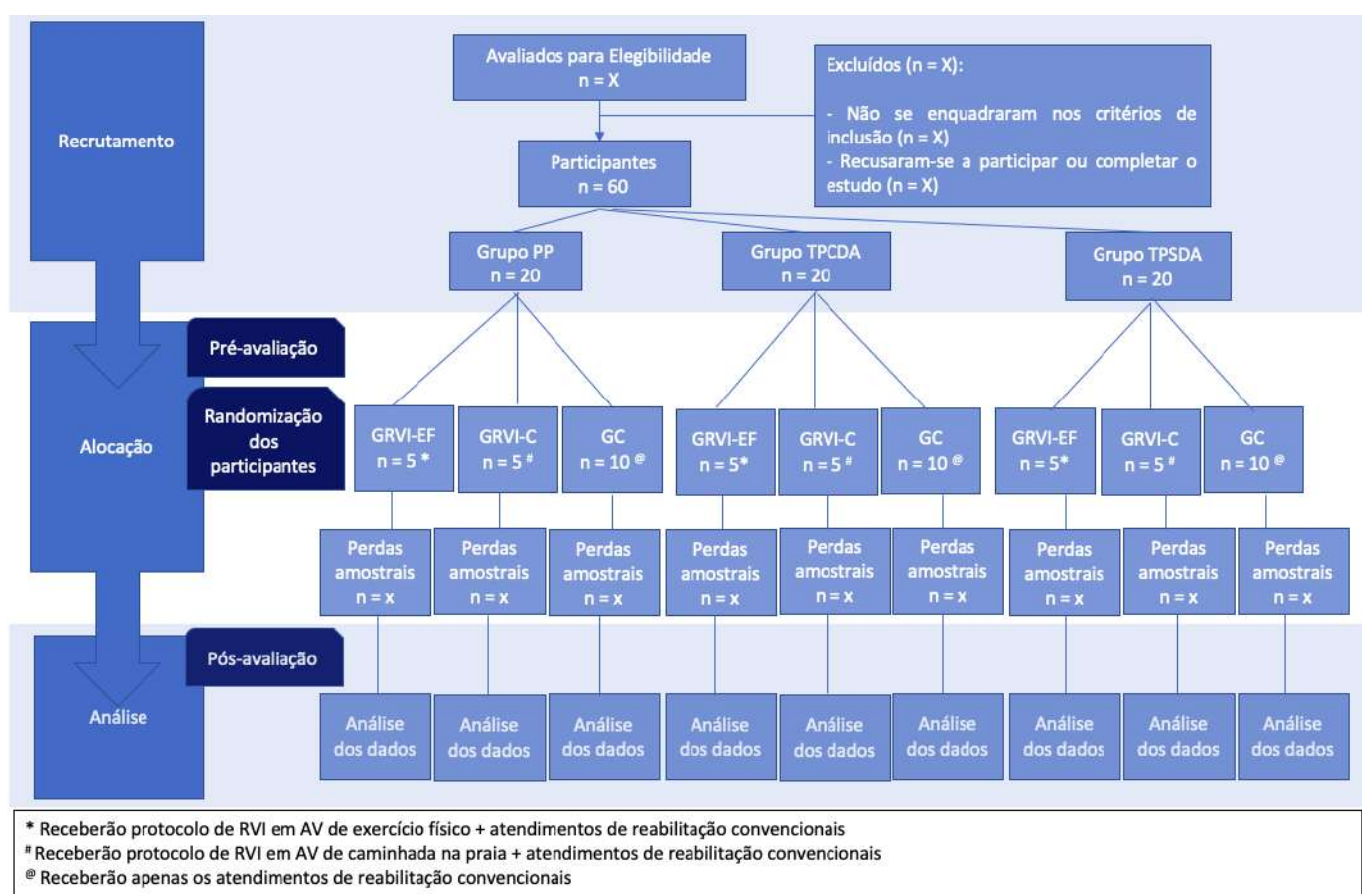


Figura 1. Fluxograma dos participantes e etapas da pesquisa

6.8 Instrumentos de avaliação

6.8.1 Membro fantasma: sensação, tamanho e dor

Antes e depois do protocolo de intervenção a sensação fantasma, o tamanho do membro fantasma e a dor fantasma serão avaliados. A sensação fantasma será avaliada por pergunta direta, já descrita na entrevista inicial. O tamanho do membro fantasma será

registrado e avaliado pedindo que o paciente, com olhos fechados, aponte para diferentes partes do membro fantasma, e será registrado em relatório de esquema corporal (Anexo III). A dor, por sua vez, será caracterizada através da utilização do QDM (Anexo IV). Esse questionário é amplamente utilizado em pesquisas que avaliam dor, tendo sido utilizado previamente em pesquisas envolvendo dor fantasma (PERRY et al., 2018). Trata-se de um questionário com versão validada para português (PIMENTA e TEIXEIRA, 1996). Além disso, a cada sessão será utilizada a EAN, antes e depois da intervenção, para avaliar a intensidade da dor, com 0 simbolizando ausência da dor, e 10 a pior dor possível de ser experimentada.

6.8.2 Mobilidade, equilíbrio e funcionalidade

A mobilidade e o equilíbrio de pacientes que já estão fazendo treino com a prótese, serão avaliados antes e depois do protocolo de intervenção, através da EEB (anexo V), da Escala ABC (anexo VI), e do Teste em L. A EEB é um instrumento desenvolvido para avaliar equilíbrio em idosos, e que foi validado para a avaliação de pessoas com AMI (BOURQUE et al., 2019). É uma escala que avalia o equilíbrio funcional em 14 itens, nos quais cada tarefa é pontuada de 0 a 4, com 0 simbolizando incapacidade de realização e 4 simbolizando desempenho da ação com independência. Trata-se de uma escala com versão validada em português (ANSALDI, et al. 2014). A Escala ABC, por sua vez, avalia o equilíbrio durante o desempenho de 16 atividades de vida diária, e possui uma versão traduzida e validada para o português (BRANCO, 2013).

Já o teste em L avalia o tempo que a pessoa leva para levantar de uma cadeira sem apoio lateral, caminhar 3 metros, virar à direita, caminhar sete metros, e então retornar o caminho percorrido. É um teste de alta confiabilidade, e tem validade semelhante ao teste *timed-up-and-go* (TUG). No entanto, na avaliação de pacientes com prótese de membro inferior, o teste em L mostra-se melhor que o TUG para demonstrar as mudanças nas habilidades de caminhada (BOURQUE et al., 2019).

6.8.3 Específicas para usuários de prótese

Os usuários de prótese também serão submetidos ao QMFA (anexo VII) e ao PEQ-PT (anexo VIII) antes e depois do protocolo de intervenção. Ambos os questionários têm tradução e foram validados para o português (CONRAD et al., 2015; KAGEYAMA et

al., 2008). Trata-se de questionários que avaliam o uso, a função e a qualidade de vida da pessoa usuária de prótese.

6.8.4 Descarga de Peso

A descarga de peso será avaliada pelo teste da balança, previamente utilizado com público usuário de prótese de membro inferior (RAU et al., 2007), antes e depois do protocolo de intervenção. Nesse teste, utilizar-se-á duas balanças de peso idênticas, que permanecerão próximas uma da outra, em superfície nivelada. O paciente será convidado a subir em uma das balanças, tendo seu peso registrado. Depois, deverá colocar um pé em cada balança (o pé do membro residual e o pé protético), da maneira que considere mais confortável para sua estabilidade, e terá novamente os valores de peso registrados. Por último, será solicitado que ele coloque o máximo de peso possível em cima do pé protético, sem apoiar as mãos, e mantendo a posição por 2 segundos. Novamente os valores da balança serão registrados.

6.8.5 Incorporação da Prótese

Para avaliar o sentimento de incorporação da prótese como parte do próprio corpo será utilizada a PES (anexo IX) antes e depois do protocolo de intervenção. A PES trata-se de uma escala recentemente desenvolvida, e que demonstra forte consistência interna (BEKRATER-BODMANN, 2020).

6.8.6 Imersão na RV

Ao final de cada sessão, os pacientes serão questionados sobre o sentimento de imersão no ambiente virtual, utilizando-se a EAN, na qual 0 representa o sentimento de não imersão/desconexão total com o ambiente virtual e 10, o sentimento de imersão total.

6.8.7 Avaliação da *cybersickness*

A fim de avaliar possíveis sensações de mal-estar, semanalmente, após as 2 sessões seguidas de intervenção com RV, o paciente responderá o VRSQ (anexo X) (KIM et al., 2018).

A *cybersickness* está relacionada ao descompasso entre o *input* visual e o movimento corporal percebido. Assim, quanto melhor for a qualidade do processador de imagem e a velocidade da taxa de renovação da imagem projetada nos olhos, menor será a tendência a ocorrência de *cybersickness*. Nosso equipamento tem velocidade acima de 75Hz o que é acima da velocidade percebida pelo olho humano reduzindo muito a chance de enjoo ou tontura.

6.9 Protocolo de intervenção

6.9.1 Grupos de RV Imersiva

Independente do momento de reabilitação, o protocolo de intervenção será o mesmo para os grupos PP, TPCDA e TPSDA. Os participantes que irão compor o GRVI-EF e o GRVI-C, além dos atendimentos convencionais que já recebem no serviço, serão submetidos ao tratamento com RVI, aplicado através dos óculos de RV, modelo *VR One Plus*, e *smartphone*.

Considerando a gravidade da pandemia do COVID-19, a sala de atendimento manter-se-á arejada durante todos os atendimentos, e os atendimentos ocorrerão de maneira individualizada, com a presença apenas do paciente e de um pesquisador da equipe. Além das medidas já executadas pelo CER II, serão tomadas medidas preventivas de proteção e higiene a fim de minimizar os riscos de contágio. São elas:

- Assepsia dos equipamentos e acessórios com álcool 70% e papel toalha descartável, antes e após a intervenção com o HMD;
- Assepsia dos móveis e objetos da sala com os quais a pessoa poderá entrar em contato durante a intervenção ou durante o deslocamento, como cadeiras, mesas, maçanetas, canetas etc., com álcool 70% e papel toalha descartável, entre a saída e a entrada de cada paciente;
- Utilização de equipamento de proteção individual (EPI) por parte do pesquisador, incluso máscara descartável, jaleco descartável, touca descartável, pro-pé descartável, e protetor facial, com troca de EPIs a cada paciente;
- Completa higienização das mãos – lavagem com água e sabão, e finalização com álcool gel 70% – antes e depois da intervenção, por parte do pesquisador e do paciente
- Utilização de máscara descartável por parte do paciente, oferecida pelo pesquisador antes do início da intervenção;

Os participantes que utilizam cadeira de rodas (CR), permanecerão em sua própria CR e os que não utilizam CR, serão posicionados sentados em cadeira com apoio de braços, e com o tronco apoiado, enquanto fazem o uso dos óculos de RV. O ambiente virtual (AV) ao qual os pacientes do GRVI-EF serão imersos representa um ambiente semelhante a uma academia, no qual o avatar será visualizado em primeira pessoa e realizará exercícios físicos durante um período de 15 minutos. Já as pessoas do GRVI-C estarão imersas em um AV que representará uma praia, e se perceberão em primeira pessoa, realizando uma caminhada relaxante na beira do mar, também durante 15 minutos.

A literatura científica não é clara quanto ao número de sessões necessárias para observação de efeitos variando entre 6 e 25 sessões totais de intervenção (CASSANI et al., 2020). Neste estudo optou-se pela realização de 16 sessões, com duas sessões semanais que ocorrerão no mesmo dia para facilitar a participação dos pacientes, especialmente daqueles que se deslocam de outras cidades para o atendimento. Finalizada a primeira sessão de imersão de 15 minutos, os pacientes farão um intervalo de 10 min e serão novamente submetidos ao mesmo ambiente virtual, nas mesmas condições da primeira imersão para uma segunda sessão.

O protocolo de RVI será devidamente supervisionado pela equipe de pesquisa, sendo interrompido imediatamente em casos de desconfortos ou alterações significativas de sinais vitais que possam causar quaisquer riscos ao paciente. A intervenção com RVI será aplicada por pesquisadores devidamente treinados pela equipe de pesquisa, que serão igualmente capacitados quanto ao protocolo de aplicação da RVI.

6.9.2 Grupo Controle

Os participantes que irão compor o GC, continuarão recebendo apenas os atendimentos convencionais já realizados no serviço.

6.10 Local de realização da pesquisa

Todos os procedimentos serão realizados no Centro Especializado em Reabilitação II (CER II) de Encantado/RS, com a devida autorização da Coordenação do centro. O protocolo de estudo será implementado em sala de atendimento padrão do CER II, de aproximadamente 12 m² com uma porta de 90 cm de largura e duas janelas do tipo

Maxim-ar. A mobília da sala é composta por uma cadeira giratória estofada e revestida em couro sintético, duas cadeiras de polipropileno com assento e encosto ergonômicos, uma mesa em MDF reta com pé tubular, e um armário de duas portas também em MDF – no qual ficam armazenados equipamentos próprios do serviço. Os pacientes terão contato apenas com a cadeira em que ficarão sentados e com o dispositivo de realidade virtual (HMD – do inglês *head-mounted display*). O HMD será munido de um celular do tipo smartphone que projetará as imagens diretamente no visor sem que ocorra contato direto com o paciente. O smartphone usado é equipamento específico que será usado apenas para a finalidade de projeção de realidade virtual.

Avaliação de BDNF

Um volume total de 5 ml de sangue venoso será coletado dos pacientes em tubos sem anticoagulante e o soro será separado após 30 minutos de centrifugação (2900 rpm por 15 min). A amostra de soro codificada será armazenada a -80°C. Os níveis séricos de BDNF serão medidos através do kit *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA), utilizando reagentes comerciais (Kit Elisa BDNF Humano - BOST-EK0307-96SW) de acordo com as instruções do fabricante.

6.11 Considerações Éticas

O projeto seguirá os preceitos da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa com seres humanos. O projeto será encaminhado para apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UFCSPA, sendo, posteriormente, adequado às respectivas exigências. O contato e a avaliação dos pacientes somente serão iniciados após a aprovação do projeto pelo CEP. Todos os participantes, serão informados a respeito dos procedimentos, objetivos, justificativas, potenciais riscos e benefícios da sua participação no estudo.

Como possíveis riscos aos quais o participante será exposto, sabe-se que a pesquisa poderá trazer algum constrangimento no que se refere a auto percepção em relação as suas habilidades durante a avaliação. No entanto, essas avaliações e seus escores não diferem muito dos protocolos de avaliação já realizados no Centro Especializado em Reabilitação e são de realização obrigatória antes do início do atendimento. Quanto ao protocolo de RVI, pode ocorrer algum desconforto ou tontura relacionada à RVI. Este desconforto não acontece com todas as pessoas em especial considerando o equipamento usado: *cybersickness* está relacionada ao descompasso entre o input visual e o movimento motor percebido. Assim, quanto melhor for a qualidade do

processador de imagem e a velocidade da taxa de renovação da imagem projetada nos olhos, menor será a tendência a ocorrência de *cybersickness*. Nosso equipamento tem velocidade acima de 75Hz o que é acima da velocidade percebida pelo olho humano reduzindo muito a chance de enjoo ou tontura. Contudo, na eventualidade de ocorrência de *cybersickness*, a experiência virtual será imediatamente interrompida e serão tomadas as medidas necessárias à retomada do bem-estar do paciente, estando este livre para decidir pela descontinuidade do estudo em qualquer momento. Estas situações previamente descritas podem ou não ocorrer e, tanto para quaisquer constrangimentos, quanto para possíveis desconfortos inerentes ao uso de RVI, os riscos estão descritos no próprio TCLE, sendo informados ao paciente antecipadamente a sua aceitação para participação no estudo.

Há ainda um risco mínimo de contaminação pelo uso compartilhado dos equipamentos utilizados na intervenção com RVI, bem como da realização da intervenção na mesma sala, mesmo que com um paciente por vez. No entanto, este risco não é maior do que os riscos de contaminação aos quais os pacientes estão expostos na realização dos atendimentos convencionais que já vem sendo realizados por eles, nos quais também há o compartilhamento dos recursos terapêuticos e a utilização de uma mesma sala de atendimento por diferentes pacientes individualmente.

Para amenizar o risco de transmissão de infecção pelo uso compartilhado de equipamentos e da sala, e considerando a gravidade da pandemia do COVID-19, uma série de medidas preventivas à transmissão infecciosa serão tomadas. São elas:

- Assepsia dos equipamentos e acessórios com álcool 70% e papel toalha descartável, antes e após a aplicação do protocolo;
- Assepsia dos móveis e objetos da sala com os quais a pessoa poderá entrar em contato durante a intervenção ou durante o deslocamento, como cadeiras, mesas, maçanetas, canetas, etc., com álcool 70% e papel toalha descartável, entre a saída e a entrada de cada paciente;
- Completa higienização das mãos – lavagem com água e sabão, e finalização com álcool gel 70% – antes e depois da intervenção, por parte do pesquisador e do paciente;
- Utilização de equipamento de proteção individual (EPI) por parte do pesquisador, incluso máscara descartável, jaleco descartável, touca descartável, propé descartável, e protetor facial, com troca de EPIs a cada paciente;
- Utilização de máscara descartável por parte do paciente, oferecida pelo pesquisador antes do início da intervenção;

Como benefícios, temos a hipótese de que os participantes apresentarão melhora nos desfechos clínicos analisados, bem como maior motivação para o tratamento, além de contribuir com o conhecimento científico. O estudo será registrado na Plataforma de Registro de Ensaio Clínicos (Plataforma ReBEC - <https://ensaiosclinicos.gov.br/>).

6.12 Análise dos Dados

A normalidade dos dados será confirmada através do teste Shapiro-Wilk. Após a normalidade ser confirmada, as mudanças relativas nos escores dos instrumentos serão analisadas utilizando-se ANOVA com teste Bonferroni de comparações múltiplas ou Teste Kruskal-Wallis, caso não. As correlações entre as mudanças relativas nos instrumentos serão avaliadas pelo coeficiente de correlação Pearson ou Spearman. Todos os resultados serão relatados através de média e desvio-padrão e frequência e percentual. Será realizada análise estatística usando o software SPSS versão 25.0. O nível de significância será fixado em 5%.

7. CRONOGRAMA

2020				
Atividades	SET	OUT	NOV	DEZ
Revisão de Literatura	X	X	X	X
Organização do projeto		X	X	X

2021												
Atividades	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Submissão do projeto ao CEP			X									
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Levantamento Amostral							X					

Seleção da amostra							X					
Realização do protocolo de RV								X	X	X	X	
Coleta de dados								X	X	X	X	
Análise dos dados										X	X	X

2022								
Atividades	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise dos dados	X	X						
Elaboração e submissão de artigos científicos			X	X	X	X	X	X

8. ORÇAMENTO

Materiais	Quantidade	Valor total (R\$)
Óculos de RV	2	R\$ 500,00
Celular	2	R\$ 4.000,00
Cadeira	2	R\$ 220,00
Materiais de escritório (folhas A4, canetas, cartucho de tinta para impressora, xerox)	-	R\$ 800,00
Jalecos descartáveis (pacote com 10 un)	16	R\$ 512,00
Máscaras descartáveis (pacote com 50 un)	4	R\$ 120,00
Toucas descartáveis (pacote com 100 un)	2	R\$ 70,00
Propés descartáveis (pacote com 100 un)	4	R\$ 140,00
Protetor facial	2	R\$ 30,00
Álcool em gel 70% (galão com 5 litros)	2	R\$ 110,00

Álcool líquido 70% (galão com 5 litros)	2	R\$ 140,00
Papel toalha descartável (pacote com 2 rolos)	10	R\$ 60,00
Medidor de pressão arterial digital	2	R\$ 180,00
Oxímetro de dedo	2	R\$ 120,00
Balanças de Peso	2	R\$ 120,00
Total:		R\$ 7.122,00

*Os recursos financeiros estarão a encargo dos pesquisadores.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRON, E.; MILLER, A.; KUCHENBECKER, K. J.; BUXBAUM, L. J.; COSLETT, H. B. Immersive Low-Cost Virtual Reality Treatment for Phantom Limb Pain: Evidence from Two Cases. **Front. Neurol.** 9:67. 2018 doi: 10.3389/fneur.2018.00067

ANSAI, Juliana Hotta et al . Revisão de dois instrumentos clínicos de avaliação para predizer risco de quedas em idosos. *Rev. bras. geriatr. gerontol.*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 177-189, Mar. 2014. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232014000100177&lng=en&nrm=iso>.

BATSFORD, S.; RYAN, C. G.; MARTIN, D. J. Non-pharmacological conservative therapy for phantom limb pain: A systematic review of randomized controlled trials. **Physiotherapy Theory & Practice**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 173–183, 2017. DOI 10.1080/09593985.2017.1288283. Disponível em: <http://search.ebscohost-com.ez41.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=c8h&AN=122049943&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 13 nov. 2020.

BEKRATER-BODMANN, R. Perceptual correlates of successful body–prosthesis interaction in lower limb amputees: psychometric characterisation and development of the Prosthesis Embodiment Scale. **Sci Rep** 10, 14203. 2020.

BRANCO, P. S. Determinação dos Pontos de Corte para Elevado Risco de Queda e Mobilidade Normal da Versão Portuguesa da Activities-Specific Balance Confidence (ABC) Scale. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Física e de Reabilitação**. Vol 24. Nº 2. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.25759/spmfr.106>

BRASIL. SECRETARIA DE DIREITOS HUMANOS – SDH. SECRETARIA NACIONAL DE PROMOÇÃO DOS DIREITOS DA PESSOA COM DEFICIÊNCIA – SNPD. VIVER SEM LIMITE – Plano Nacional dos Direitos da Pessoa com Deficiência. 2013

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Rede de Cuidados à Pessoa com Deficiência no âmbito do SUS: INSTRUTIVOS DE REABILITAÇÃO AUDITIVA, FÍSICA, INTELECTUAL E VISUAL. 2014

BOHIL, Corey; ALICEA, Bradly; BIOCCA, Frank A. Virtual reality in neuroscience research and therapy. **Nat Rev Neurosci** 12, 752–762. 2011. <https://doi.org/10.1038/nrn3122>
<https://www.nature.com/articles/nrn3122#citeas>

BOURQUE M. O.; SCHNEIDER, K. L.; CALAMARI, J. E.; REDDIN, C.; STACHOWIAK, A.; MAJOR, M. J.; DUNCAN, C.; MUTHUKRISHNAN, R.; ROSENBLATT, N. J. Combining physical therapy and cognitive behavioral therapy techniques to improve balance confidence and community participation in people with unilateral transtibial amputation who use lower limb prostheses: a study protocol for a randomized sham-control clinical trial. **Trials**. 2019 Dec 30;20(1):812. doi: 10.1186/s13063-019-3929-8.

CANNING, Collen G. et al. Virtual reality in research and rehabilitation of gait and balance in Parkinson disease. **Nat Rev Neurol** 16, 409–425. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0370-2>

CHAMLIAN, Therezinha Rosane. Uso de próteses em amputados de membros inferiores por doença arterial periférica. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 440-446, Dec. 2014. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082014000400440&lng=en&nrm=iso>. access on 08 Nov. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082014AO3132>.

CHARKHKAR, H.; CHRISTIE, B.P.; TRIOLO, R. Sensory neuroprosthesis improves postural stability during Sensory Organization Test in lower-limb amputees. **Scientific Reports**, 10. 2020

COLMENERO, L. H. et al. Effectiveness of mirror therapy, motor imagery, and virtual feedback on phantom limb pain following amputation: A systematic review. **Prosthetics and orthotics international**, 42(3), 288–298. 2018 <https://doi.org/10.1177/0309364617740230>

CONRAD, Carolina et al. Translation into Brazilian Portuguese, cultural adaptation and validation of the Prosthesis Evaluation Questionnaire. *J. vasc. bras.*, Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 110-114, June 2015. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-54492015000200110&lng=en&nrm=iso>.

ESCAMILLA-NUNEZ, R.; MICHELINI, A.; ANDRYSEK, J. Biofeedback Systems for Gait Rehabilitation of Individuals with Lower-Limb Amputation: A Systematic Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(6), 1628. 2020 <https://doi.org/10.3390/s20061628>

FLOR, H. Maladaptive plasticity, memory for pain and phantom limb pain: review and suggestions for new therapies. **Expert Rev Neurother**. May;8(5):809-18. 2008 doi: 10.1586/14737175.8.5.809.

HERRADOR COLMENERO, L.; PEREZ MARMOL, J. M.; MARTÍ-GARCÍA, C.; QUEROL ZALDIVAR, M.; TAPIA HARO, R. M. CASTRO SÁNCHEZ, A. M.; AGUILAR-FERRÁNDIZ, M. E. Effectiveness of mirror therapy, motor imagery, and virtual feedback on phantom limb pain following amputation: A systematic review. **Prosthetics and orthotics international**, 42(3), 288–298. 2018 <https://doi.org/10.1177/0309364617740230>

JESUS-SILVA, Seleno Glauber de et al. Análise dos fatores de risco relacionados às amputações maiores e menores de membros inferiores em hospital terciário. **J. vasc. bras.**, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p. 16-22, Mar. 2017. Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-54492017000100016&lng=en&nrm=iso>. access on 08 Nov. 2020. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.008916>.

KAGEYAMA, Eneida Ritsuko Ono et al . Validação da versão para a língua portuguesa do questionário de Medida Funcional para Amputados (Functional Measure for Amputees Questionnaire). **Fisioter. Pesqui.**, São Paulo , v. 15, n. 2, p. 164-171, 2008. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-29502008000200009&lng=en&nrm=iso>.

KIM, H. K. et al. Virtual reality sickness questionnaire (VRSQ): Motion sickness measurement index in a virtual reality environment. **Applied Ergonomics** 69, 66–7370. 2018

KOKKINARA, E. et al. First Person Perspective of Seated Participants Over a Walking Virtual Body Leads to Illusory Agency Over the Walking. **Sci Rep** 6, 28879. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28879>

LEE, Seung Hak. Upper Extremity Rehabilitation for Stroke Patients Using Fully Immersive Virtual Reality Game: a Preliminary Study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. Volume 100, Issue 10, Pages e138-e139. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2019.08.424>

LENDARO, E.; MASTINU, E.; HÅKANSSON, B.; ORTIZ-CATALAN, M. Real-time Classification of Non-Weight Bearing Lower-Limb Movements Using EMG to Facilitate Phantom Motor Execution: Engineering and Case Study Application on Phantom Limb Pain. *Front. Neurol.* 8:470. 2017 doi: 10.3389/fneur.2017.00470

LOMBART, C. et al. Effects of physical, non-immersive virtual, and immersive virtual store environments on consumers' perceptions and purchase behavior. *Computers in Human Behavior*, **Elsevier**, In press, pp.1- 36. 2020

MACHADO, F. R. C. ; OLIVEIRA, A. A. Interactive Games set with the Movement Sensor Kinect® as a Tool for Cerebral Palsy Rehabilitation. In: Zachary Hill. (Org.). **Interactive Games set with the Movement Sensor Kinect® as a Tool for Cerebral Palsy Rehabilitation**. 1ed.New York: Nova Publishers, p. 127-151, 2016.

MATAMALA-GOMEZ, M.; NIERULA, B.; DONEGAN, T.; SLATER, M.; SANCHEZ-VIVES, M. V. Manipulating the Perceived Shape and Color of a Virtual Limb Can Modulate Pain Responses. **J. Clin. Med.**, 9, 291. 2020

NATHAN, E. P.; WINKLER, S. L. Amputees' Attitudes Toward Participation in Amputee Support Groups and the Role of Virtual Technology in Supporting Amputees: Survey Study. **JMIR Rehabil Assist Technol**. V. 6(2), 14887. 2019. doi:10.2196/14887

PERRY, B. N., ARMIGER, R. S., WOLDE, M., MCFARLAND, K. A., ALPHONSO, A. L., MONSON, B. T., PASQUINA, P. F., & TSAO, J. W. Clinical Trial of the Virtual Integration Environment to Treat Phantom Limb Pain With Upper Extremity Amputation. **Frontiers in neurology**, 9, 770. 2018 <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00770>

PICKLE, N. T. et al. Statistical analysis of timeseries data reveals changes in 3D segmental coordination of balance in response to prosthetic ankle power on ramps. **Sci Rep** 9, 1272, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37581-9>

PIMENTA, C. A de M.; TEIXEIRA, M. J. Questionário de dor McGill: proposta de adaptação para a língua portuguesa. **Rev.Esc.Enf.USP** , v.30. n.3, p. 473-83, dez. 1996.

RAMACHANDRAN, V. S.; ALTSCHULER, E. L. The use of visual feedback, in particular mirror visual feedback, in restoring brain function. **Brain**. Jul;132 (Pt 7):1693-710. 2009 doi: 10.1093/brain/awp135..

RASPOPOVIC, Stanisa. Advancing limb neural prostheses. **Science**. Vol. 370, Issue 6514, pp. 290-291, 2020. DOI: 10.1126/science.abb1073 <<https://science.sciencemag.org/content/370/6514/290>>

RAU, B., BONVIN, F., DE BIE, R. Short-term effect of physiotherapy rehabilitation on functional performance of lower limb amputees. **Prosthetics and orthotics international**, 31(3), 258–270. 2007 <https://doi.org/10.1080/03093640600994615>

ROTHGANGEL, A., BRAUN, S., WINKENS, B., BEURSKENS, A., & SMEETS, R. Traditional and augmented reality mirror therapy for patients with chronic phantom limb pain (PACT study): results of a three-group, multicentre single-blind randomized controlled trial. *Clinical rehabilitation*, 32(12), 1591–1608. 2018 <https://doi.org/10.1177/0269215518785948>

SALAMONA, N. et al. Application of virtual reality for crew mental health in extended-duration space missions. *Acta Astronautica* 146, 117–122. 2018

SOUZA, Ylkiany Pereira de; SANTOS, Ana Célia Oliveira dos; ALBUQUERQUE, Luciana Camelo de. Caracterização das pessoas amputadas de um hospital de grande porte em Recife (PE, Brasil). **J. vasc. bras.**, Porto Alegre , v. 18, e20190064, 2019 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-54492019000100315&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 08 nov. 2020. Epub 04-Nov-2019. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.190064>.

SOYER, K.; UNVER, B.; TAMER, S.; ULGER, O. The importance of rehabilitation concerning upper extremity amputees: A Systematic review. **Pakistan journal of medical sciences**, 32(5), 1312–1319. 2016 <https://doi.org/10.12669/pjms.325.9922>

STANICA, Cristina Iulia et al. Flexible Virtual Reality System for Neurorehabilitation and Quality of Life Improvement. **Sensors**. 20(21), 6045. 2020. <https://doi.org/10.3390/s20216045>

ÜLGER, Ö.; YILDIRIM ŞAHAN, T.; ÇELİK, S. E. A systematic literature review of physiotherapy and rehabilitation approaches to lower-limb amputation. **Physiotherapy theory and practice**, 34(11), 821–834. 2018. <https://doi.org/10.1080/09593985.2018.1425938>

WHO – World Health Organization. Standards For Prosthetics And Orthotics - Part 1: Standards. 2017

YOON, H. J. et al. Influence of virtual reality on visual parameters: immersive versus non-immersive mode. *BMC Ophthalmol* 20, 200. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01471-4>

YOSHIMURA, M. et al. Virtual reality-based action observation facilitates the acquisition of body-powered prosthetic control skills. **J NeuroEngineering Rehabil** 17, 113. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12984-020-00743-w>

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da Realidade Virtual em Pacientes Amputados de Membro Inferior”, desenvolvido pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e realizado no Centro Especializado em Reabilitação II de Encantado/RS, sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Alcyr Alves de Oliveira.

O objetivo do estudo é investigar os efeitos do uso de realidade virtual em indivíduos adultos com amputação de membro inferior sobre a sensação de membro fantasma e sobre os aspectos que envolvem equilíbrio e funcionalidade. Realidade virtual é uma técnica na qual o indivíduo usa um equipamento similar a um óculo, através do qual se pode assistir a uma projeção, de modo que se perceba como dentro das cenas e possa interagir e movimentar-se nestas cenas.

A razão para propormos este estudo é a carência de informações que possibilitem entender melhor como esta técnica pode ajudar diferentes tipos de pacientes com amputação. Os resultados deste estudo contribuirão grandemente para o entendimento e aperfeiçoamento de tecnologias para a saúde dos pacientes.

Caso você concorde em participar do estudo, precisará responder algumas perguntas no início e no final do estudo. Acreditamos que você levará aproximadamente uma hora e meia para isso. Algumas das perguntas podem te deixar um pouco

desconfortável, mas todas as suas respostas a cada uma das perguntas são confidenciais e não serão divulgadas em nenhum momento.

O estudo contará com três grupos de participantes sendo que o tratamento convencional será mantido para todos os pacientes. Os grupos serão formados por sorteio sendo que quem ficar no grupo 1 realizará atividade de exercícios físicos em realidade virtual por 15 minutos. O grupo 2 realizará uma caminhada relaxante em realidade virtual. E o grupo 3 manterá o tratamento convencional clínico. As sessões de RVI serão realizadas 1 vez por semana, duas vezes neste mesmo dia da semana, durante um período de 8 semanas. Todos os participantes poderão realizar as atividades dos outros grupos em que não estiveram incluídos no momento do encerramento do estudo.

Esperamos que esse procedimento possa ajudar na sua recuperação. É importante mencionar que não existem riscos reconhecidos para a saúde produzidos por este procedimento. Contudo, é possível a ocorrência de desconforto em algumas pessoas pelo uso de realidade virtual. Este desconforto pode ser reconhecido como sensação de náusea (você pode se sentir enjoado) ou sentir alguma tontura. Neste caso, salientamos que você estará acompanhado por um técnico devidamente treinado e sob a supervisão constante do coordenador do estudo e da equipe de saúde do CER II. Em qualquer caso de desconforto o procedimento será imediatamente interrompido e a devida assistência será administrada. Em caso de enjoo o recomendado é a parada imediata da experiência virtual, manter os olhos fechados e respiração controlada em ambiente ventilado e fresco.

Os protocolos de manutenção e higienização do CER recomendados pelas autoridades sanitárias serão reforçados para que sejam minimizados os riscos de contágio pela COVID-19. Assim, as salas de espera e de atendimento serão constantemente mantidas sob controle para preservar os devidos protocolos sanitários como uso de máscara e distanciamento entre os usuários do centro. Todas as intervenções serão realizadas com hora marcada para evitar aglomeração em sala de espera. Não existe risco de queda ou lesão visto que você permanecerá sentado durante toda a intervenção.

Os pesquisadores responsáveis acompanharão os procedimentos em todos os momentos. Essa pesquisa garante aos participantes o ressarcimento e/ou cobertura de eventuais despesas exclusivamente resultantes da participação no estudo. Na eventualidade de prejuízos comprovadamente decorrentes da pesquisa, os participantes serão indenizados. Salientamos que a participação é totalmente voluntária podendo ser interrompida em qualquer momento ou etapa do estudo sem quaisquer prejuízos para você

ou para o projeto. Os seus dados pessoais e todas as suas informações são protegidos e confidenciais e não serão utilizados para outro fim além do estudo previsto neste TCLE.

Todos os procedimentos serão supervisionados pelo Prof. Dr. Alcyrr Alves de Oliveira (Cel. 51-99824-7846) e pela Terapeuta Ocupacional Bibiana Mayer Steckel (Cel. 55-99958-6720), pesquisadores da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Este projeto está em conformidade com a Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA poderá ser contatado em qualquer momento pelo telefone (51) 3303-8804 ou pelo e-mail cep@ufcspa.edu.br.

Se, após estar ciente dos objetivos dessa pesquisa, você concorda em participar do estudo, solicitamos que assine as duas vias desse documento e devolva uma aos pesquisadores. Desde já, a equipe do Prof. Dr. Alcyrr Alves de Oliveira agradece sua contribuição.

Eu _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima descrita. Sei que essa pesquisa é de participação voluntária e que em qualquer momento eu poderei solicitar novas informações e modificar a decisão de participar da pesquisa, se assim desejar. O professor Dr. Alcyrr Alves de Oliveira e os integrantes de sua equipe de pesquisa certificaram-me de que todos os dados deste estudo serão anônimos e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu tratamento.

O investigador _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Declaro que recebi uma via do presente Termo de Consentimento. Data: ____/____/____.

Assinatura do Participante

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Coordenador: Prof. Dr. Alcyr Alves de Oliveira (email: alcyr@ufcspa.edu.br)

Rua Sarmento Leite, 245, sala 504, Prédio III

Fone: (51) 99824-7846.

T.O. Bibiana Mayer Steckel (email: bmayerst@gmail.com)

Fone: (55) 99958-6720

Rua Sete de Setembro, 16, Centro, Encantado/RS.

Comitê de Ética em Pesquisa - UFCSPA:

Rua Sarmento Leite, 245, Prédio 3, sala 407.

Telefone: (51) 3303-8804

Horário de Atendimento: das 8h30 às 12h e das 13h30 às 17h.

ANEXO II - ENTREVISTA INICIAL

Entrevista Inicial

Nome: _____ DN: _____

Idade: _____ Sexo: M (☐) F (☐) Outro (☐) Altura: _____ cm Peso: _____ kg

Lado da Amputação: E(☐) D(☐)

Nível de Amputação: (☐)Desarticulação de Quadril (☐)Transfemural

(☐)Desarticulação de Joelho (☐)Transtibial

Razão da Amputação: _____

Tempo desde a Amputação: _____

Sensação no coto: () normal () hipersensível () sensação protetora apenas
() sem sensibilidade/hiposensível () dor fantasma () sensação fantasma

Realizou acompanhamento com profissional de reabilitação (fisioterapeuta ou terapeuta ocupacional)? não () sim: () **Se sim, tempo de reabilitação:**

Está fazendo uso de dispositivo de mobilidade? não () sim: (), **se sim, qual?** cadeira de rodas () andador () muleta () outro:

Está fazendo uso ou já fez uso de prótese?

não, e não irá utilizar ()

não, mas está aguardando ()

sim, já fez uso anteriormente de prótese retirada em outro local ()

sim, está fazendo uso de prótese retirada nesse local ()

Se sim:

Tempo de uso da prótese: _____

Tipo de Prótese: () transtibial () transfemural () desarticulação de joelho () desarticulação de quadril ()

Material: () polipropileno () resina acrílica

Estética: () Plástico () espuma + meia cosmética

Pé: () sach () articulada

Para transtibial:

Estrutura de encaixe () válvula + linner + joelheira () EVA + joelheira
() Outro _____

Para transfemural:

Forma de encaixe: () quick fit () álcool gel

Estrutura de encaixe: () válvula de expulsão () outro

Tipo de joelho: () joelho livre () joelho com trava manual

Obs.: _____

ANEXO III - RELATÓRIO DE ESQUEMA CORPORAL

Com a pessoa de olhos fechados, solicitar que ela aponte para partes específicas do membro fantasma.

Marcar onde a pessoa apontou...

... Em caso de amputação de Desarticulação de Quadril e Transfemural:

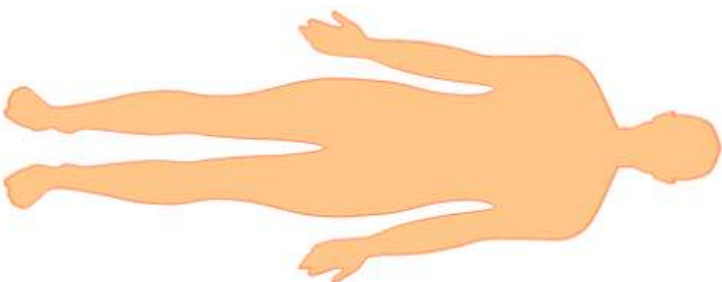
- Metade da coxa
- Joelho
- Metade da Perna
- Tornozelo
- Pé

... Em caso de amputação de Desarticulação de Joelho:

- Joelho
- Metade da Perna
- Tornozelo
- Pé

... Em caso de amputação Transtibial:

- Metade da Perna
- Tornozelo
- Pé



As palavras abaixo descrevem sua dor atual¹. Escolha as palavras que descrevem melhor a sua dor. Não escolha aquelas que não se aplicam ao seu caso. Escolha somente uma palavra de cada grupo. Você pode pular um grupo, caso nenhuma palavra se aplique ao seu caso.

1) 1. vibração 2. tremor 3. pulsante 4. latejante 5. como batida 6. como pancada	6) 1. fisgada 2. puxão 3. em torção	11) 1. cansativa 2. exaustiva	16) 1. chata 2. que incomoda 3. desgastante 4. forte 5. insuportável
2) 1. pontada 2. choque 3. tiros	7) 1. calor 2. queimação 3. fervente 4. em brasa	12) 1. enjoada 2. sufocante	17) 1. espalhada 2. irradia 3. penetra 4. atravessa
3) 1. agulhada 2. perfurante 3. facada 4. punhalada 5. em lança	8) 1. formigamento 2. coceira 3. ardor 4. ferroadada	13) 1. castigante 2. atormentada 3. cruel	18) 1. aperta 2. adormece 3. repuxa 4. espreme 5. rasga
4) 1. fina 2. cortante 3. esfaçalha	9) 1. mal localizada 2. dolorida 3. machucada 4. doída 5. pesada	14) 1. amedrontadora 2. apavorante 3. aterrorizante 4. maldita 5. mortal	19) 1. fria 2. gelada 3. congelante
5) 1. beliscão 2. aperto 3. mordida 4. cólica 5. esmagamento	10) 1. sensível 2. esticada 3. esfolante 4. rachante	15) 1. miserável 2. enlouquecedora	20) 1. aborrecida 2. dá náusea 3. agonizante 4. pavorosa 5. torturante

ANEXO V - ESCALA DE EQUILÍBRIO DE BERG

Brazilian-Portuguese Version Of The Berg Balance Scale
Escala de equilíbrio funcional de Berg - Versão Brasileira

Nome _____ Data _____
 Local _____ Avaliador _____

Descrição do item ESCORE (0-4)

- 1 . Posição sentada para posição em pé _____
- 2 . Permanecer em pé sem apoio _____
- 3 . Permanecer sentado sem apoio _____
- 4 . Posição em pé para posição sentada _____
- 5 . Transferências _____
- 6 . Permanecer em pé com os olhos fechados _____
- 7 . Permanecer em pé com os pés juntos _____
- 8 . Alcançar a frente com os braços estendidos _____
- 9 . Pegar um objeto do chão _____
10. Virar-se para olhar para trás _____
11. Girar 360 graus _____
12. Posicionar os pés alternadamente no degrau _____
13. Permanecer em pé com um pé à frente _____
14. Permanecer em pé sobre um pé _____

Total _____

Instruções gerais

Por favor, demonstrar cada tarefa e/ou dar as instruções como estão descritas. Ao pontuar, registrar a categoria de resposta mais baixa, que se aplica a cada item.

Na maioria dos itens, pede-se ao paciente para manter uma determinada posição durante um tempo específico.

Progressivamente mais pontos são deduzidos, se o tempo ou a distância não forem atingidos, se o paciente precisar de supervisão (o examinador necessita ficar bem próximo do paciente) ou fizer uso de apoio externo ou receber ajuda do examinador. Os pacientes devem entender que eles precisam manter o equilíbrio enquanto realizam as tarefas. As escolhas sobre qual perna ficar em pé ou qual distância alcançar ficarão a critério do paciente. Um julgamento pobre irá influenciar adversamente o desempenho e o escore do paciente.

Os equipamentos necessários para realizar os testes são um cronômetro ou um relógio com ponteiro de segundos e uma régua ou outro indicador de: 5; 12,5 e 25 cm. As cadeiras utilizadas para o teste devem ter uma altura adequada. Um banquinho ou uma escada (com degraus de altura padrão) podem ser usados para o item 12.

1. Posição sentada para posição em pé

Instruções: Por favor, levante-se. Tente não usar suas mãos para se apoiar.

- () 4 capaz de levantar-se sem utilizar as mãos e estabilizar-se independentemente
- () 3 capaz de levantar-se independentemente utilizando as mãos
- () 2 capaz de levantar-se utilizando as mãos após diversas tentativas
- () 1 necessita de ajuda mínima para levantar-se ou estabilizar-se
- () 0 necessita de ajuda moderada ou máxima para levantar-se

2. Permanecer em pé sem apoio

Instruções: Por favor, fique em pé por 2 minutos sem se apoiar.

- () 4 capaz de permanecer em pé com segurança por 2 minutos
- () 3 capaz de permanecer em pé por 2 minutos com supervisão
- () 2 capaz de permanecer em pé por 30 segundos sem apoio
- () 1 necessita de várias tentativas para permanecer em pé por 30 segundos sem apoio
- () 0 incapaz de permanecer em pé por 30 segundos sem apoio

Se o paciente for capaz de permanecer em pé por 2 minutos sem apoio, dê o número total de pontos para o item No. 3. Continue com o item No. 4.

3. Permanecer sentado sem apoio nas costas, mas com os pés apoiados no chão ou num banquinho

Instruções: Por favor, fique sentado sem apoiar as costas com os braços cruzados por 2 minutos.

- ☐ 4 capaz de permanecer sentado com segurança e com firmeza por 2 minutos
- ☐ 3 capaz de permanecer sentado por 2 minutos sob supervisão
- ☐ 2 capaz de permanecer sentado por 30 segundos
- ☐ 1 capaz de permanecer sentado por 10 segundos
- ☐ 0 incapaz de permanecer sentado sem apoio durante 10 segundos

4. Posição em pé para posição sentada

Instruções: Por favor, sente-se.

- ☐ 4 senta-se com segurança com uso mínimo das mãos
- ☐ 3 controla a descida utilizando as mãos
- ☐ 2 utiliza a parte posterior das pernas contra a cadeira para controlar a descida
- ☐ 1 senta-se independentemente, mas tem descida sem controle
- ☐ 0 necessita de ajuda para sentar-se

5. Transferências

Instruções: Arrume as cadeiras perpendicularmente ou uma de frente para a outra para uma transferência

em pivô. Peça ao paciente para transferir-se de uma cadeira com apoio de braço para uma cadeira sem

apoio de braço, e vice-versa. Você poderá utilizar duas cadeiras (uma com e outra sem apoio de braço)

ou uma cama e uma cadeira.

- ☐ 4 capaz de transferir-se com segurança com uso mínimo das mãos
- ☐ 3 capaz de transferir-se com segurança com o uso das mãos
- ☐ 2 capaz de transferir-se seguindo orientações verbais e/ou supervisão
- ☐ 1 necessita de uma pessoa para ajudar
- ☐ 0 necessita de duas pessoas para ajudar ou supervisionar para realizar a tarefa com segurança

6. Permanecer em pé sem apoio com os olhos fechados

Instruções: Por favor, fique em pé e feche os olhos por 10 segundos.

- ☐ 4 capaz de permanecer em pé por 10 segundos com segurança
- ☐ 3 capaz de permanecer em pé por 10 segundos com supervisão
- ☐ 2 capaz de permanecer em pé por 3 segundos
- ☐ 1 incapaz de permanecer com os olhos fechados durante 3 segundos, mas mantém-se em pé
- ☐ 0 necessita de ajuda para não cair

7. Permanecer em pé sem apoio com os pés juntos

Instruções: Junte seus pés e fique em pé sem se apoiar.

- ☐ 4 capaz de posicionar os pés juntos independentemente e permanecer por 1 minuto com segurança
- ☐ 3 capaz de posicionar os pés juntos independentemente e permanecer por 1 minuto com supervisão
- ☐ 2 capaz de posicionar os pés juntos independentemente e permanecer por 30 segundos
- ☐ 1 necessita de ajuda para posicionar-se, mas é capaz de permanecer com os pés juntos durante 15 segundos
- ☐ 0 necessita de ajuda para posicionar-se e é incapaz de permanecer nessa posição por 15 segundos

8. Alcançar a frente com o braço estendido permanecendo em pé

Instruções: Levante o braço a 90°. Estique os dedos e tente alcançar a frente o mais longe possível.

(O examinador posiciona a régua no fim da ponta dos dedos quando o braço estiver a 90°. Ao serem

esticados para frente, os dedos não devem tocar a régua. A medida a ser registrada é a distância que os

dedos conseguem alcançar quando o paciente se inclina para frente o máximo que ele consegue. Quando

possível, peça ao paciente para usar ambos os braços para evitar rotação do tronco).

- () 4 pode avançar à frente mais que 25 cm com segurança
- () 3 pode avançar à frente mais que 12,5 cm com segurança
- () 2 pode avançar à frente mais que 5 cm com segurança
- () 1 pode avançar à frente, mas necessita de supervisão
- () 0 perde o equilíbrio na tentativa, ou necessita de apoio externo

9. Pegar um objeto do chão a partir de uma posição em pé

Instruções: Pegue o sapato/chinelo que está na frente dos seus pés.

- () 4 capaz de pegar o chinelo com facilidade e segurança
- () 3 capaz de pegar o chinelo, mas necessita de supervisão
- () 2 incapaz de pegá-lo, mas se estica até ficar a 2-5 cm do chinelo e mantém o equilíbrio independentemente
- () 1 incapaz de pegá-lo, necessitando de supervisão enquanto está tentando
- () 0 incapaz de tentar, ou necessita de ajuda para não perder o equilíbrio ou cair

10. Virar-se e olhar para trás por cima dos ombros direito e esquerdo enquanto permanece em pé

Instruções: Vire-se para olhar diretamente atrás de você por cima do seu ombro esquerdo sem tirar os

pés do chão. Faça o mesmo por cima do ombro direito. (O examinador poderá pegar um objeto e posicioná-lo diretamente atrás do paciente para estimular o movimento)

- () 4 olha para trás de ambos os lados com uma boa distribuição do peso
- () 3 olha para trás somente de um lado, o lado contrário demonstra menor distribuição do peso
- () 2 vira somente para os lados, mas mantém o equilíbrio
- () 1 necessita de supervisão para virar
- () 0 necessita de ajuda para não perder o equilíbrio ou cair

11. Girar 360 graus

Instruções: Gire-se completamente ao redor de si mesmo. Pausa. Gire-se completamente ao redor de si

mesmo em sentido contrário.

- () 4 capaz de girar 360 graus com segurança em 4 segundos ou menos
- () 3 capaz de girar 360 graus com segurança somente para um lado em 4 segundos ou menos
- () 2 capaz de girar 360 graus com segurança, mas lentamente
- () 1 necessita de supervisão próxima ou orientações verbais
- () 0 necessita de ajuda enquanto gira

12. Posicionar os pés alternadamente no degrau ou banquinho enquanto permanece em pé sem apoio

Instruções: Toque cada pé alternadamente no degrau/banquinho. Continue até que cada pé tenha

tocado o degrau/banquinho quatro vezes.

- () 4 capaz de permanecer em pé independentemente e com segurança, completando 8 movimentos em 20 segundos

() 3 capaz de permanecer em pé independentemente e completar 8 movimentos em mais que 20 segundos

() 2 capaz de completar 4 movimentos sem ajuda

() 1 capaz de completar mais que 2 movimentos com o mínimo de ajuda

() 0 incapaz de tentar, ou necessita de ajuda para não cair

13. Permanecer em pé sem apoio com um pé à frente

Instruções: (demonstre para o paciente) Coloque um pé diretamente à frente do outro na mesma linha;

se você achar que não irá conseguir, coloque o pé um pouco mais à frente do outro pé e levemente para o lado.

() 4 capaz de colocar um pé imediatamente à frente do outro, independentemente, e permanecer por 30 segundos

() 3 capaz de colocar um pé um pouco mais à frente do outro e levemente para o lado, independentemente, e permanecer por 30 segundos

() 2 capaz de dar um pequeno passo, independentemente, e permanecer por 30 segundos

() 1 necessita de ajuda para dar o passo, porém permanece por 15 segundos

() 0 perde o equilíbrio ao tentar dar um passo ou ficar de pé

14. Permanecer em pé sobre uma perna

Instruções: Fique em pé sobre uma perna o máximo que você puder sem se segurar.

() 4 capaz de levantar uma perna independentemente e permanecer por mais que 10 segundos

() 3 capaz de levantar uma perna independentemente e permanecer por 5-10 segundos

() 2 capaz de levantar uma perna independentemente e permanecer por mais que 3 segundos

() 1 tenta levantar uma perna, mas é incapaz de permanecer por 3 segundos, embora permaneça em pé independentemente

() 0 incapaz de tentar, ou necessita de ajuda para não cair

() Escore total (Máximo = 56)

ANEXO VI - ESCALA ABC

Escala de Equilíbrio de Atividades Específicas
Activities-specific Balance Scale (ABC)

Para cada uma das seguintes atividades, por favor, indique o nível de confiança escolhendo o número correspondente de 0% a 100%, sendo 0% igual à sem confiança nenhuma e 100% totalmente confiante.

Quanto confiante você é para manter seu equilíbrio e permanecer firme quando você:

ATIVIDADE	%
1. andar pela casa ?	
2. subir ou desce escadas ?	
3. inclinar-se para pegar um objeto no chão enfrente a um armário ?	
4. alcançar um pequeno objeto em uma prateleira que fica a altura dos seus olhos?	
5. ficar na ponta dos pés e alcançar um objeto acima da sua cabeça ?	
6. sentar em uma cadeira alcançar algum objeto ?	
7. varrer o chão ?	
8. andar pela calçada até chegar em um carro estacionado ?	
9. entrar e sair de um carro ?	
10. caminhar pelo estacionamento de um shopping ?	
11. subir ou descer uma rampa ?	
12. caminhar pelo shopping onde as pessoas ao redor estão andando depressa ?	
13. é trombado por pessoas enquanto caminha pelo shopping ?	
14. subir ou descer de escada rolante enquanto segura o corrimão ?	
15. subir ou descer de escada rolante enquanto segura objetos que impedem que você segure no corrimão ?	
16. andar em superfícies escorregadias ?	

ANEXO VII - QUESTIONÁRIO DE MEDIDA FUNCIONAL PARA AMPUTADOS

Questionário de Medida Funcional para Amputados																																													
Algumas pessoas decidem não usar sua prótese por várias razões. Ao responder este questionário, por favor, lembre-se que não importa se você usa ou não a sua prótese, contanto que se sinta feliz com a decisão.	Este questionário é absolutamente confidencial; suas respostas não irão comprometer seu benefício da Previdência Social.																																												
1 Você diria que é capaz de colocar a sua prótese... a. sozinho, sem qualquer dificuldade? ☐ b. sozinho, mas com dificuldade? ☐ c. sozinho, mas com uma outra pessoa o orientando? ☐ d. somente se tiver ajuda de outra pessoa? ☐																																													
2 (responda 0 a 42 pontos.) Atualmente, você consegue realizar as seguintes atividades usando a sua prótese? Mesmo que, para isso, tenha que usar uma bengala ou qualquer outro auxílio para realizá-las? NÃO = 0; SIM, se alguém me ajudar = 1; SIM, se alguém estiver próximo = 2; SIM, sozinho = 3																																													
a. Levantar-se de uma cadeira? b. Pegar um objeto do chão quando você está em pé com a sua prótese? c. Levantar-se do chão (por exemplo, se você tivesse caído) d. Andar pela casa? e. Andar fora de casa em piso liso? f. Andar fora de casa em piso irregular ou acidentado? (por exemplo, grama, cascalho, ladeira) g. Andar fora de casa com mau tempo, por exemplo, com chuva? h. Subir escadas segurando um corrimão? i. Descer escadas segurando um corrimão? j. Subir na calçada? k. Descer da calçada? l. Subir alguns degraus sem um corrimão? m. Descer alguns degraus sem um corrimão? n. Andar enquanto carrega um objeto (por exemplo, xícara ou copo, bolsa ou sacola)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>0</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	0	1	2	3																																								
0	1	2	3																																										
3 Quando você precisa se locomover dentro de casa, aproximadamente quanto das suas atividades são feitas... a. Na cadeira de rodas? b. Andando com sua prótese (mesmo que precise usar bengala ou andador) c. Andando sem sua prótese, mas usando um auxílio para andar, como muletas ou andador?		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Quase nenhuma</th> <th>Metade</th> <th>Quase todas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Quase nenhuma	Metade	Quase todas																																								
Quase nenhuma	Metade	Quase todas																																											
4 Quantas horas por dia você usa sua prótese? Quantas dias por semana você usa sua prótese?																																													
5 O que o impede de usar sua prótese para se locomover dentro de casa:		Concordo Discordo																																											
a. Eu sempre uso a minha prótese para me locomover dentro de casa. <i>Se o paciente responder que concorda, ignore os itens seguintes e passe para a questão 6; se responder que não concorda, preencha o restante desta questão, até o item i.</i> b. Eu não me locomovo rápido o suficiente com a minha prótese dentro de casa. c. Eu acho muito cansativo me locomover com a minha prótese dentro de casa. d. Usar a minha prótese para me locomover dentro de casa causa problemas para a minha perna não amputada (por ex., cansaço, dor, inchaço etc.) e. Quando uso a minha prótese para me locomover dentro de casa, ela me causa problemas (por ex.: desconforto, transpiração, má circulação etc.) f. Usar a minha prótese para me locomover dentro de casa causa problemas para o meu corpo (por ex., irritação da pele, desconforto, dor, feridas etc.) g. Usar a minha prótese para me locomover dentro de casa me faz sentir inseguro. h. Eu não uso a minha prótese para me locomover dentro de casa, porque sinto que ela precisa de ajustes (por ex., o canucho está muito apertado ou muito largo ou é muito pesada, não há espaço suficiente em casa etc.) i. Eu não uso a minha prótese para me locomover dentro de casa por outras razões.	<table border="1"> <tbody> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>																																												
6 Quando você precisa se locomover fora de casa, aproximadamente quanto das suas atividades são feitas... a. Na cadeira de rodas? b. Andando com sua prótese, mesmo se usando bengala ou andador? c. Andando sem sua prótese, mas usando muletas ou andador?		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Quase nenhuma</th> <th>Metade</th> <th>Quase todas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Quase nenhuma	Metade	Quase todas																																								
Quase nenhuma	Metade	Quase todas																																											

7 O que o impede de usar a sua prótese para se locomover fora de casa? Concordo Discordo

- a. Eu sempre uso a minha prótese para me locomover fora de casa.

Se o paciente responder que concorda, ignore os itens seguintes e passe para a questão 8; se responder que não concorda, então complete o restante desta questão, até o item i.
- b. Eu não me locomovo rápido o suficiente com a minha prótese fora de casa.

- c. Eu acho muito cansativo usar minha prótese fora de casa.

- d. Usar a minha prótese para me locomover fora de casa causa problemas para a minha perna não amputada (por ex. cansaço, dor, inchaço etc.)

- e. Quando uso a minha prótese para me locomover fora de casa, ela me causa problemas (por ex. desconforto, transpiração, má circulação, etc.)

- f. Usar a minha prótese para me locomover fora de casa causa problemas para o meu coto (por ex., irritação da pele, desconforto, dor, feridas etc.)

- g. Quando uso minha prótese fora de casa tenho medo de cair.

- h. Não uso a minha prótese fora de casa quando a distância a percorrer é muito longa.

- i. Eu não uso a minha prótese para me locomover fora de casa por outras razões (por ex., é muito pesada, por dificuldade de acesso fora de casa etc.)

8 Quando você anda com a sua prótese, aproximadamente, qual a distância que consegue percorrer sem parar?

- a. Eu posso andar o quanto eu quiser.

- b. Eu posso andar aproximadamente 100 passos sem parar.

- c. Eu posso andar mais que 30 passos de uma vez, mas menos do que 100 passos sem parar.

- d. Eu posso andar entre 10 e 30 passos sem parar.

- e. Eu posso andar menos de 10 passos sem parar.

- f. Eu não consigo andar com a minha prótese.

9 Desde que você recebeu alta, você caiu enquanto usava a sua prótese?

Sim ☐ Quantas vezes no último mês? _____ Não ☐

10 Que tipo de auxílio(s) para andar você mais usa para realizar as atividades com a prótese? (por ex., levantar-se, andar, subir escadas etc.) Dentro de casa Fora de casa

- a. Nenhum
- b. 1 bengala
- c. 2 bengalas
- d. 1 bengala com 4 pés
- e. Muletas
- f. Andador
- g. Outros (especificar) _____

As duas próximas questões, 11 e 12, só serão feitas se o paciente não estiver usando a prótese. Se o paciente usa a prótese, passe para a questão 13.

11 Quando você parou de usar a sua prótese?

- a. Há menos de 1 mês ☐
- b. Há menos de 6 meses ☐
- c. Há menos de 1 ano ☐
- d. Há menos de 2 anos ☐
- e. Há menos de 3 anos ☐
- f. Há menos de 4 anos ☐
- g. Há 4 anos ou mais ☐
- h. Eu nunca a usei ☐

12 Por que você parou de usar a sua prótese?

- a. O cartucho da minha prótese estava muito largo para o meu coto.

- b. O cartucho da minha prótese estava muito apertado para o meu coto.

- c. Era muito cansativo.

- d. Foi realizada uma nova cirurgia no meu coto (por ex., nova amputação, outra cirurgia).

- e. Outros motivos (especificar) _____

13 (Reformulada)

Nas suas atividades do dia-a-dia, dentro e fora de casa, qual a resposta que melhor descreve o grau de dificuldade que você apresenta depois da amputação?

- a. Eu não era uma pessoa muito ativa antes da minha perna ser amputada.

- b. Eu deixei de fazer a maioria das minhas atividades após a amputação da minha perna.

- c. Eu só consigo realizar as atividades dentro de casa.

- d. Eu faço todas as atividades dentro de casa e só consigo fazer algumas fora de casa.

- e. Eu retornei às minhas atividades exatamente como antes da amputação.

14 Você tem algum comentário a fazer a respeito da sua amputação, da prótese ou da reabilitação?

ANEXO VIII - QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO PROTÉTICA

O Questionário de Avaliação de Prótese - PEQ - PT
Guia de Pontuação e Análise

Codificação de todas as perguntas no PEQ - PT

Perguntas sobre a sua prótese

Página/Item	Escala ou Pergunta Individual	Nome da Variável	Pergunta "Ao longo das últimas quatro semanas,..."	Código de Pontuação
1ª	Pergunta de Satisfação	SAhapypros	...avalie quão feliz se sente com a sua prótese actual.	0-100
1B	Escala de Utilidade	UTfit	... avalie o ajuste da sua prótese.	0-100
1C	Escala de Utilidade	UTweight	...avalie o peso da sua prótese.	0-100
1D	Escala de Utilidade	UTstand	...avalie o conforto da sua prótese quando em pé.	0-100
2E	Escala de Utilidade	UTsit	...avalie o conforto da sua prótese quando sentado.	0-100
2F	Escala de Utilidade	UTbalance	...avalie com que frequência perdeu o equilíbrio utilizando a sua prótese.	0-100
2G	Escala de Utilidade	UTenergy	...avalie o esforço necessário para utilizar a sua prótese durante o tempo que precisa.	0-100
2H	Escala de Utilidade	UTfeel	... avalie a sensação transmitida do seu coto dentro da prótese (ex: temperatura e a textura)	0-100
	Escala de Utilidade	UTdon	... avalie a facilidade de colocação da sua prótese.	0-100
3J	Escala de Aparência	APproslook	... avalie o aspecto da sua prótese.	0-100
3K	Escala de Sons	SOfreqsoun	... avalie com que frequência a sua prótese rangeu, estalou ou fez sons de flatulência.	0-100
3L	Escala de Sons	SObotsoun	Se a sua prótese fez algum som nas últimas quatro semanas, avalie quão incomodativos foram esses sons para si - ou assinale que não verificou nenhum som.	0-100 Se assinalado pontue 100
3M	Escala de Aparência	APdamagclo	... avalie os danos causados pela sua prótese ao seu vestuário.	0-100
3N	Escala de Aparência	APdamagcov	... avalie os danos causados ao revestimento cosmético da sua prótese – ou assinale que a sua prótese não tem revestimento cosmético.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
4O	Escala de Aparência	APshoechoi	... avalie a sua capacidade para usar sapatos da sua preferência (alturas e estilos diferentes).	0-100

4P	Escala de Aparência	APclothchoi	... avalie as limitações de escolha de vestuário impostas pela sua prótese	0-100
4Q	Escala de saúde do membro residual	RLsweat	... avalie o quão 0 dentro da sua prótese (na meia, liner, encaixe)	0-100
4R	Escala de saúde do membro residual	RLsmell	... avalie o mau cheiro da sua prótese no seu pior	0-100
4S	Escala de saúde do membro residual	RLswollen	... avalie quanto tempo o seu coto esteve inchado ao ponto de mudar o ajuste da sua prótese	0-100
5T	Escala de saúde do membro residual	RLrash	... avalie qualquer irritação no seu coto – ou assinale se não verificou quaisquer erupções cutâneas no seu coto durante o último mês.	0-100 Se assinalado pontue 100
5U	Escala de saúde do membro residual	RLhair	... avalie quaisquer pêlos encravados existentes no seu coto – ou assinale que não verificou pêlos encravados no seu coto durante o último mês	0-100 Se assinalado pontue 100

O Questionário de Avaliação de Prótese - PEQ - PT
Guia de Pontuação e Análise

5V	Escala de saúde do membro residual	RLsore	... avalie quaisquer bolhas ou feridas existentes no seu coto – ou assinale que não verificou bolhas ou feridas no seu coto durante o último mês	0-100 Se assinalado pontue 100

Perguntas sobre Sensações Corporais Específicas

Página/Item	Escala ou Pergunta Individual	Nome da Variável	Pergunta "Ao longo das últimas quatro semanas,..."	Código de Pontuação
6	Pergunta de Dor	PAfrephsen	...avalie quantas vezes teve sensações não dolorosas no seu membro fantasma. a. nunca b. apenas uma ou duas vezes c. algumas vezes (cerca de 1 vez por semana) d. frequentemente (2,3 vezes por semana) e. muito frequentemente (4-6 vezes por semana) f. várias vezes por dia g. sempre ou quase sempre	a=0 b=1 c=2 d=3 e=4 f=5 g=6
6B	Pergunta de Dor	PAintphsen	Se teve sensações indolores no seu membro fantasma durante o último mês, avalie a sua intensidade média. Ou assinale que não teve sensações indolores no seu membro fantasma.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)

6C	Pergunta de Dor	PAbotphsen	... Quão incomodativas foram estas sensações no seu membro fantasma? Ou assinale que não teve sensações indolores no seu membro fantasma.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
7D	Pergunta de Dor	PAfrephpa	...avalie com que frequência sentiu dor no seu membro fantasma. a. nunca b. apenas uma ou duas vezes c. algumas vezes (cerca de 1 vez por semana) d. frequentemente (2,3 vezes por semana) e. muito frequentemente (4-6 vezes por semana) f. várias vezes por dia g. a toda a hora	a=0 b=1 c=2 d=3 e=4 f=5 g=6
7E	Pergunta de Dor	PAdurphpa	Normalmente, quanto tempo dura a dor no seu membro fantasma? a. não sinto dor b. alguns segundos c. alguns minutos c. entre alguns minutos e uma hora e. várias horas f. um dia ou dois g. mais do que dois dias	a=0 b=1 c=2 d=3 e=4 f=5 g=6
7F	Pergunta de Dor	PAintphpa	Se sentiu alguma dor no seu membro fantasma, avalie a sua intensidade média no último mês. Ou assinale que não sentiu qualquer dor no seu membro fantasma.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
7G	Pergunta de Dor	PAbotphpa	... Quão incomodativa foi a dor no seu membro fantasma, no último mês? Ou assinale que não sentiu qualquer dor no seu membro fantasma.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)

O Questionário de Avaliação de Prótese - PEQ - PT
Guia de Pontuação e Análise

8H	Pergunta de Dor	PAfrerlpa	...avalie com que frequência sentiu dor no seu coto. a. nunca b. apenas uma ou duas vezes c. algumas vezes (cerca de 1 vez por semana) d. frequentemente (2,3 vezes por semana) e. muito frequentemente (4-6 vezes por semana) f. várias vezes por dia g. a toda a hora	a=0 b=1 c=2 d=3 e=4 f=5 g=6
8I	Pergunta de Dor	PAintrlpa	Se sentiu alguma dor no seu coto durante o último mês, avalie a sua intensidade média. Ou assinale que não sentiu qualquer dor no seu coto,	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
8J	Pergunta de Dor	PAbotrlpa	...Quão incomodativa foi a dor no seu coto? Ou assinale que não sentiu qualquer dor no seu coto.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
8K	Pergunta de Dor	PAfreolpa	...avalie com que frequência sentiu dor na sua outra perna ou pé. a. nunca b. apenas uma ou duas vezes c. algumas vezes (cerca de 1 vez por semana) d. frequentemente (2,3 vezes por semana) e. muito frequentemente (4-6 vezes por semana) f. várias vezes por dia g. a toda a hora	a=0 b=1 c=2 d=3 e=4 f=5 g=6
9L	Pergunta de Dor	PAintolpa	Se sentiu qualquer dor na sua outra perna ou pé durante o último mês, avalie a sua intensidade média. Ou assinale que não sentiu dor na sua outra perna ou pé.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)

9M	Pergunta de Dor	PAbotolpa	...Quão incomodativa foi a dor na sua outra perna ou pé? Ou assinale que não sentiu qualquer dor na sua outra perna ou pé.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
9N	Pergunta de Dor	PAfrebapa	...avalie com que frequência teve dores de costas a. nunca b. apenas uma ou duas vezes c. algumas vezes (cerca de 1 vez por semana) d. frequentemente (2,3 vezes por semana) e. muito frequentemente (4-6 vezes por semana) f. várias vezes por dia g. a toda a hora	a=0 b=1 c=2 d=3 e=4 f=5 g=6
9O	Pergunta de Dor	PAintbapa	Se teve dores de costas durante o último mês, avalie a sua intensidade média. Ou assinale que não sentiu dores de costas.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
10P	Pergunta de Dor	PAbotbapa	...Quão incomodativa foi a dor de costas? Ou assinale que não sentiu qualquer dor de costas.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)

O Questionário de Avaliação de Prótese - PEQ - PT
Guia de Pontuação e Análise

Perguntas sobre Aspectos Sociais e Emocionais na Utilização de uma Prótese

Página/Item	Escala ou Pergunta Individual	Nome da Variável	Pergunta "Ao longo das últimas quatro semanas,..."	Código de Pontuação
10A	Escala de Reacção Entendida	PRavoidoth	... avalie com que frequência a vontade de evitar reacções de estranhos à sua prótese o impediu de fazer algo que, de outra forma, faria.	0-100
10B	Escala de Frustração	FRfreqfrus	... avalie com que frequência se sentiu frustrado com a sua prótese.	0-100
10C	Escala de Frustração	FRmostfrus	Se se sentiu frustrado com a sua prótese durante o último mês, pense no acontecimento mais frustrante e avalie como se sentiu na altura. Ou assinale que não se sentiu frustrado com a sua prótese.	0-100 Se assinalado pontue 100
11D	Escala de Reacção Entendida	PRpartresp	... avalie a reacção do seu companheiro à sua prótese. Ou assinale que não tem um companheiro.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
11E	Escala de Reacção Entendida	PRrelafct	... avalie como esta reacção afectou a vossa relação. Ou assinale que não tem um companheiro.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
11F	Esta questão prepara as próximas perguntas, tendo o entrevistado de identificar duas pessoas em particular que tenha em mente, fornecendo uma identificação mínima.		Pense em dois familiares próximos (para além do seu companheiro) e indique o seu grau de parentesco, tal como mãe ou filho. Ou assinale que não tem familiares próximos.	Esta pergunta não é pontuada
11G	Escala de Reacção Entendida	PRfamlres	... avalie como o Membro Familiar nº1 reagiu à sua prótese. Ou assinale que não tem familiares próximos..	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)



12H	Escala de Reacção Entendida	PRfam2res	... avalie como o Membro Familiar nº2 reagiu à sua prótese. Ou assinale que não tem familiares próximos..	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
12I	Escala de Carga Social	SBpartburd	... avalie quanto a sua prótese tem sido um fardo para o seu companheiro ou os seus familiares. Ou assinale que não tem um companheiro ou membros familiares.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)
12J	Escala de Carga Social	SBsochind	... avalie quanto o prejudicou socialmente ter uma prótese.	0-100
12K	Escala de Carga Social	SBcaregive	... avalie a sua capacidade de cuidar de outra pessoa (p. ex. o seu companheiro, uma criança, ou um amigo). Ou assinale que não cuida de outra pessoa.	0-100 Se assinalado classifique como sr (sem resposta)

O Questionário de Avaliação de Prótese - PEQ - PT
Guia de Pontuação e Análise

Perguntas sobre Capacidade de Deslocação

Página/Item	Escala ou Pergunta Individual	Nome da Variável	Pergunta "Ao longo das últimas quatro semanas,..."	Código de Pontuação
13A	Escala de Deambulação	AMwalk	... avalie a sua capacidade de andar utilizando a sua prótese.	0-100
13B	Escala de Deambulação	AMclose	... avalie a sua capacidade de andar em espaços apertados utilizando a sua prótese.	0-100
13C	Escala de Deambulação	AMupstair	... avalie a sua capacidade de subir escadas utilizando a sua prótese.	0-100
13D	Escala de Deambulação	AMdwnstair	... avalie como se sentiu em relação a ser capaz de descer escadas utilizando a sua prótese.	0-100
14E	Escala de Deambulação	AMuphill	... avalie a sua capacidade de subir um terreno íngreme utilizando a sua prótese.	0-100
14F	Escala de Deambulação	AMdownhill	... avalie a sua capacidade de descer um terreno íngreme utilizando a sua prótese.	0-100
14G	Escala de Deambulação	AMsidewalk	... avalie a sua capacidade de andar em passeios e ruas utilizando a sua prótese.	0-100
14H	Escala de Deambulação	AMslip	... avalie a sua capacidade de andar em pisos escorregadios (p. ex. azulejo molhado, neve, uma rua chuvosa ou o convés de um barco) utilizando a sua prótese.	0-100
14I	Pergunta de Transferência	TRcar	... avalie a sua capacidade para entrar e sair de um carro utilizando a sua prótese	0-100
15J	Pergunta de Transferência	TRhichair	... avalie a sua capacidade para se sentar ou levantar de uma cadeira alta (p. ex. uma cadeira de jantar, uma cadeira de cozinha, uma cadeira de escritório)	0-100
15K	Pergunta de Transferência	TRiochair	... avalie a sua capacidade para se sentar ou levantar de uma cadeira baixa ou mole (p. ex. uma poltrona ou um sofá fundo)	0-100
15L	Pergunta de Transferência	TRtoilet	... avalie a sua capacidade para se sentar ou levantar da sanita	0-100
15M	Pergunta de Transferência	TRbath	... avalie a sua capacidade para tomar duche ou tomar banho em segurança	0-100

O Questionário de Avaliação de Prótese - PEQ - PT
Guia de Pontuação e Análise

17E	Pergunta de Cuidado Protésico	PCprostist	Quão satisfeito está com a pessoa que ajustou a sua prótese actual?	0-100
17F	Pergunta de Cuidado Protésico	PCcurtrain	Quão satisfeito está com a formação que recebeu relativamente à utilização da sua prótese actual? Ou assinale que não teve qualquer formação relativamente à sua prótese actual.	0-100 Se assinalado assinale como sr (sem resposta)
17G	Pergunta de Cuidado Protésico	PCalltrain	No geral, quão satisfeito está com o seu andar e a formação protésica que recebeu desde a sua amputação. Ou assinale que não recebeu qualquer formação desde a sua amputação.	0-100 Se assinalado assinale como sr (sem resposta)

Perguntas sobre a capacidade para realizar actividades quotidianas sob condições difíceis

Página/Item	Escala ou Pergunta Individual	Nome da Variável	Pergunta	Código de Pontuação
18A em Gp6	Pergunta de Eficácia Própria	SEfitpoor	Quando o ajuste da minha prótese é inadequado, eu consigo...	0-100
18B	Pergunta de Eficácia Própria	SEcomfpor	Quando a minha prótese é desconfortável, eu consigo...	0-100
18C	Pergunta de Eficácia Própria	SEnopro	Sem a minha prótese, eu consigo...	0-100

Perguntas sobre a Importância de diferentes aspectos da experiência com uma prótese

Página/Item	Escala ou Pergunta Individual	Nome da Variável	Pergunta	Código de Pontuação
18A em Gp7	Pergunta de Importância	IMimpwt	Quão importante é para si que o peso da prótese pareça certo?	0-100
19B	Pergunta de Importância	IMimpdon	Quão importante é para si a facilidade de colocação da sua prótese?	0-100
19C	Pergunta de Importância	IMimpapear	Quão importante é para si a aparência da sua prótese (o aspecto)?	0-100
19D	Pergunta de Importância	IMimpshoe	Quão importante é para si poder usar diferente tipo de calçado (alturas e estilos)?	0-100
19E	Pergunta de Importância	IQuMimpcover	Quão importante é para si que o revestimento cosmético da sua prótese seja durável (não se rasgar, amolgar, riscar-se facilmente, ou descolorar)?	0-100
19F	Pergunta de Importância	IMsweatbot	Quão incomodativo é para si quando sua muito dentro da sua prótese (na meia, liner, encaixe)?	0-100
20G	Pergunta de Importância	IMswellbot	Quão incomodativo é para si quando o seu coto incha?	0-100
20H	Pergunta de Importância	IMnohair	Quão importante é para si evitar ter pelos encravados (espinhas) no seu coto?	0-100,
10I	Pergunta de Importância	IMlookubot	Quão incomodativo é para si ver pessoas a olhar para si e para a sua prótese?	0-100
20J	Pergunta de Importância	IMimpuphil	Quão importante é para si conseguir subir um terreno íngreme?	0-100

ANEXO IX - PROSTHESIS EMBODIMENT SCALE

Prosthesis Embodiment Scale for Lower Limb Amputees (PEmbS-LLA)

☐ I have put on my prosthesis.

Instruction: Please make sure that you can look directly at your prosthesis (for instance, by wearing shorts). For each of the following statements, please indicate how much you agree or disagree with it. If you agree with the statement, mark one of the positive numbers (1, 2, 3): the more positive the number, the more you agree with the statement. If you disagree with the statement, mark one of the negative numbers (-1, -2, -3): the more negative the number, the more you disagree with the statement. You should select the zero (0) only if you neither agree nor disagree with the statement. Please reply spontaneously, without thinking twice, and do not skip any statement. There are no right or wrong answers.

Please look at your prosthesis for about 60 seconds.

☐ I have looked at my prosthesis for about 60 seconds and I am ready to continue.

	strongly disagree						strongly agree
1. I feel as if I was looking directly at my own leg, rather than at a prosthesis.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
2. The prosthesis belongs to me.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
3. It feels as if I had two legs.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
4. The prosthesis is my leg.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
5. The prosthesis is a part of my body.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
6. The posture of the prosthesis corresponds to that of a real leg.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
7. My body feels complete.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
8. The prosthesis is in the location where I would expect my leg to be, if it was not amputated.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)

Please stand up and walk around the room for about 30 seconds.

☐ If you are not able to walk around the room, mark here and skip the following items.

☐ I have walked around the room for about 30 seconds and I am ready to continue.

	strongly disagree						strongly agree
9. The prosthesis is moving the way I want it to move.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)
10. I am in control of the prosthesis.	(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(1)	(2)	(3)

ANEXO X - VIRTUAL REALITY SICKNESS QUESTIONNAIRE

Sintoma	SSQ			VRSQ	
	Nausea	Oculomotor	Desorientação	Oculomotor	Desorientação
1 Mal-estar generalizado	●	●		●	
2 Cansaço		●		●	
3 Dor de cabeça		●			●
4 Vista cansada		●		●	
5 Dificuldade de manter o foco		●	●	●	
6 Aumento de salivação	●				
7 Sudorese	●				
8 Náusea	●		●		
9 Dificuldade de concentração	●	●			
10 "Cabeça pesada"			●		●
11 Visão embaçada		●	●		●
12 Tontura com olhos abertos			●		
13 Tontura com olhos fechados			●		●
14 Vertigem			●		●
15 Desconforto abdominal	●				
16 Arroto	●				

ANEXO XI - TERMO DE COMPROMISSO DE USO DE DADOS

Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

Eu, **Bibiana Mayer Steckel**, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, no âmbito da pesquisa intitulada **“Efeitos da Realidade Virtual Imersiva em Pacientes Amputados de Membro Inferior”**, comprometo-me com a utilização dos dados obtidos, a fim de obtenção dos objetivos previstos, somente após receber a aprovação do sistema CEP-CONEP.

Comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados nos **prontuários e fichas de coleta específicas para o estudo**, bem como com a privacidade de seus conteúdos.

Esclareço que os dados a serem coletados se referem a **dados clínicos básicos disponíveis em prontuário e respostas aos questionários do estudo fornecida voluntariamente pelo participante da pesquisa**, no período de **01/03/2020 a 30/04/2020**.

Declaro entender que é minha a responsabilidade de cuidar da integridade das informações e de garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas.

Também é minha a responsabilidade de não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, às pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa.

Por fim, comprometo-me com a guarda, cuidado e utilização das informações apenas para cumprimento dos objetivos previstos nesta pesquisa aqui referida. Qualquer outra pesquisa em que eu precise coletar informações serão submetidas a apreciação do CEP/ENSP.

Porto Alegre, 04 de maio de 2021.

Bibiana Mayer Steckel

Assinatura do pesquisador responsável
Prof. Dr. Alcyr Alves de Oliveira

ANEXO XII - TERMO DE ANUÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO LOCAL DE PESQUISA

TERMO DE ANUÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO SETOR OU INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA

Título do projeto de Pesquisa

“Efeitos da Realidade Virtual em Pacientes Amputados de Membro Inferior.”

Eu, **Dr. Patrícia Elisa Funcke**, responsável pelo **Setor de Reabilitação Física do Centro Especializado em Reabilitação II de Encantado/RS**, tenho ciência do protocolo/projeto de pesquisa acima citado, desenvolvido pelo **Prof. Dr. Alcyr Alves de Oliveira** e sua equipe, dos objetivos e metodologia a ser utilizada, concordando com a realização da pesquisa neste local.

Data ____/____/____

Dr. Patrícia Elisa Funcke
Coordenadora do Setor de Reabilitação Física
Centro Especializado em Reabilitação II de Encantado/RS



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
– UFCSPA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DAS REABILITAÇÃO

**A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS
SOBRE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO* DO CÂNCER
DE MAMA**

Porto Alegre

Fevereiro 2019

Graziele Silveira Fardin

A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS
SOBRE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO* DO CÂNCER
DE MAMA

Projeto de Doutorado submetido ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Reabilitação da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre

Orientador: Dra. Alessandra Peres
Co-orientadores (as): Dr. Durvanei Augusto Maria
Dr. José Luis Pedrini

Porto Alegre

2019

A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO* DO CÂNCER DE MAMA

RESUMO

O objetivo deste projeto será de avaliar o impacto da composição corporal e da capacidade funcional de pacientes com câncer de mama na modulação do perfil imunológico e no crescimento *in vitro* de célula tumora. Para isto, serão recrutadas pacientes do sexo feminino, com diagnóstico de câncer de mama com e sem sobrepeso, maiores de 18 anos e que consentirem participar da pesquisa mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Será realizada avaliação antropométrica, aplicação de questionário e colheita de sangue. O sangue coletado será utilizado para imunofenotipagem de células T, avaliação da expressão de marcadores de inibição ou estimulação imunológica e produção de citocinas. Além disso, será realizado um modelo *in vitro* de cultivo de células tumorais expostos ao soro coletado do grupo com câncer de mama e sobrepeso e o grupo eutrófico, para identificação da influência de mediadores séricos alterados pela obesidade no controle/estímulo da proliferação de células tumorais. Este projeto apresenta grande potencial na geração de estudos científicos que possam contribuir de forma significativa para a compreensão do potencial imunorregulador em pacientes com sobrepeso, que possa influenciar no tratamento de alterações inflamatórias induzidas pela obesidade, auxiliando na aplicação de estratégias não farmacológicas tanto no combate da obesidade como no crescimento tumoral.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.2. Epidemiologia	7
1.3. Fatores de risco	8
1.4. Obesidade e câncer	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	13
3. JUSTIFICATIVA	13
3.1. Hipótese	14
4.1. Delineamento da pesquisa	14
4.2. Critérios de inclusão	15
4.3. Critérios de exclusão	15
4.4. Tamanho e cálculo amostral	15
4.5. Descrição das etapas	15
4.6. Riscos	21
4.7. Benefícios	22
4.8. Conduta ética	22
4.9. Descarte de resíduos	22
4.10. Análise estatística	23
4.11. Divulgação de dados e publicação	23
5. CRONOGRAMA GERAL	24
6. CRONOGRAMA METODOLÓGICO	25
7. ORÇAMENTO	26
8. CUSTEIO DO PROJETO	28
9. REFERÊNCIAS	29

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título do Projeto: A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE NOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO* DO CÂNCER DE MAMA.

Palavras-chave:

Local de realização do Projeto: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA e Centro de Pesquisa Médica e Ensaios Clínicos do Hospital Nossa Senhora da Conceição (CPMEC);

1. Recrutamento de pacientes e coleta de dados:

a) Grupo Hospitalar Conceição (GHC) Centro de Pesquisa Médica e Ensaios Clínicos do Hospital Nossa Senhora da Conceição (CPMEC);

2. Análise dos dados e amostras biológicas:

a) Centro de Pesquisa Médica e Ensaios Clínicos do Hospital Nossa Senhora da Conceição (CPMEC);

b) Laboratório de Pesquisa em Imunologia celular e molecular e Unidade Bioanalítica Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Pesquisador responsável: Dra. Alessandra Peres

Vínculo: Prof. Adjunto IV – dedicação exclusiva na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Atuação no projeto: Orientadora.

Equipe envolvida

Nome: Dr. Durvanei Augusto Maria

Vínculo: Pesquisador Científico VI do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Atuação no projeto: Co-orientador

Nome: Dr. José Luiz Pedrini

Vínculo: Serviço de Mastologia Hospital Nossa Senhora da Conceição e Centro de Pesquisas Médicas Clínicas Internacionais – CPMEC.

Atuação no projeto: Co-orientador

Nome: Me. Graziele Silveira Fardin

Vínculo: Aluna de doutorado PPG Ciências da Reabilitação - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisadora

Nome: Me. Gilson Pires Dorneles

Vínculo: Aluno de doutorado do PPG Ciências da Saúde - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisador

Nome: Dr. Tiago Fazolo

Vínculo: Pós doutorando do PPG Ciências da Saúde - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisador

Nome: Dr. Leonardo Karam Teixeira

Vínculo: Pesquisador Adjunto, Programa de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer

Atuação no projeto: Pesquisador

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença de característica heterogênea que se reflete nos seus aspectos morfológicos e moleculares (Seong et al. 2015; Van Schooneveld et al. 2015). Esta neoplasia é uma das mais comuns entre as mulheres e corresponde a segunda causa de morte no mundo (IARC, 2015; Assi et al., 2013). Quando diagnosticado em estágios iniciais, as pacientes possuem uma sobrevida de 83% a 92% relativa aos cinco primeiros anos após o seu diagnóstico (Brewster et al., 2007; Assi et al., 2013; IARC, 2015; Tao et al., 2015).

O câncer de mama tem sido considerado um problema de saúde pública, não apenas em países desenvolvidos, por apresentarem um aumento no número de casos, mas principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, que não acompanha a redução da mortalidade por essa neoplasia (Gebrim, 2012; Hana Azmi, 2013). Diante disso, o estímulo da prevenção, como exames periódicos e controle dos fatores de risco podem ser eficazes para que haja a diminuição da alta taxa de mulheres acometidas pelo câncer (Gebrim, 2012); (Hana Azmi, 2013).

Assim, a mortalidade ocasionada pelo câncer de mama tende decrescer, com o declínio atribuído principalmente a abordagem multidisciplinar referente ao manejo das pacientes, tratamento e a compreensão mais profunda de sua biologia, bem como dos fatores de risco associados (Options, 2010; Senkus, 2013). No entanto, a sua ampla variedade faz com que cada um dos tipos de câncer de mama existentes possua um comportamento biológico e bioquímico especial, causando desordens metabólicas no organismo, que podem influenciar no prognóstico da doença (Senkus, 2013; Harbeck, N; Würstein, 2013; Hana Azmi, 2013).

1.2. Epidemiologia

O câncer de mama é o tipo mais frequente entre as mulheres no mundo e no Brasil, porém as taxas de incidência se modificam ao longo do tempo e da

sua geografia (IARC 2012; Rudel, Ackerman, Attfield, & Brody, 2014; INCA, 2015). Segundo dados da International Agency for Research on Cancer (IARC), as incidências variam de 19,3 a cada 100 mil mulheres na África Oriental e 89,7 por 100.000 mulheres na Europa Ocidental e tem se tornado cada vez mais frequente nos países em desenvolvimento (IARC 2012). Segundo o IARC, a incidência da neoplasia em 2012 foi de 1,6 milhões de novos casos no mundo, com taxa de mortalidade de aproximadamente 13,2 a cada 100.000 pacientes, sendo sua maioria localizada na América do Norte e na Ásia (IARC 2012).

No Brasil, conforme informações fornecidas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) o número estimado de novos casos da doença para 2016 foi de 57.960, com taxa de mortalidade de 14.207 mulheres em 2013 e, apresenta maior prevalência nas regiões Sudeste (30.740), Nordeste (10.490), Sul (10.370) e Centro-Oeste (3.800) (INCA, 2016). Atualmente, o Rio Grande do Sul é o estado da região sul com maior incidência da neoplasia, correspondendo a 87,72 novos casos a cada 100.000 mulheres, inclusive superando a incidência dos tumores de pele não melanoma (INCA, 2016).

A epidemiologia do câncer de mama tem sido intensamente estudada ao longo do tempo, pois sua incidência tem aumentado a cada ano dentro da população feminina (Trichopoulos, Adami, Ekblom, Hsieh, & Lajou, 2008); (Stuckey, 2011).

1.3. Fatores de risco

As alterações no estilo de vida, bem como a adoção de hábitos não saudáveis da população podem ajudar a compreender o aumento de casos de câncer na população mundial (Mohite et al, 2015). Segundo alguns estudos, a mudança relacionada ao estilo de vida das pacientes contribui de forma significativa para o desenvolvimento da neoplasia mamária (Khan et al., 2013; Peeters et al., 2014; Mohite et al., 2015; Ekelund et al., 2015).

Existem alguns fatores de risco que são importantes no processo de desenvolvimento da neoplasia, dentre eles aqueles que estão relacionados à vida reprodutiva da mulher como menarca precoce, primeira gestação com mais de 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e utilização de terapia de reposição hormonal (Khan et al., 2013; Mohite et al., 2015). No

entanto, como fatores de proteção contra o câncer de mama podem-se destacar a multiparidade e amamentação (Opdahl et al., 2011; Anderson et al., 2014).

Os fatores ligados a hereditariedade, estão relacionados principalmente ao parentesco em primeiro grau (mãe ou irmã) que da totalidade de casos da doença, 5 a 10% deles estão ligados a história familiar das pacientes, aumentando do risco de desenvolvimento da doença (Berkey et al., 2012; Goodwin et al., 2015). O câncer de mama também possui fatores relacionados mutações genéticas específicas, como as localizadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e em pacientes obesas a ativação do gene *CYP19A1* que codifica a enzima aromatase e converte a estrona presente no tecido adiposo em estrogênio (Tao et al., 2015; Goodwin et al., 2015; Rebbeck et al., 2015; Crespi, Bottai, and Santarpia 2016). As pacientes que apresentam esses tipos de mutação, em 87% dos casos possuem risco elevado de desenvolvimento da doença (Tao et al., 2015; Goodwin et al., 2015; Rebbeck et al., 2015).

O câncer de mama ainda possui fatores de risco relacionados aos hábitos de vida das pacientes (Khan et al., 2013). Dentre eles estão o tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, obesidade e doenças crônicas (Di Cello et al., 2013; Peeters et al., 2014; Ekelund et al., 2015). Acredita-se que as toxicidades de alguns destes fatores, como o tabaco e o álcool, em conjunto com a ação hormonal possam estar ligadas ao início do processo neoplásico da doença (Trichopoulos et al., 2008; Di Cello et al., 2013; Rudel et al., 2014). Já, a obesidade também é considerada como um fator importante relacionado ao câncer de mama (Khan et al., 2013). Estudos indicam que ela possui relação com os níveis aumentados de estrógeno circulante das pacientes, além de estar ligada a padrões inflamatórios específicos da patologia, assim como em doenças crônicas (Trichopoulos et al., 2008; Di Cello et al., 2013; Rudel et al., 2014; Kolb et al., 2016).

1.4. Obesidade e câncer

Ao longo do tempo, estudos sobre obesidade tem sido propostos para que se possa melhor compreender o processo inflamatório e as alterações imunológicas relacionadas ao câncer (Amir et al., 2012; Kolb et al., 2016). Em uma coorte com mais de 900 mil americanos, foi verificado que a mortalidade em

pacientes obesos com câncer foi maior do que a de não obesos, independentemente da obesidade ser um fator de risco para o tipo de câncer desenvolvido (Calle et al., 2003). Dentre os tipos de câncer associados a maior mortalidade os de esôfago, estômago, colorretal, hepático, de vesícula biliar, pancreático, de próstata, de rim, linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, leucemia, de mama, do endométrio, do colo do útero e de ovário foram mais incidentes nestes indivíduos estudados (Calle et al., 2003).

O estilo de vida sedentário acarreta acúmulo de tecido adiposo pela simples premissa de que o gasto calórico se torna inferior ao consumo energético (Schipper et al., 2012; McLaughlin et al., 2014). O excesso de tecido adiposo é acompanhado por eventos como hipóxia e aumento na infiltração de células imunológicas e no desenvolvimento de um estado de inflamação crônica, caracterizada por um aumento de citocinas inflamatórias (Schipper et al., 2012; McLaughlin et al., 2014). Outras alterações imunológicas como no fenótipo de macrófagos e de Linfócitos T auxiliares para um fenótipo pró-inflamatório, e uma redução na frequência periférica de Linfócitos T reguladores (Tregs), estando associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (Schipper et al. 2012; Wagner et al., 2013). O aumento na concentração de leptina, uma adipocina secretada pelo tecido adiposo, no plasma de indivíduos obesos contribui na supressão de apoptose de células tumorais em modelos *in vitro* (Nepal et al., 2015).

Muitos modelos de cultura de células tumorais vêm sendo estudados, pois quando tratados com soro de indivíduos obesos apresentam maior taxa de proliferação celular apontando que fatores de crescimento em excesso, glicose circulante e insulina podem contribuir para o microambiente tumoral (Rubin, 2013). Estudos *in vitro*, realizados através de simulações de estímulos como hiperinsulinemia e uma grande disponibilidade de ácidos graxos livres, demonstram uma redução na atividade imunossupressora de células Tregs, na produção de IL-10 e na expressão de *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4) em células T (Montes et al., 2013; Fujii et al., 2013). Além disso, estudos em camundongos apontam para um aumento na expressão de proteína de morte tipo-1 (PD-1) na superfície de linfócitos T CD4⁺ de memória no tecido adiposo, sugerindo que a obesidade visceral também está associada a uma imunosenescência precoce (Shirakawa et al., 2016). No entanto, dados em

pacientes obesos humanos ainda são escassos. Gustafson e colaboradores (2017) demonstraram que tanto o excesso de tecido adiposo quanto uma menor capacidade funcional apresentaram uma correlação inversa com a expressão de PD-1+ em linfócitos T CD4+ em indivíduos jovens (Gustafson et al., 2017).

É importante ressaltar que em conjunto com células Tregs, sinalizações co-estimulatórias (como o CD28+) facilitam o desenvolvimento da correta imunovigilância, enquanto que sinais co-inibitórios (incluindo CTLA-4 e PD-1+) inibem a geração de uma resposta inflamatória adequada (Xu et al., 2016). Além disso, o padrão de sinalização co-inibitório é considerado um importante alvo na imunoterapia no tratamento do câncer, como evidenciado por tratamentos clínicos bem-sucedidos utilizando anti-PD-1 ou anti-CTLA-4 anticorpos (Santarpia & Karachaliou et al., 2015). Devido a isso, o microambiente tumoral apresenta alguns mecanismos de desregulação em moléculas co-inibitórias, como o PD-1, permitindo uma redução na imunidade anti-tumoral, fazendo com que haja a evasão da resposta imune ao câncer (Buchbinder e Desai, 2016). Apesar disso, até o presente momento poucos estudos têm abordado a expressão de moléculas de estimulação/inibição imunológica em indivíduos obesos e sua relação com o tecido adiposo e/ou sua capacidade funcional.

O câncer de mama não é considerado um tumor fracamente imunogênico e estudos têm demonstrado a relação entre a reação imunológica com a neoplasia, que possui como característica a associação de infiltrados linfocitários (Dettmer et al., 2013; Gingras et al., 2015; Casbon et al., 2015). A infiltração linfocitária possui importância preditiva na progressão da doença, pois os linfócitos T CD4+ e os T CD8+ são encontrados em grandes quantidades nestes infiltrados causados pelo câncer de mama (Ali et al., 2014; Gingras et al., 2015). As células T CD8+ são componentes específicos da imunidade adaptativa antitumoral e estão ligadas a melhores resultados clínicos e maior sobrevida das pacientes (Tosolini et al., 2011; Ali et al., 2014; Huang et al., 2015). Já as células as T CD4+ estão relacionadas ao pior prognóstico das pacientes, uma vez que este tipo celular é composto por uma junção de todos os subconjuntos Th (células T helper) e agem ativando as atividades imunossupressoras do organismo sendo o equilíbrio dos subconjuntos das células Th (Th1 e Th2) determinante para que haja uma resposta antitumoral eficaz (Tashnizi et al., 2014; Gingras et al., 2015; Huang et al., 2015).

Pesquisas tem demonstrado que a obesidade possui um forte papel na síntese de estrogênio em mulheres na pós-menopausa (Muller et al. 2012; Robinson et al., 2014). O andrógeno de estrogênio (estrone) tem sua conversão realizada no tecido adiposo periférico e quando produzido em grande quantidade é convertido em estradiol pela enzima aromatase (CYP19), codificada pelo gene CYP19A1 (Murray et al., 2015; Crespi, Bottai e Santarpia, 2016). Além da produção do hormônio, a aromatase sinaliza e ativa os receptores de estrogênio ER α presentes na membrana da célula tumoral de mama e, o bloqueio da atividade enzimática impede o desenvolvimento e progressão do câncer de mama hormônio dependente (Murray et al., 2015; Samavat e Kurzer, 2015; Crespi, Bottai e Santarpia, 2016).

A obesidade não está associada somente ao risco de desenvolvimento de câncer de mama estrogênio dependente em pacientes na pós-menopausa (Samavat e Kurzer, 2015). Ela também está associada a outras comorbidades ligadas a progressão do câncer de mama, como resistência à insulina, balanço negativo entre as citocinas liberadas pelo tecido adiposo (adipocinas) e a inflamação crônica (Muller et al., 2012; Robinson et al., 2014).

Devido a estes fatores, o estudo do perfil de pacientes obesas com o câncer de mama possui grande importância para melhor compreender o processo de patogênese e progressão do câncer de mama. Além disso, estratégias adicionais ao tratamento, como a prática de exercício físico inserido na rotina das pacientes, é capaz de proporcionar a diminuição do sobrepeso, contribuindo na redução de biomarcadores como por exemplo, adipocinas, estrogênio, resistência à insulina, proteína C-reativa, células T helper (Th) e a atividade citotóxica das células NK, fazendo com que haja o decréscimo do índice e progressão tumoral, melhora da qualidade de vida, aumento da sobrevida pacientes e diminuição da mortalidade pelo câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto que o sobrepeso/obesidade e o exercício físico agudo exercem na ativação, ou inibição de marcadores imunológicos e na resposta imune de células tumorais de pacientes com câncer de mama.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil antropométrico e nutricional das pacientes com câncer de mama;
- Avaliar o efeito do exercício físico agudo em pacientes eutróficas e pacientes com câncer de mama;
- Avaliar os níveis séricos de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos, glicemia circulante, e insulina das pacientes participantes;
- Avaliar o perfil hormonal (estrogênio e progesterona) e a superexpressão da HER-2 nas pacientes com câncer de mama;
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF alfa e citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF beta em modelo de cultura celular através de sangue periférico estimulado com fitohemaglutinina nas pacientes participantes;
- Avaliar a frequência periférica Linfócitos T CD4+ e CD8+, Células T reguladoras (CD4+CD25+CD127-) e a frequência periférica de CD28+, CD39+, CD73+, PD-1+ e CTLA-4+ em células T CD3+CD4+ e CD3+CD8+;
- Avaliar o efeito *in vitro* do soro coletado de pacientes obesas com câncer de mama sobre a proliferação celular (CFSE), viabilidade celular (MTT) e níveis de estresse oxidativo de linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, T47D e SK-BR-3).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia mundial e um grande problema de saúde pública devido ao desenvolvimento de inúmeras doenças associadas. Sabe-se que a fisiopatologia da obesidade e sua conexão com comorbidades ocorre através de uma condição conhecida como inflamação

subclínica, uma alteração do sistema imunológico que desencadeia a elevação em mediadores inflamatórios sistêmicos e desregulações metabólicas que induzem a doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Schipper et al., 2013).

Ao longo dos anos, a obesidade tem sido amplamente estudada como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Ela não está associada somente ao risco de desenvolvimento de câncer estrogênio dependente (RE positivo) em mulheres na pós-menopausa, mas também a pior prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama, pois está fortemente ligada ao processo de progressão do câncer de mama (Kolb et al., 2016). A progressão tumoral orientada pela obesidade possui relação com o status de estrogênio, resistência à insulina e equilíbrio entre adipocinas, como as citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-6 e fator de necrose tumoral- α 5 (Kolb et al., 2016). Do mesmo modo, a obesidade exerce influência no fenótipo de Linfócitos T e na ação anti-tumoral, como nas células T regs que possuem importantes capacidades imunossupressivas, além da expressão de PD-1 e CTLA-4 em células tumorais (Montes et al., 2013; Fujii et al., 2013). Assim, o presente projeto de pesquisa visa avaliar a influência que a obesidade exerce sobre a ativação/inibição imunológica e processo antitumoral em pacientes com câncer de mama.

3.1. Hipótese

A obesidade influencia de forma negativa e o exercício físico de forma positiva no controle do crescimento tumoral

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento da pesquisa

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo.

4.2. Critérios de inclusão

Serão incluídas nesta pesquisa pacientes do sexo feminino, com idade igual ou superior a 18 anos, atendidas no Centro de Pesquisa Médica e Ensaios Clínicos do Hospital Nossa Senhora da Conceição, tendo como pré-requisitos diagnóstico prévio de câncer de mama e expostas ao fator de risco sobrepeso (IMC entre 25 kg/m² a 39,9 kg/m²). Também serão inclusas pacientes que realizam tratamento para doença e estão em seguimento e, que consentirem participar do estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3. Critérios de exclusão

Ficarão excluídos deste estudo pacientes do sexo masculino, pacientes com idade inferior a 18 anos e que não consentirem participar da pesquisa e que não atendem aos critérios exigidos pela pesquisa.

4.4. Tamanho e cálculo amostral

Foi realizado um cálculo amostral de 375 pacientes com câncer de mama em um período de dois anos de coleta de dados. A amostragem foi calculada com base no número de pacientes atendidas pelo Serviço de Mastologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição. O intervalo de confiança adotado foi de 95% com erro amostral de 5%, de acordo com a literatura de referência (Demark-wahnefried et al., 2012; Suzuki et al., 2013).

4.5. Descrição das etapas

Revisão de prontuários e exames

Serão revisados os prontuários das pacientes para realizar a investigação variáveis referentes a diagnóstico do câncer de mama, perfil tumoral (estadiamento, grau, tamanho, status linfonodal, metástases, perfil imunohistoquímico e subtipo molecular) e tratamento.

Aplicação de TCLE e questionário

No dia da consulta no serviço de mastologia do hospital de referência, de forma adequada e em ambiente restrito, a paciente será apresentada a pesquisa e será convidada a participar da mesma. Após o esclarecimento dos objetivos em estudo e consentimento da participante, será aplicado um questionário contendo perguntas sobre fatores de risco, vida reprodutiva, questões relacionados ao câncer de mama e avaliação nutricional. Neste dia, as participantes que aceitarem em participar do estudo assinarão o TCLE.

Colheita de sangue e avaliação antropométrica

Com consentimento da paciente serão colhidos aproximadamente 20mL de sangue venoso através de punção na veia antecubital das participantes em tubos sem anticoagulante (4mL) ou tubos contendo EDTA (16 mL) por uma profissional devidamente capacitada e autorizada para os procedimentos para realização de procedimentos experimentais. Também serão realizadas avaliações antropométricas como IMC, medida de circunferência abdominal, circunferência braquial, circunferência muscular do braço, e dobras cutâneas para mensuração do nível de adiposidade (dobra cutânea tricipital, abdominal e suprailíaca).

Avaliação da capacidade funcional

As pacientes serão submetidas a avaliações de força de preensão palmar e ao teste de caminhada de seis minutos (TC6M) para avaliação da capacidade funcional. O 6MWT será realizado em uma trilha de 30 m de comprimento com medidas todos os 3 m demarcados no chão conforme descrito anteriormente (Dorneles et al., 2016). Todos os pacientes serão submetidos a 6MWT após a coleta de sangue, para evitar o impacto do exercício agudo no perfil inflamatório. Todos os pacientes receberão estímulos verbais a cada minuto para ajudá-los a completar o teste. Serão monitoradas variáveis como a frequência cardíaca e

saturação de oxigênio periférico (SpO₂) por oximetria de pulso (modelo 1001 Morrya Ipiranga, São Paulo, Brasil) e esforço percebido pelo Escala Borg modificada (dados não mostrados). O 6MWT seguirá as recomendações estabelecidas pela American Thoracic Society / European Respiratory Society (2002) (ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories, 2002; Dorneles et al. 2016). Um dinamômetro calibrado foi utilizado para avaliar força do punho (dinamômetro hidráulico da mão SH5001, SAEHAN Corporation) com valores de resposta em força de quilograma (kgf). As mulheres estavam confortavelmente sentadas em uma cadeira sem braços. O ombro era adutor e girou de forma neutra, com o cotovelo em uma flexão de 90°, e o antebraço e a mão em uma posição neutra. As mulheres foram instruídas a segurar o dinamômetro com força máxima em resposta a um comando de voz e depois de retornar à condição neutra. Três Os ensaios foram realizados de cada lado, alternadamente, com um período de repouso de pelo menos um minuto entre os ensaios da mesma mão. O valor mais alto de cada lado foi usado para representam a força do punho (Schlüssel et al. 2008).

Exercício agudo

Dois subgrupos de pacientes com câncer de mama (eutróficas e obesas) serão convidadas para realização de exercício físico agudo para verificar o potencial imunoregulador. O exercício será realizado com esteira ergométrica e a intensidade do exercício será estabelecida entre 60-70% da frequência cardíaca máxima, calculada pela fórmula proposta por Karvonen et al., 11 ou intensidade entre 13 e 14 pontos na Escala de Percepção Subjetiva de Esforço (PSE) de Borg. A frequência cardíaca será medida com o auxílio de um monitor Polar FT7™ (Polar, Suécia). As intervenções serão executadas pelo mesmo pesquisador. Os testes de esforço e exercício físico serão realizados no Laboratório de Fisioterapia, localizado na sala 703 do Prédio Anexo II do Campus da UFCSPA e as coletas sanguíneas no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA.

Processamento de amostras de sangue e armazenamento

Os tubos sem anticoagulantes serão centrifugados por 10 minutos em uma rotação de 4000 rpm para obtenção do soro, ao qual serão aliquotados e congelados a -80°C para posteriores análises. Já, os tubos sem anticoagulantes serão centrifugados por 10 minutos em uma rotação de 4000 rpm para obtenção do soro, que também serão aliquotados e congelados a -80°C para posteriores análises. O sangue coletado em tubos contendo EDTA (aproximadamente 16 mL) será utilizado para obtenção de células mononucleares periféricas através do gradiente de concentração utilizando-se Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, EUA) conforme descrito por Bicalho et al (1981). O sangue será diluído em uma solução fosfato-salina (PBS 1x) e sobreposto em camadas sobre 3 mL de Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, EUA). As amostras serão então centrifugadas a 1500 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, células mononucleares periféricas serão coletadas por aspiração e lavadas duas vezes, primeiro com PBS 1x e em seguida com meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. A viabilidade celular deverá ser de $>98\%$ determinada pela contagem em câmara de Neubauer com azul trypan e o volume celular será ajustado de acordo com as necessidades para imunofenotipagem (1×10^7 células/mL) e estimulação celular para secreção de citocinas (1.5×10^5 células/mL).

Determinação do perfil metabólico

As concentrações de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos e glicose serão determinadas através de kits específicos (BioClin, Brasil) em um aparelho bioquímico automatizado BS120 (BioClin, Brasil), seguindo as recomendações dos fabricantes e com calibradores e controles apropriados. Níveis de insulina serão determinados através do método Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Gênese, Brasil). Os níveis séricos de cortisol serão avaliados através do método de ELISA (Accubind, EUA).

Imunofenotipagem

Aproximadamente 1×10^6 células/mL serão marcadas com uma das seguintes misturas de anticorpos monoclonais: 1) CD3+PE + CD4+ FITC; 2) CD3+PE + CD8FITC; 3) CD4 FITC + CD25 PE + CD127+ PercP-Cyanine5.5; 4) CD4 FITC + CD279 (PD-1+) PE+; 5) CD8+ FITC + CD279 (PD-1+); 6) CD4+FITC + CD152+ (CTLA-4) PE; 7) CD8+FITC + CD152+ (CTLA-4) 8) CD4+ FITC+ CD39+ PE; 9) CD4+ FITC CD73+ PE em um procedimento de detecção de três cores por imunofluorescência direta. Células serão incubadas com 5 µL de anticorpo em tubos específicos por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células serão re-suspendidas em 0,5 mL de PBS 1x e analisadas através de citometria de fluxo. Os dados de imunofenotipagem serão adquiridos utilizando CELLquest Pro Software (BD Bioscience, San Jose, USA) em um citômetro de fluxo FACSCalibur. Para isso, Foward-Scatter (FSC) versus Side-Scatter (SSC) será utilizado para identificação da região de linfócitos baseado em seu tamanho e granulosidade, sendo adquiridos 50.000 eventos dentro da região de linfócitos por análise. Em seguida, gráficos de distribuição pontual para combinação dos fluorocromos serão utilizados para quantificar a frequência das células. O fenótipo de Linfócitos T Reguladores será identificado através da quantificação de células CD4+CD25+CD127- conforme descrito por Liu e colaboradores (2006), que identificaram uma correlação inversa entre a expressão de CD127 na superfície celular de células T e a expressão intracelular de FoxP3.

Cultura de células mononucleares periféricas

Para analisar a influência do treinamento físico na produção de citocinas por células mononucleares, aproximadamente 1.5×10^5 células/mL serão isoladas conforme procedimento descrito anteriormente e incubadas em meio completo RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino estimuladas ou não com 3%/mL fitohemaglutinina (GIBCO, EUA) OU 1 ng/mL de LPS (Sigma, EUA), em placas de 24 poços, com volume final de cultura ajustado para 1000 µL/poço, com RPMI-1640 completo. As culturas serão mantidas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após esse período de incubação, a placas serão centrifugadas a 2000 rpm por 8 minutos e o sobrenadante

aliquotado e congelado a -80°C para a determinação da produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunoreguladoras.

Avaliação do crescimento de células tumorais

Células das linhagens MCF-7, MDA-MB-231, T47D e SK-BR-3 (câncer de mama) serão colocadas em cultura com meios DMEM Low glicose Sigma D5523, DMEM High glicose Sigma D7777 e RPMI1640 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Será realizada contagem de células utilizando azul de tripan para verificar o crescimento exponencial. Para os experimentos, as células MCF-7, MDA-MB-231, T47D e SK-BR-3 serão semeadas em placas de 96 poços contendo 5×10^4 células/poço e 5×10^5 . As culturas em estágio de semi-confluência serão tratadas por 24, 48 e 72 h com meios DMEM Low glicose Sigma D5523, DMEM High glicose Sigma D7777 e RPMI1640 contendo 50% de soro de indivíduos eutróficos e obesos (amostras coletadas antes e após o protocolo de exercício agudo, conforme descrito acima). As células tumorais expostas aos meios DMEM Low glicose Sigma D5523, DMEM High glicose Sigma D7777 e RPMI1640 com 10% SFB serão utilizadas como controle do experimento. Os sobrenadantes serão coletados após 24, 48 e 72 h de incubação e refrigerados a -80°C até a realização dos experimentos.

Avaliação da viabilidade celular de células tumorais

A viabilidade das células após o tratamento será avaliada por determinação da redução de MTT solúvel [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-diphenyltetrazolium brometo] a cristais de formazan. Após 24, 48 ou 72 h, o tratamento será retirado e será adicionado 100 μL de uma solução de MTT (0.5 mg/mL). Por fim, as células serão incubadas durante 1 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . O precipitado formado será eluído com 50 μL de DMSO e os valores da absorbância serão determinados a 492 nm em leitor de microplacas.

Avaliação de proliferação de células tumorais

Células MCF-7, MDA-MB-231, T47D e SK-BR-3 serão semeadas e tratadas com soro dos indivíduos conforme descrito acima. Ao final do tratamento, as células serão marcadas com CFSE. Elas serão ressuspensas em PBS 1x, seguido de adição de CFSE na concentração ideal para cada tipo celular, com incubação por 15' a 37°C e centrifugação por 5' a 900 Rpm. Após este processo será adicionado 1 volume de meio fresco (DMEM + 10% SFB). As células serão pelletadas e ressuspensas em meio fresco e incubadas por 30' a 37°C. O procedimento de pelotar será repetido e as células ressuspensas em meio fresco para plaqueamento. No tempo zero, será separada uma alíquota de células marcadas que serão estocadas a 4°C para serem utilizadas como controle de marcação ("ciclo zero") a cada ponto de leitura no FACS. As células não marcadas com CFSE poderão usadas como banco da marcação.

Avaliação da migração de células tumorais

MCF-7, MDA-MB-231, T47D e SK-BR-3 serão semeadas em placa de 24 poços (1×10^4 células/poço) até a confluência total (80-90%). Posteriormente, o meio de cultura dos poços será descartado, e uma ferida será realizada na monocamada celular, utilizando uma ponteira, os poços serão lavados com solução tampão PBS e então irá ser feita a aplicação do tratamento com os soros pré e pós-exercício e das demais pacientes coletadas no ambulatório (50%). O fechamento da fenda será acompanhado por meio da captura de imagens em microscópio óptico invertido nos tempos 0, 6, 12 e 24 h. As imagens serão analisadas utilizando o software ImageJ. Também serão avaliados biomarcadores de apoptose e metástases, viabilidade por iodeto e mensuração de espécies reativas de oxigênio.

4.6. Riscos

Os riscos associados a esta pesquisa são mínimos. No entanto, destaca-se a coleta de sangue, onde poderá haver dor ou desconforto decorrente da punção venosa e complicações rotineiras como deslocamento da agulha,

extravasamento de sangue, podendo ocasionar algum desconforto e hematomas, que desaparecerão em alguns dias.

4.7. Benefícios

A partir do recebimento de seus resultados, as pacientes terão conhecimento do seu perfil inflamatório, bem como dos fatores que podem melhorar esta condição e contribuir para manutenção e melhora da qualidade de vida.

4.8. Conduta ética

Este projeto de pesquisa atende a Resolução 466/12, e será encaminhado para avaliação através da Plataforma Brasil para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e do Grupo Hospitalar Conceição. Após aprovação, será realizado o recrutamento da amostra e, aqueles que estiverem de acordo com os critérios de inclusão serão orientados a assinarem o TCLE, autorizando a sua participação no estudo.

A participação no estudo é voluntária, sendo assim, caso o participante decida não participar, isto não impactará no tratamento normal que cada um tem direito. Ninguém terá custo e nem receberá por participar da pesquisa. A qualquer momento o voluntário poderá desistir e retirar seu consentimento, sem acarretar prejuízo algum em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. As identidades dos voluntários não serão reveladas, mantendo sigilo adequado ao comportamento científico. O presente estudo está baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a pesquisa em saúde, do Conselho Nacional em Saúde (Resolução 466/2012).

4.9. Descarte de resíduos

Os resíduos das amostras biológicas serão descartados conforme descrito na Resolução RDC nº 306 de 7 de dezembro de 2004, que descreve o

Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

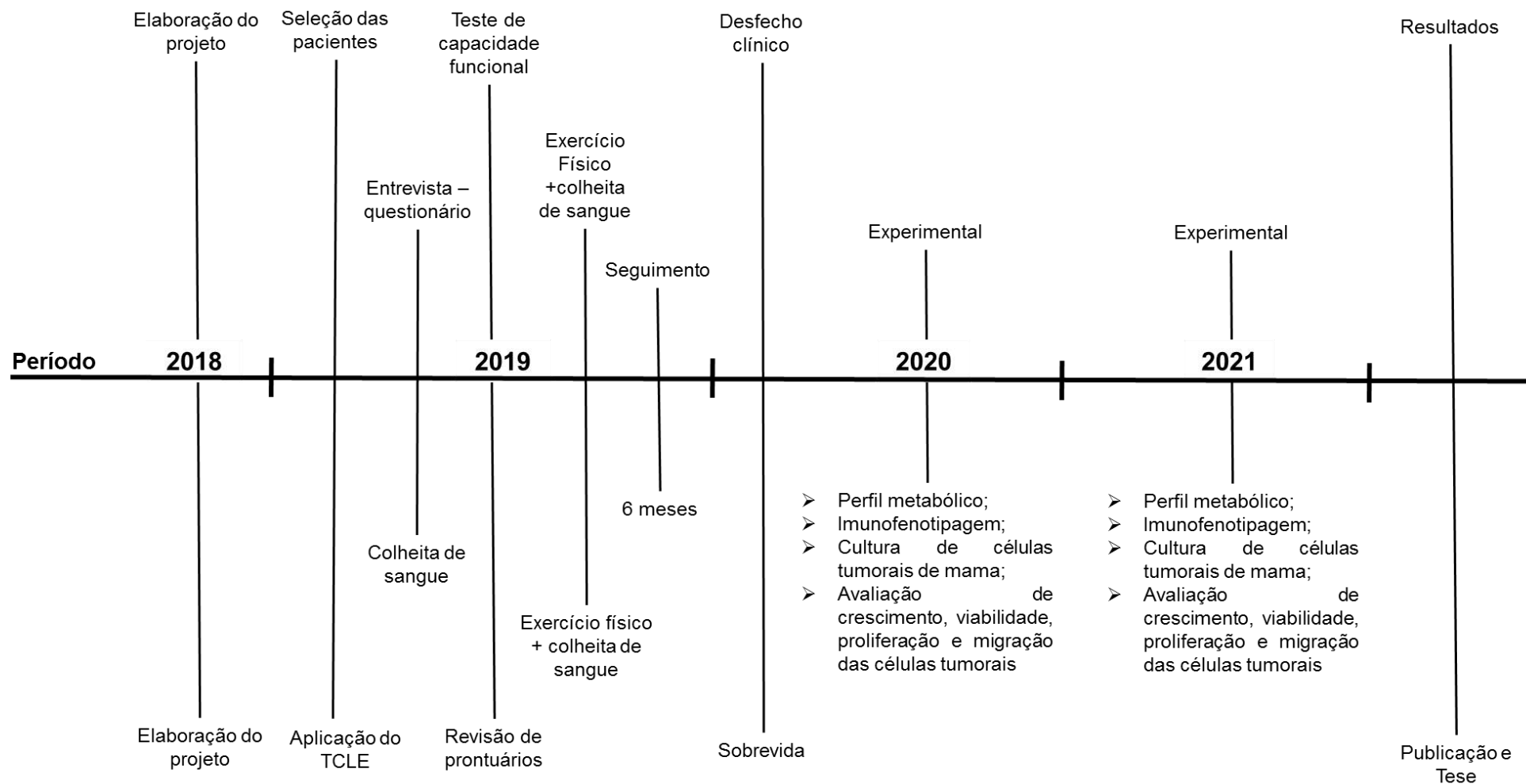
4.10. Análise estatística

Os dados serão tabulados e normalidade será testada pelo teste de Kolgomorov-Smirnov, cujo os dados serão apresentados através de média $\pm$ desvio padrão. As correlações entre os resultados obtidos serão testadas através do coeficiente de correlação de Pearson. Um nível de significância de $p < 0,05$ será adotado e o programa SPSS 21.0 será utilizado em todos os testes.

4.11. Divulgação de dados e publicação

O trabalho será apresentado à banca examinadora da Dissertação de Doutorado e submetido à publicação em revistas científicas com assuntos de interesse relacionados à pesquisa. Também, haverá a emissão e o envio de um relatório final dos resultados obtidos as instituições envolvidas, assim como um exemplar da pesquisa concluída ao centro de documentação, dos mesmos locais, para consulta de interessados.

6. CRONOGRAMA METODOLÓGICO



7. ORÇAMENTO

Descrição do material	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
ABTS Sigma	1	343,00	343,00
Albumina Sérica Bovina Sigma 10g	1	336,00	336,00
Aminoácidos não essenciais	2	70	140,00
Bicarbonato de Potássio PA ACS 500g	1	106	106,00
Bicarbonato de Sódio PA 1kg	1	30	30,00
Citrato de Sódio	1	100,00	100,00
Cloreto de Amonio	1	120,00	120,00
Cloreto de Potássio	1	80,00	80,00
DMSO	1	264,00	264,00
Dodecil Sulfato de Sódio	1	130,00	130,00
EDTA	1	50,00	50,00
Ficoll Histopaque-1077	2	595,00	1190,00
Fitohemaglutinina GIBCO	1	250,00	250,00
Fosfato de Potásio Bibásico 500g	1	85,00	85,00
Fosfato de Sódio Bibásico 500g	1	125,00	125,00
HEPES 100g	3	170,00	510,00
L-glutamina 200mM Sigma	2	137,00	137,00
MTT (Brometo tiazolil azul de tetrazólio) (Sigma)	1	388,00	388,00
Paraformol 500g	1	110,00	110,00
Penicilina G Sódio 10MU	1	151,00	151,00
Piruvato de sódio 25g	1	160,00	160,00

RPML-1640 Sigma (10x1L)	1	190,00	190,00
Soro Fetal Bovino (Sigma)	3	300,00	900,00
Streptomicina Sulfato 25g	1	151,00	151,00
Tris 100g	1	150,00	150,00
Tween-20 250mL	1	164,00	164,00
Vitaminas (Solução MEM vitaminas 100x)	2	112,00	224,00
Anticorpos para citometria de fluxo			
Anti-CD4+ Fitc 100tests (Ebioscience)	1	817,5	817,5
Anti-CD8+ Fitc 100tests (Ebioscience)	1	1042,5	1042,5
Anti-CD25+ Pe 100tests (Ebioscience)	1	1897,5	1897,5
Anti-CD127+ Percp- Cy5.5. 100tests (Ebioscience)	1	1867	1867
Anti-CD28 Pe 100 tests (Ebioscience)	1	930,00	930,00
Anti-CD39+ Pe 100tests (Ebioscience)	1	930,00	930,00
Anti-CD73+ Pe 100tests (Ebioscience)	1	1132,5	1132,5
Anti-CD152 Pe 100tests (Ebioscience)	1	1222,5	1222,5
Anti-CD279 Pe 100tests (Ebioscience)	1	1222,5	1222,5
Kits Citocinas			
Human IL-6 10 plates Kit Peprtech	1	1600,00	1600,00
Human IL-10 10 plates Kit Peprtech	1	1600,00	1600,00

Human TNF-a 10 plates Kit Peprtech	1	1600,00	1600,00
Human TGF-beta 10 plates Kit Ebioscience	1	3000,00	3000,00
Análises Bioquímicas			
Kit Perfil Lipídico (Triglicerídeos, Colesterol Total, HDL, LDL) BioClin	1	800,00	800,00
Insulina Human ELISA	1	1300,00	1300,00
Cortisol EIA	2	800	1600,00
Total			29.146,00

8. Custeio do projeto

Parte do material descrito no orçamento já foi adquirido pelo Laboratório de Imunologia Celular e Molecular e pelos pesquisadores envolvidos no estudo. Para os demais materiais que forem necessários, o projeto será financiado através de financiamento próprio e recursos provenientes da produção de simpósios, workshops e minicursos ministrados pela própria equipe. Além disso o projeto poderá ser submetido a editais de órgãos de fomento para financiamento de pesquisas.

9. REFERÊNCIAS

- Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M. Caldas, C. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Annals of Oncology*, 25(8), 1536–1543, 2014.
- American College of Sports Medicine. ACSM's Resource Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription. LWW, 7a edição. 2013.
- Amir, E., Cecchini, R. S., Ganz, P. A., Costantino, J. P., Beddows, S., Hood, N., Goodwin, P. J. 25-Hydroxy vitamin-D, obesity, and associated variables as predictors of breast cancer risk and tamoxifen benefit in NSABP-P1. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133(3), 1077–1088, 2012.
- Anderson, K. N., Schwab, R. B., Martinez, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes : a review of the literature, 1–10, 2014.
- Assi, H. a, Khoury, K. E., Dbouk, H., Khalil, L. E., Mouhieddine, T. H., El Saghir, N. S. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Journal of Thoracic Disease*, 5 Suppl 1, S2-8, 2013.
- ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories, 2002. ATS Statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (1), 111–117.
- Berkey, C. S., Tamimi, R. M., Rosner, B., Frazier, A. L. Young Women With Family History of Breast Cancer and Their Risk Factors for Benign Breast Disease, 2796–2803, 2012.
- Brewster, A. M., Do, K.-A., Thompson, P. a, Hahn, K. M., Sahin, A. a, Cao, Y. Bondy, M. L. et al. Relationship between epidemiologic risk factors and breast cancer recurrence. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(28), 4438–4444, 2007.
- Bigley AB, Rezvani K, Chew C, et al. Acute exercise preferentially redeploys NK-cells with a highly-differentiated phenotype and augments cytotoxicity against lymphoma and multiple myeloma target cells. *Brain Behav Immun.* 2014;39:160.

Borg, G. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc.*;14: 377-381, 1982.

Buchbinder EI, Anupam D. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J of Clin Oncology*; 39: 98-106, 2016.

Calle EE, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 17, p. 1625-1638, 2003.

Casbon, A.-J., Reynaud, D., Park, C., Khuc, E., Gan, D. D., Schepers, K., Werb, Z. et al. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), E566-75, 2015.

Castelli, T. M., Machado, J., Basso, T. Perfil nutricional de mulheres com câncer de mama em tratamento radioterápico em um hospital do Norte do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Nutr Clin*, 30(4), 276–279, 2015.

Colato A, et al. Effects of concurrent training on inflammatory markers and expression of CD4, CD8, and HLA-DR in overweight and obese adults. *J of Exerc Sci and Fitness* 2014; 12: 55-61.

Colato A, et al. Impact of aerobic water running training on peripheral immune-endocrine markers of overweight-obese women. *Science & Sports* 2017; 32: 46-53.

Cortez-Espinosa N et al. CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol* 2015; 76: 622-630.

Crespi, Elisa, Giulia Bottai, and Libero Santarpia. 2016. "Role of Inflammation in Obesity-Related Breast Cancer." *Current Opinion in Pharmacology* 31: 114–22.

Demark-wahnefried, W., Campbell, K. L., Hayes, S. C. Weight Management and Its Role in Breast Cancer Rehabilitation *, 2277–2287, 2012.

Suzuki, S., Kojima, M., Tokudome, S., Mori, M., Sakauchi, F., Wakai, K., Tamakoshi, K. Obesity / Weight Gain and Breast Cancer Risk : Findings From

the Japan Collaborative Cohort Study for the Evaluation of Cancer Risk, 23(2), 139–145, 2013.

Dethlefsen C, et al. Exercise regulates breast cancer cell viability: systemic training adaptations versus acute exercise responses. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 159: 469-479.

Dettmer, K., Vogl, F. C., Ritter, A. P., Zhu, W., Nürnberger, N., Kreutz, M., Gottfried, E. et al. Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells. *Electrophoresis*, 34(19), 2836–2847, 2013.

Di Cello, F., Flowers, V. L., Li, H., Vecchio-Pagán, B., Gordon, B., Harbom, K., Zahnow, C. A. et al. Cigarette smoke induces epithelial to mesenchymal transition and increases the metastatic ability of breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 12, 90, 2013.

Dorneles GP, et al. Acute response of peripheral CCR5 chemoreceptor and NK cells in individuals submitted to a single session of low-intensity strength exercise with blood flow restriction. *Clin Physiol Funct Imaging* 2016a; 36: 311-317.

Dorneles GP, et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. *Cytokine* 2016; 77: 1-9.

Ekelund, U., Ward, H. a, Norat, T., Luan, J., May, A. M., Weiderpass, E., Riboli, E. Physical activity and all-cause mortality across levels of overall and abdominal adiposity in European men and women : the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study (EPIC) 1 – 6 The EPIC cohort, 1–6, 2015.

Fujii M, et al. CTLA-4Ig immunotherapy of obesity-induced insulin resistance by manipulation of macrophage polarization in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 438: 103-109.

Gebrim, L. *Mastologia de Consultório*. São Paulo: Atheneu, 2012.

Ghiringhelli F, et al. Production of Adenosine by Ectonucleotidases: A Key Factor in Tumor Immunoescape. *J of Biomed and Biotech* 2012; 2012: 473712.

Gingras, I., Azim, H. A., Ignatiadis, M., C. Sotiriou. Immunology and breast cancer: Toward a new way of understanding breast cancer and developing novel

therapeutic strategies. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 13(6), 372–382, 2015.

Gleeson M, et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 607-615.

Gustafson MP, et al. A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood. *Journal of Immunotherapy* 2017; 5: 30.

Guzman-Flores JM, et al. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology* 2015; 220: 976-984.

Goodwin, P. J., Margaret, P., Goodwin, P. J., Phillips, K., West, D. W., Ennis, M., Longacre, T. A. et al. Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 2015.

Hana Azmi. Investigating epimiology and cancer prevalence (breast cancer) in GhotbAbad city. *Advances in Environmental Biology*, 30–32, 2013.

Harbeck, N; Würstein, R. Systematic therapy for inoperable locally advanced breast cancer: optimal strategies and therapies. *The Breast*, 22(19–63), 2013.

Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Peng, G. et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*, 6(19), 17462–78, 2015.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Retrieved from: <http://www.iarc.fr/>, 2015.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Tipos de Câncer - MAMA. Retrieved from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama+, 2017.

Khan, S., Shukla, S., Sinha, S., Meeran, S. M. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: Therapeutic targets. *Cytokine and Growth*

Factor Reviews, 24(6), 503–513, 2013.

Kolb, R., Phan, L., Borchering, N., Liu, Y., Yuan, F., Janowski, A. M., Zhang, W. et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nature Communications*, 7, 13007, 2016.

Kruger K, et al. Apoptosis of T-Cell Subsets after Acute High-Intensity Interval Exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2016; 48: 2021-2029.

Kurgan N, et al. Inhibition of Human Lung Cancer Cell Proliferation and Survival by Post-Exercise Serum Is Associated with the Inhibition of Akt, mTOR, p70 S6K, and Erk1/2. *Cancers (Basel)* 2017; 9.

Kushi, L. H.; Doyle C.; McCullough M.; Rock CL.; Demark-Wahnefried W.; et al. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 56, n. 5, p. 254-281, 2006

Lavratti C, et al. Exercise-induced modulation of histone H4 acetylation status and cytokines levels in patients with schizophrenia. *Physiol Behav* 2017; 168: 84-90.

Liu W, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*; 203: 1701-1711, 2006.

Martins CC, et al. Exercise Training positively modulates the Ectonucleotidase Enzymes in Lymphocytes of Metabolic Syndrome Patients. *Int J Sports Med* 2016; 37: 930-936.

McLaughlin T, et al. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2637-2643.

Medeiros N da S, et al. Effects of concurrent training on oxidative stress and insulin resistance in obese individuals. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 697181.

Mohite, V., Pratinidhi, A., Mohite, R. Reproductive risk factors and Breast cancer: a case control study from rural India. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 14(3), 258–264. 2015.

Momesso dos Santos CM, et al. Effect of regular circus physical exercises on lymphocytes in overweight children. *PLoS One* 2015; 10:e0120262.

Montes VN, et al. T cell activation inhibitors reduce CD8⁺ T cell and pro-inflammatory macrophage accumulation in adipose tissue of obese mice. *PLoS One* 2013; 8:e67709.

Muller, D. C., Baglietto, L., Manning, J. T., Mclean, C., Hopper, J. L., Giles, G. G. e Severi, G. Second to fourth digit ratio (2D : 4D), breast cancer risk factors , and breast cancer risk : a prospective cohort study, 107(9), 1631–1636, 2012.

Murray, Jill I., Nathan R. West, Leigh C. Murphy, and Peter H. Watson. 2015. “Intratumoural Inflammation and Endocrine Resistance in Breast Cancer.” *Endocrine-Related Cancer* 22 (1): R51–67.

Nepal S, et al. Autophagy induction by leptin contributes to suppression of apoptosis in cancer cells and xenograft model: involvement of p53/FoxO3A axis. *Oncotarget* 2015; 6:7166-7181.

Oliveira M, Gleeson M. The influence of prolonged cycling on monocyte Toll-like receptor 2 and 4 expression in healthy men. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109: 251-257.

Opdahl, S., Alsaker, M. D. K., Janszky, I., Romundstad, P. R., Vatten, L. J. Joint effects of nulliparity and other breast cancer risk factors. *British Journal of Cancer*, 105(5), 731–736, 2011.

Options, M. Triple-Negative Breast Cancer, 70(17), 2247–2258, 2011.

Pandolfi J, et al. Purinergic signaling modulates human visceral adipose inflammatory responses: implications in metabolically unhealthy obesity. *J Leukoc Biol* 2015; 97: 941-949.

Pandolfi JB, et al. ATP-Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity. *J Immunol* 2016; 196: 3287-3296.

Peeters, G. M. E. E., Mishra, G. D., Dobson, A. J. e Brown, W. J. Health Care Costs Associated with Prolonged Sitting and Inactivity. *American Journal of Preventive Medicine*, 46(3), 265–272, 2014.

Previato, H. D. R. de A., Mendes, M. C. S., Pena, G. das G., Maria, Y. C. de P., Volp, A. C. P., Freitas, R. N. de. Caracterização sociodemográfica , nutricional e dietética de mulheres com câncer de mama atendidas em hospital público de Minas Gerais of women with breast cancer treated at a public hospital in. *Nutrire*, 40(2), 120–128, 2015.

Rebbeck, T. R., Mitra, N., Wan, F., Sinilnikova, O. M., Healey, S., McGuffog, L., Consortium, C et al. Association of Type and Location of, 6021(13), 1347–1361, 2015.

Robinson, P. J., Bell, R. J. e Davis, S. R. Obesity is associated with a poorer prognosis in women with hormone receptor positive breast cancer. *Maturitas*, 79(3), 279–286, 2014.

Rubin H. Promotion and selection by serum growth factors drive field cancerization, which is anticipated in vivo by type 2 diabetes and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 13927-13931.

Rudel, R. a, Ackerman, J. M., Attfield, K. R. e Brody, J. G. New Exposure Biomarkers as Tools For Breast Cancer Epidemiology, Biomonitoring, and Prevention: A Systematic Approach Based on Animal Evidence. *Environmental Health Perspectives*, 122(9), 881–895, 2014.

Rundqvist H, et al. Effect of acute exercise on prostate cancer cell growth. *PloS one*, v. 8, n. 7, p. e67579, 2013.

Samavat, H., Kurzer, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, 356(2), 231–243, 2015.

Santarpia M & Karachaliou N. Tumor immune microenvironment characterization and response to anti-PD-1 therapy. *Cancer Biology & Medicine* 2015; 12: 74-78.

Senkus, E. Locally Advanced Breast Cancer – Epidemiology and Geographic Differences. *The Breast*, 22(2013), S21, 2013.

Seong, M.-K., Lee, J.-Y., Byeon, J., Sohn, Y.-J., Seol, H., Lee, J.-K., Noh, W. C. et al. Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(1), 141–148, 2015.

Schipper, HS et al. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23:407-415.

Shirakawa K, et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest* 2016; 126: 4626-4639.

Schlüssel MM, dos Anjos LA, de Vasconcellos MT, Kac G. Reference values of handgrip dynamometry of healthy adults: a populationbased study. *Clin Nutr*. 2008;27(4):601-7.

Stuckey, A. Breast cancer: epidemiology and risk factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(1), 96–102, 2011.

Sung, M. K., Yeon, J. Y., Park, S. Y., Park, J. H. Y., Choi, M. S. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229(1), 61–68, 2011.

Suzuki, S., Kojima, M., Tokudome, S., Mori, M., Sakauchi, F., Wakai, K., Tamakoshi, K. Obesity / Weight Gain and Breast Cancer Risk : Findings From the Japan Collaborative Cohort Study for the Evaluation of Cancer Risk, 23(2), 139–145, 2013.

Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., Zhao, J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 333–338, 2015.

Tashnizi, A. H., Habibagahi, M., Majidi, J. Th1 and Th2 Cytokine Gene Expression in the Peripheral Blood of Breast Cancer, 5(July), 119–127, 2014.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Galon, J. et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*, 71(4), 1263–1271, 2011.

Trichopoulos, D., Adami, H.-O., Ekblom, A., Hsieh, C.-C., Laggiou, P. Early life events and conditions and breast cancer risk: From epidemiology to etiology. *International Journal of Cancer*, 122(3), 481–485, 2008.

Ulven SM, et al. An acute bout of exercise modulate the inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells in healthy young men. *Arch of Physiol and Biochem* 2015; 121: 41-49.

Van Schooneveld, E., Wildiers, H., Vergote, I., Vermeulen, P. B., Dirix, L. Y., Van Laere, S. J. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1–15, 2015.

Xu Z, et al. Comprehensive molecular profiling of the B7 family of immune-regulatory ligands in breast cancer. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1207841.

Wagner NM, et al. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21: 461-468.

Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, et al. Position Statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6–63.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

Tayani Palma Cohen

AVALIAÇÃO DA DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA EM PRATICANTES DE CROSSFIT

Projeto de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Cláudia Dornelles Schneider

Co-orientador: Ramiro Barcos Nunes

Porto Alegre, 2022

Tayani Palma Cohen

AVALIAÇÃO DA DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA EM PRATICANTES DE CROSSFIT

Projeto de Pesquisa de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Reabilitação da Universidade Federal
de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Orientador: Prof. Cláudia Dornelles Schneider

Co-orientador: Ramiro Barcos Nunes

Porto Alegre, 2022

SUMÁRIO

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
CROSSFIT.....	Erro! Indicador não definido.
DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA.....	Erro! Indicador não definido.
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 OBJETIVO GERAL.....	11
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	12
4.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA	12
4.3. CÁLCULO AMOSTRAL	12
4.4. COLETA DE DADOS	12
4.4.1. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR	13
4.4.2. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL	14
4.4.3. ROTINA DE TREINAMENTO	15
4.4.4. DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA	16
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
4.6 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	16
5. MEDIDAS SANITÁRIAS	17
6. RECURSOS HUMANOS.....	18
7. CRONOGRAMA.....	19
8. ORÇAMENTO.....	20
9. REFERÊNCIAS	21
ANEXO I – CARTAZ DE DIVULGAÇÃO	28
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	29

RESUMO

O CrossFit (CF) é caracterizado como um regime de treinamento de alta intensidade que combina exercícios de força e resistência cardiovascular, e requer uma ingestão de energia e carboidratos compatíveis com sua demanda energética. Considerando que no *site* oficial CrossFit é indicada uma dieta com restrição de carboidratos e que o número de praticantes vem crescendo nos últimos anos, é importante avaliar a disponibilidade energética desses praticantes. **Objetivo:** Avaliar a disponibilidade energética de praticantes de CrossFit. **Métodos:** A amostra será composta por 47 homens e mulheres maiores de 18 anos, praticantes de CF há pelo menos 3 meses em academias da cidade de Porto Alegre, autodeclarados saudáveis, com periodicidade mínima de treino de 3x/semana. Todos os praticantes que concordarem em participar do estudo assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão avaliados a ingestão alimentar (kcal, registro alimentar de 3 dias), a massa corporal magra (MM) (kg MM, bioimpedância e dobras cutâneas), e o gasto energético com exercício (kcal, planilha de treino semanal). A disponibilidade energética será calculada como a diferença entre a ingestão de energia (kcal) e o gasto energético com exercício físico (kcal) dividido pela massa corporal magra (kg MM). Serão classificados como baixa disponibilidade energética aqueles praticantes que se encontram abaixo de 30,0 Kcal/Kg MM.

Palavras-chave: consumo alimentar, gasto energético, massa corporal magra

1. INTRODUÇÃO

O CrossFit (CF) é caracterizado como um regime de treinamento de alta intensidade com movimentos constantemente variados e metodologia empírica (Meyer et al., 2017). O CF geralmente é praticado em alta intensidade com pouco ou nenhum descanso entre as sessões, que combinam exercícios de força e resistência cardiovascular como corrida, ciclismo, remo, levantamento de peso olímpico, movimentos com o peso corporal e movimentos ginásticos (Glassman, 2007; Kozub, 2013; Sibley, 2012). Considerando esse cenário, pode ocorrer fadiga precoce e maior percepção de cansaço. Além disso, caso a progressão de carga seja inadequada, somada à alta demanda de treinamento, o CF pode aumentar o risco para lesões, *overreaching* e *overtraining* (Meyer et al., 2017).

Desde 2013, o número de afiliados do CF mais que dobrou, passando de 5.000 para 13.000, com bem mais do que 300.000 praticantes ao redor do mundo, sendo reconhecido como uma grande e crescente modalidade na comunidade *fitness* (Maxwell et al., 2017). O CF se tornou popular por ser uma atividade extremamente dinâmica, bem como pela socialização, aumento de aptidão física, aumento de força muscular e redução de gordura corporal (Dawson, 2017; Schubert & Palumbo, 2019) e, em vista disso, é comum que os praticantes busquem por maximizar seu desempenho esportivo através de acompanhamento e estratégias nutricionais. Ao contrário de outras modalidades de treino, o CF transforma o condicionamento físico em um esporte competitivo, um conceito novo em relação a condicionamento físico (Sibley, 2012).

Considerando a alta intensidade do CF (Butcher et al., 2015), a ingestão adequada de carboidratos (CHO) é essencial para manter os estoques de glicogênio, no entanto, estudos relatam que, comumente, os praticantes de CF fazem dietas com baixos níveis de CHO e, até mesmo, dieta cetogênica (Escobar et al., 2016; Kephart et al., 2018; Miele et al., 2018). Isto pode ser parcialmente explicado, pois, conforme orientações do site oficial do CF, é recomendada uma dieta paleolítica, caracterizada pelo consumo de carnes e vegetais, nozes e sementes, algumas frutas, pouco amido e sem açúcar. Entretanto, mesmo que tenhamos embasamento científico suficiente em relação ao consumo de macronutrientes, micronutrientes e suplementos nutricionais para melhorar o desempenho na maioria dos tipos de esporte (Maughan et al., 2018; Nutrition and Athletic Performance, 2016; Peeling et al., 2018; Rothschild & Bishop, 2020), essas orientações para o CF ainda parecem intuitivas. Em relação à suplementação, há evidências mostrando que a suplementação de bicarbonato de sódio parece melhorar o desempenho esportivo em praticantes de CF. Estudos realizados com cafeína (Grgic

et al., 2020; Southward et al., 2018) e carboidratos (Burke et al., 2011), não evidenciaram melhora no desempenho do CF. Esses resultados também podem estar associados a limitações metodológicas, portanto, apesar da crescente popularidade e evidências científicas sobre o CF, ainda pouco se sabe sobre quais intervenções ou substâncias podem estar associadas a melhor desempenho esportivo (dos Santos Quaresma et al., 2021).

Caso a alta demanda energética do CF esteja associada a uma ingestão inadequada ou insuficiente de energia e carboidratos, pode acarretar em baixa disponibilidade energética. A baixa disponibilidade energética é um dos componentes da “síndrome” conhecida como Deficiência Energética Relativa ao Esporte (RED-S) (Mountjoy et al., 2018). A disponibilidade energética é definida como a diferença entre a ingestão de energia (em kcal) e o gasto energético com exercício físico (em kcal) divididos pela massa livre de gordura (em kg). O gasto energético do exercício físico que ocorre durante a sessão de treinamento é considerado como uma forma de energia adicional em relação ao gasto basal (Loucks et al., 2011).

A quantidade e intensidade do exercício físico determinam o gasto energético, o qual precisa ser suprido pela ingestão de alimentos (Nieman et al., 2001). Além disso, outros parâmetros como massa corporal, estatura, sexo, idade e metabolismo também irão influenciar nessa necessidade e, dessa forma, é extremamente necessário que se conheça tanto a rotina de exercícios quanto de hábitos alimentares de atletas (Guerra, 2004).

O desempenho esportivo de sucesso está associado a uma combinação entre metabolismo aeróbio e anaeróbio, potência e força muscular, velocidade e agilidade, conforme tarefas específicas (Ramos-Campo et al., 2018). Dentre uma grande variedade de treinamentos para melhor desempenho esportivo, o treinamento de resistência (TR) torna-se essencial, uma vez que aumenta força e potência muscular (Suchomel et al., 2016). De um modo geral, o TR visa aumento de força do músculo esquelético trabalhando contra um peso ou força. Recentemente, o treinamento funcional de alta intensidade (HIFT) tem ganhado crescente popularidade, supostamente por melhorar condições físicas e gerais (Glassman, 2007). O HIFT é baseado em elementos básicos de movimentos considerados rotineiros ou diários derivados de esforços aeróbicos e de resistência, realizados em altas intensidades. A eficiência desse treinamento depende não apenas da carga, mas também da capacidade do atleta de sustentá-la (Faelli et al., 2020).

O CF é uma das novas modalidades de HIFT que surgiram nos últimos anos. De acordo com o criador do CF, Glassman, o objetivo do CF é melhorar as habilidades físicas, considerando resistência cardiovascular e respiratória, resistência, força, flexibilidade, potência, velocidade, coordenação, agilidade, equilíbrio e precisão. É reconhecido como um treinamento de alta intensidade, próxima à 95% da frequência cardíaca máxima (Glassman, 2007; Maté-Muñoz et al., 2018), que combina múltiplos exercícios. Esses exercícios geralmente são combinados em treinos de alta intensidade, chamados de “treino do dia” ou *Workout Of the Day* (WOD), em que são realizados de forma rápida e repetitiva e podem ser realizados em “*as many repetitions as possible*” (AMRAP) ou, em tradução livre para o português, “tantas repetições quanto possível”; ou com tempo limitado, considerando um “*For Time*” (FT) ou, em tradução livre para o português, “em tempo”; com pouco ou nenhum tempo de recuperação entre as séries. Em tese, os treinos devem levar em consideração o nível de condicionamento físico atual do praticante, para que possam ser realizados de forma eficaz e segura (Glassman, 2002; Glassman, 2010).

Os efeitos benéficos do exercício físico são indiscutíveis, entretanto, o exercício é uma situação de estresse que desafia a homeostase (Powers & Jackson, 2008), fazendo com que o corpo precise encontrar um novo equilíbrio dinâmico, o que requer, dentre outras coisas, respostas adaptativas dos sistemas hormonal, metabólico e imunológico. Em relação ao HIFT, estudos prévios demonstraram que o CF provoca respostas metabólicas, hormonais e inflamatórias (Heavens et al., n.d.; Mangine et al., 2018; Szivak et al., n.d.; Tibana et al., 2016).

A eficácia do treinamento depende do planejamento de treino adequado e de uma dieta balanceada, sendo assim, fornecer uma ingestão inadequada de energia e nutrientes pode acarretar em uma redução da adaptação à atividade física e também levar a alteração de composição corporal com redução de massa muscular, bem como redução de força, resistência e outros problemas de saúde (Kerksick et al., 2018).

A disponibilidade energética (DE) é a quantidade de energia que resta ao organismo após descontado o gasto com o exercício, e é considerada um indicador da energia disponível para processos fisiológicos-chave necessários para adaptações agudas e/ou crônicas (A. K. Melin et al., 2019) e é expressa em Kcal/Kg de massa magra (MM). É necessário tanto identificar o consumo energético por meio de instrumentos de consumo alimentar confiáveis que retratem a ingestão alimentar habitual, quanto obter dados confiáveis do componente corporal magro.

A disponibilidade energética é definida como a diferença entre a ingestão de energia (kcal) e o gasto energético com exercício físico (kcal) dividido pela massa magra (kg MM). O gasto energético do exercício físico é considerado como uma forma de energia adicional em relação ao gasto basal e é avaliado pelas sessões de treinamento (Loucks et al., 2011).

Disponibilidade Energética (DE)

$$= \text{Ingestão Energética} - \frac{\text{Gasto Energético com o Exercício}}{\text{Massa Magra}}$$

A DE pode ser implementada como variável de monitoramento ou coadjuvante para auxiliar o diagnóstico nutricional de atletas/praticantes potencialmente em risco de deficiências nutricionais. As faixas de DE podem ser observadas no quadro 1, sendo de interesse clínico avaliar a prevalência de praticantes que se encontram abaixo da faixa inferior (abaixo de 30,0 Kcal/Kg MM), pois podem apresentar diversas alterações que afetam tanto direta, quanto indiretamente o desempenho esportivo e a saúde. Mulheres apresentam maior predisposição de baixa DE (A. Melin et al., 2015)

Quadro 1. Faixas recomendadas de disponibilidade energética para diferentes objetivos atléticos

Faixa de Disponibilidade Energética (Kcal/KgMM/dia)	Objetivo
> 45,0	Ganho de massa corporal total; Anabolismo muscular; Carregamento de carboidrato
≈ 45,0	Manutenção da massa corporal total; Especialização no esporte/técnica esportiva
30,0 a 45,0	Redução de massa corporal total; Redução de massa gorda

A baixa disponibilidade energética (Low Energy Availability – LEA), tanto em homens quanto em mulheres, está associada a situações de descompasso em relação à ingestão energética e o gasto energético com exercício físico. Os fatores que contribuem para isso são diversos e podem inclusive estar associados a características exclusivas de cada modalidade esportiva como mudanças de composição corporal, ingestão de energia inadequada, mudanças

de volume e intensidade do treinamento e eventos extenuantes sem aporte nutricional adequado (Burke et al., 2018). Esses fatores contribuem para uma deficiência energética relativa no esporte (RED-S). É importante salientar que a prevalência de RED-S tem sido sugerida como maior em mulheres do que em homens, embora os dados ainda sejam insuficientes. Ademais, a detecção precoce para risco de deficiência energética é fundamental pensando em prevenção à saúde.

RED-S pode associado a um maior índice de lesões, perda de desempenho esportivo, bem como alterações cardiovasculares, psicológicas, gastrointestinais, imunológicas, endócrinas, dentre outras (Mountjoy, Sundgot-Borgen, Burke, Ackerman, Blauwet, Constantini, Lebrun, Lundy, Melin, Meyer, Sherman, Tenforde, Klungland Torstveit, et al., 2018).

A alta ingestão de fibras, estimulantes, adoçantes artificiais, alimentos com baixa densidade energética, alta restrição alimentar e má distribuição diária de energia também podem estar associadas à baixa disponibilidade de energia e extrapolar os seus efeitos (Heikura et al., 2018; A. Melin et al., 2016; Reed et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o aumento do número de praticantes de CF, as características de alta intensidade inerentes às sessões de treinamento físico, associados ainda à orientação do site oficial da marca CrossFit® de seguir uma dieta com restrição de carboidratos (paleolítica), consideramos necessário investigar a ingestão alimentar destes praticantes, de forma a identificar se há algum risco de deficiência na ingestão energética e por conseguinte na disponibilidade de energia para todas as funções do organismo (além do exercício físico). Além disso, através de instrumentos usados no dia-a-dia da prática do Nutricionista, a avaliação da disponibilidade energética pode ser implementada como variável de monitoramento ou coadjuvante para auxiliar o diagnóstico nutricional de atletas/praticantes potencialmente em risco de deficiências nutricionais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a disponibilidade energética de praticantes de CrossFit.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a composição corporal de praticantes de CrossFit;
- Descrever o consumo alimentar de praticantes de CrossFit;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O delineamento deste estudo é transversal.

4.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA

A amostra será composta por adultos, praticantes de CrossFit em academias de CrossFit da cidade de Porto Alegre. Critérios de inclusão: indivíduos maiores de 18 anos, homens e mulheres (não gestantes), que estejam praticando CrossFit há, pelo menos, 3 meses, autodeclarados saudáveis, com periodicidade mínima de treino de 3x/semana.

4.3. CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho de amostra foi realizado por meio da ferramenta PSS Health versão on-line, utilizando o resultado obtido por Silva Cruz (2018) da disponibilidade energética de $35,8 \pm 7,98$ kcal/kg/dia, com margem de erro absoluta de 2,5 kcal/kg/dia e nível de confiança de 95%. Chegou-se ao tamanho de amostra de 42 participantes. Acrescentando 10% para possíveis perdas e recusas o tamanho de amostra deverá ser 47 participantes.

4.4. COLETA DE DADOS

Após aprovação do comitê de ética, o recrutamento da amostra será iniciado.

As coletas de dados acontecerão nas próprias academias de CrossFit mediante autorização dos proprietários os quais estipularão os dias e horários para coletas de dados. A academia irá colaborar cedendo um espaço físico para realizar as avaliações da pesquisa (os termos de anuência serão enviados via Plataforma Brasil).

Os pesquisadores irão divulgar a pesquisa aos praticantes através de cartazes na academia. No cartaz irá conter telefone e e-mail dos pesquisadores para que os interessados entrem em contato com a equipe de pesquisa (ANEXO I), ademais, haverá envio do convite através dos

grupos de WhatsApp das academias, bem como avisos entre as aulas, tudo previamente acordado com os responsáveis pelas academias.

Após o contato do participante manifestando interesse em participar, será agendado um horário presencial na academia, para dar início ao estudo. No primeiro encontro será apresentado o estudo, entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e esclarecida qualquer dúvida por parte do participante. Após a leitura e assinatura do TCLE será iniciada a fase de coleta de dados.

A coleta de dados inclui: (1) avaliação da ingestão alimentar, (2) avaliação da composição corporal, (3) informações sobre a rotina de treinamento de CrossFit.

Considerando a pandemia da COVID-19 que ainda está ocorrendo, todos os cuidados necessários serão tomados pelos pesquisadores.

4.4.1. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Para avaliar o consumo alimentar será utilizado um registro alimentar de três dias, não consecutivos, sendo dois deles dias da semana (dias típicos) e um dia de final de semana (dia atípico). Os participantes deverão descrever os alimentos consumidos, o tamanho e quantidade da porção, e, se possível, a marca do produto alimentício, bem como horários de consumo.

Para minimizar erros na descrição das porções dos alimentos, será fornecido um material fotográfico com o tamanho das porções para auxiliar no preenchimento em medidas caseiras (VITOLLO, 2008). Este material será distribuído e criteriosamente explicado de forma individual, constando os diferentes tamanhos (pequeno, médio e grande) de pratos, talheres, copos e quantidades (cheio, raso, normal) para que os registros sejam detalhados e padronizados. Após o preenchimento dos registros, todas as anotações serão conferidas com os voluntários para que não haja nenhuma dúvida quanto à descrição.

O cálculo nutricional será realizado com apoio do programa Dietbox online. As tabelas de composição nutricional dos alimentos utilizados no programa serão escolhidas na seguinte ordem, 1º Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), que tem dados específicos sobre a composição dos alimentos consumidos no Brasil, 2º tabela americana (USDA).

As análises alimentares incluirão: energia total (kcal/d), proteínas (% VET e g/kg/d), carboidratos (% VET e g/kg/d), lipídeos (% VET e g/kg/d), ácidos graxos saturados, poli e monoinsaturados (% VET e g/d), colesterol, vitaminas, minerais e fibras. A adequação quanto à ingestão de macronutrientes e micronutrientes será realizada conforme as recomendações das *Dietary reference intake* (DRI) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Considerando que alguns aspectos dietéticos como alta ingestão de fibras, consumo de adoçantes artificiais, alimentos com baixa densidade energética e má distribuição diária de energia podem estar associadas à baixa disponibilidade de energia, estes fatores também serão investigados nos registros alimentares.

4.4.2. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

A Composição corporal será avaliada pelos métodos de bioimpedância e dobras cutâneas, nesta ordem, no turno da manhã.

BIOIMPEDÂNCIA: Será utilizado o equipamento de bioimpedância elétrica modelo Biodynamics 450 que oferece análise da massa gorda (kg) e massa magra (kg). As medidas serão obtidas com o participante deitado, com a colocação de eletrodos na mão e pé direitos (nas posições de referência), que emitirão uma corrente elétrica suave que passará entre os tecidos corporais do organismo. O exame tem duração de cerca de 2 minutos. Durante o exame o participante não poderá se mexer.

Considerando que alterações no teor de água corporal influenciam os resultados de composição corporal, é necessário seguir uma padronização antes da aferição para reduzir erros de mensuração. Os participantes serão informados e orientados a:

- suspender o uso de diuréticos nas 24h antes do exame
- não consumir alimentos e bebidas nas 4h antes do teste
- não realizar exercícios físicos por pelo menos 8h antes do exame
- medicamentos que causem possível retenção hídrica, se possível, devem ser evitados para a realização do exame

(Cômado ARO et al., 2009)

Além disso, será necessário observar os seguintes aspectos:

- esvaziar a bexiga alguns minutos antes de realizar o exame;
- retirar todos adornos metálicos antes de realizar o exame (ex. relógio, anel, pulseira, colar, tornozeleira);
- ficar em repouso na maca por 10 minutos antes de iniciar o exame.

Não poderão fazer o exame de bioimpedância portadores de marcapasso.

DOBRAS CUTÂNEAS: A avaliação antropométrica será realizada através da mensuração de dobras cutâneas (tricipital, subescapular, supraespinal, abdominal, coxa média axilar e peitoral) com o uso de um plicômetro e trena antropométria Avanutri® e baseado no protocolo proposto pela ISAK (*International Society for Advancement of Kinanthropometry*) (Marfell-Jones, 2012; Silva & Vieira, 2020). Após a obtenção das medidas será calculada massa gorda (kg) e a massa magra (kg)

MASSA CORPORAL E ESTATURA: Para avaliação da massa corporal (kg) será utilizada uma balança calibrada portátil, marca Welmy®, modelo W110, na qual o indivíduo é posicionado em pé, descalço e no centro da plataforma. A estatura (cm) será aferida através de estadiômetro digital ultrassônico avanutri, com o indivíduo em pé, descalço, com a cabeça livre de adereços, com os braços estendidos ao longo do corpo e com a cabeça posicionada no plano de Frankfurt (Mussoi, 2017).

4.4.3. ROTINA DE TREINAMENTO

A partir da planilha de treinamento que a academia prescreve semanalmente, os pesquisadores irão questionar o participante da pesquisa sobre quais exercícios foram realizados aquela semana, o tempo de cada sessão de treinamento, e o esforço percebido. Qualquer dúvida remanescente sobre os exercícios (intensidade e duração das sessões de treino) será esclarecida com o professor responsável pela prescrição do treinamento.

O gasto energético diário (kcal) será estimado com o auxílio da equação de Harris Benedict, e o gasto específico com o exercício com auxílio dos equivalentes metabólicos (METs) (Garber et al., 2011).

4.4.4. DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA

A disponibilidade energética será calculada como a diferença entre a ingestão de energia (kcal) e o gasto energético com exercício físico (kcal) dividido pela massa magra (kg MM), conforme a equação abaixo:

Disponibilidade Energética (DE)

$$= \text{Ingestão Energética} - \frac{\text{Gasto Energético com o Exercício}}{\text{Massa Magra}}$$

Serão classificados como baixa disponibilidade energética aqueles praticantes que se encontram abaixo de 30,0 Kcal/Kg MM.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados serão analisados inicialmente para o pressuposto de normalidade com auxílio do teste de Shapiro-Wilk. Será utilizada a estatística descritiva para apresentar os resultados. Para identificar a adequação dos nutrientes será utilizado o teste t para uma amostra. Será utilizado o pacote estatístico SPSS 23.0. O nível de significância adotado será de 5%.

4.6 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA. O projeto seguirá as orientações éticas conforme Resolução 466/2012, preservando os participantes. Todos os participantes serão informados sobre os objetivos e procedimentos do estudo, e após ler e esclarecer todas as suas dúvidas darão consentimento para a pesquisa conforme assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

Os riscos em participar desta pesquisa são considerados mínimos, e estão relacionados ao desconforto em realizar as medidas de dobras cutâneas (cada medida é como se fosse um beliscão bem leve), mas estas avaliações serão realizadas por um membro da equipe treinado e experiente afim de evitar ou minimizar qualquer desconforto.

Os benefícios de participar deste estudo consistem nos resultados da avaliação da composição corporal e do consumo alimentar.

5. MEDIDAS SANITÁRIAS

A coleta de dados respeitará as questões sanitárias referentes à pandemia de COVID-19. Adicionalmente, o estudo atenderá às diretrizes elaboradas pelo COE da UFCSPA em relação às atividades presenciais. Os pesquisadores responsáveis também levarão em consideração os riscos de contágio do COVID-19, seguindo todos os protocolos de higienização para prevenção de contágio, bem como, respeitarão os decretos municipais vigentes.

6. RECURSOS HUMANOS

Tayani Palma Cohen, Mestranda, Nutricionista, Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação, UFCSPA.

Cláudia Dornelles Schneider, Orientadora, Nutricionista, Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação, UFCSPA.

Ramiro Barcos Nunes, Co-orientador, Professor de Educação Física, Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação, UFCSPA.

Larissa Guimarães, Acadêmica de Nutrição, UFCSPA.

7. CRONOGRAMA

Abaixo o cronograma das atividades pode ser observado (Quadro 1). O processo de seleção da amostra será iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.

Quadro 1. Cronograma das atividades.

Identificação da etapa	Início (dd/mm/aaaa)	Término (dd/mm/aaaa)
Revisão de literatura	01/08/2021	01/06/2022
Seleção da amostra e coleta de dados	02/05/2022	01/12/2022
Tabulação e análise dos dados	02/12/2022	01/02/2023
Discussão dos resultados	02/02/2023	02/03/2023
Elaboração da dissertação	03/03/2023	30/07/2023
Defesa da dissertação	31/07/2023	31/07/2023

8. ORÇAMENTO

Quadro 2. Orçamento do projeto.

Item	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Software nutricional dietbox – ano	1	539,90	539,90
Máscara descartável – 50 unidades	4	14,99	59,96
Folha de ofício A4 – 500 unidades	2	23,65	70,95
Bioimpedância elétrica Biodynamics 450	1	31.905,00	31.905,00
Eletrodo para bioimpedância – 100 unidades	3	71,94	215,82
Plicômetro científico digital avanutri	1	655,00	655,00
Estadiômetro digital ultrassônico avanutri	1	260,00	260,00
Trena antropométrica avanutri	1	40,00	40,00
Total do orçamento	-	-	33.746,63

O *software* nutricional Dietbox, plicômetro, balança e estadiômetro pertencem aos pesquisadores. Demais materiais necessários para as coletas serão custeados pelos pesquisadores.

A bioimpedância pertence à UFCSPA e está sob a guarda do Laboratório de Fisioterapia 714 e 814 (prédio II) (termo de anuência anexado à Plataforma Brasil), será requisitada para uso na pesquisa após aprovação do projeto no CEP/UFCSPA.

9. REFERÊNCIAS

Burke, L. M., Close, G. L., Lundy, B., Mooses, M., Morton, J. P., & Tenforde, A. S. (2018). Relative Energy Deficiency in Sport in Male Athletes: A Commentary on Its Presentation Among Selected Groups of Male Athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 28(4), 364–374. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0182>

Burke, L. M., Hawley, J. A., Wong, S. H. S., & Jeukendrup, A. E. (2011). Carbohydrates for training and competition. *Journal of Sports Sciences*, 29(sup1), S17–S27. <https://doi.org/10.1080/02640414.2011.585473>

Butcher, S., Neyedly, T., Horvey, K., & Benko, C. (2015). Do physiological measures predict selected CrossFit® benchmark performance? *Open Access Journal of Sports Medicine*, 241. <https://doi.org/10.2147/OAJSM.S88265>

Cômodo ARO, Dias ACF, Tomaz BA, Silva-Filho AA, Werustsky CA, Ribas DF, Spolidoro J, & Marchini JS. (2009). *Utilização da Bioimpedância para Avaliação da Massa Corpórea*.

da Silva Cruz, R. (2018). *AValiação DO CONSUMO E GASTO ENERGÉTICO DE PRATICANTES DE CROSSFIT® DE BRASÍLIA*.

Dawson, M. C. (2017). CrossFit: Fitness cult or reinventive institution? *International Review for the Sociology of Sport*, 52(3), 361–379. <https://doi.org/10.1177/1012690215591793>

dos Santos Quaresma, M. V. L., Guazzelli Marques, C., & Nakamoto, F. P. (2021). Effects of diet interventions, dietary supplements, and performance-enhancing substances on the performance of CrossFit-trained individuals: A systematic review of clinical studies. In *Nutrition* (Vol. 82). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110994>

Escobar, K. A., Morales, J., & Vandusseldorp, T. A. (2016). The Effect of a Moderately Low and High Carbohydrate Intake on Crossfit Performance. In *International Journal of Exercise Science* (Vol. 9, Issue 4). <http://www.intjexersci.com>

Faelli, E., Bisio, A., Codella, R., Ferrando, V., Perasso, L., Panasci, M., Saverino, D., & Ruggeri, P. (2020). Acute and chronic catabolic responses to crossfit® and

resistance training in young males. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(19), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijerph17197172>

Garber, C. E., Blissmer, B., Deschenes, M. R., Franklin, B. A., Lamonte, M. J., Lee, I.-M., Nieman, D. C., & Swain, D. P. (2011). Quantity and Quality of Exercise for Developing and Maintaining Cardiorespiratory, Musculoskeletal, and Neuromotor Fitness in Apparently Healthy Adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 43(7), 1334–1359. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318213fefb>

Glassman, G. (2002). What is fitness. *Crossfit Journal*, 3, 1–11.

Glassman, G. (2007). Understanding CrossFit. In *CrossFit Journal Article Reprint. First Published in CrossFit Journal Issue* (Vol. 56). <http://store.crossfit.com>

Glassman, G. (2010). The CrossFit training guide. *CrossFit Journal*, 1–115.

Grgic, J., Grgic, I., Pickering, C., Schoenfeld, B. J., Bishop, D. J., & Pedisic, Z. (2020). Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. *British Journal of Sports Medicine*, 54(11), 681–688. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100278>

Guerra, I. (2004). IMPORTÂNCIA DA ALIMENTAÇÃO E DA HIDRATAÇÃO DO ATLETA. In *Educ. Fís* (Vol. 12, Issue 2).

Heavens, K. R., Szivak, T. K., Hooper, D. R., Dunn-Lewis, C., Comstock, B. A., Flanagan, S. D., Looney, D. P., Kupchak, B. R., Maresh, C. M., Volek, J. S., & Kraemer, W. J. (n.d.). *THE EFFECTS OF HIGH INTENSITY SHORT REST RESISTANCE EXERCISE ON MUSCLE DAMAGE MARKERS IN MEN AND WOMEN*. www.nsc.com

Heikura, I. A., Uusitalo, A. L. T., Stellingwerff, T., Bergland, D., Mero, A. A., & Burke, L. M. (2018). Low Energy Availability Is Difficult to Assess but Outcomes Have Large Impact on Bone Injury Rates in Elite Distance Athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 28(4), 403–411. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2017-0313>

JOINT POSITION STATEMENT - Nutrition and Athletic Performance. (2016). *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 48(3), 543–568. <https://doi.org/10.1249/MSS.00000000000000852>

Kephart, W. C., Pledge, C. D., Roberson, P. A., Mumford, P. W., Romero, M. A., Mobley, C. B., Martin, J. S., Young, K. C., Lowery, R. P., Wilson, J. M., Huggins, K. W., & Roberts, M. D. (2018). The three-month effects of a ketogenic diet on body composition, blood parameters, and performance metrics in crossfit trainees: A pilot study. *Sports*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/sports6010001>

Kerksick, C. M., Wilborn, C. D., Roberts, M. D., Smith-Ryan, A., Kleiner, S. M., Jäger, R., Collins, R., Cooke, M., Davis, J. N., Galvan, E., Greenwood, M., Lowery, L. M., Wildman, R., Antonio, J., & Kreider, R. B. (2018). ISSN exercise & sports nutrition review update: Research & recommendations. In *Journal of the International Society of Sports Nutrition* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12970-018-0242-y>

Kozub, F. M. (2013). Using the Snatch and CrossFit Principles to Facilitate Fitness. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*, 84(6), 13–16. <https://doi.org/10.1080/07303084.2013.808121>

Loucks, A. B., Kiens, B., & Wright, H. H. (2011). Energy availability in athletes. *Journal of Sports Sciences*, 29(sup1), S7–S15. <https://doi.org/10.1080/02640414.2011.588958>

Mangine, G. T., van Dusseldorp, T. A., Feito, Y., Holmes, A. J., Serafini, P. R., Box, A. G., & Gonzalez, A. M. (2018). Testosterone and cortisol responses to five high-intensity functional training competition workouts in recreationally active adults. *Sports*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/sports6030062>

Marfell-Jones, M. J. , S. A. D. , & de R. J. H. (2012). *International standards for anthropometric assessment*. International Society for the Advancement of Kinanthropometry.

Maté-Muñoz, J. L., Lougedo, J. H., Barba, M., Cañuelo-Márquez, A. M., Guodemar-Pérez, J., García-Fernández, P., Lozano-Estevan, M. D. C., Alonso-Melero,

R., Sánchez-Calabuig, M. A., Ruíz-López, M., de Jesús, F., & Garnacho-Castaño, M. v. (2018). Cardiometabolic and Muscular Fatigue Responses to Different CrossFit® Workouts. *Journal of Sports Science & Medicine*, 17(4), 668–679.

Maughan, R. J., Burke, L. M., Dvorak, J., Larson-Meyer, D. E., Peeling, P., Phillips, S. M., Rawson, E. S., Walsh, N. P., Garthe, I., Geyer, H., Meeusen, R., van Loon, L. J. C., Shirreffs, S. M., Spriet, L. L., Stuart, M., Vernec, A., Currell, K., Ali, V. M., Budgett, R. G., ... Engebretsen, L. (2018). IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *British Journal of Sports Medicine*, 52(7), 439–455. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099027>

Maxwell, C., Ruth, K., & Friesen, C. (2017). Sports nutrition knowledge, perceptions, resources, and advice given by certified crossfit trainers. *Sports*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/sports5020021>

Melin, A. K., Heikura, I. A., Tenforde, A., & Mountjoy, M. (2019). Energy Availability in Athletics: Health, Performance, and Physique. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 29(2), 152–164. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0201>

Melin, A., Tornberg, Å. B., Skouby, S., Møller, S. S., Faber, J., Sundgot-Borgen, J., & Sjödén, A. (2016). Low-energy density and high fiber intake are dietary concerns in female endurance athletes. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 26(9), 1060–1071. <https://doi.org/10.1111/sms.12516>

Melin, A., Tornberg, Å. B., Skouby, S., Møller, S. S., Sundgot-Borgen, J., Faber, J., Sidellmann, J. J., Aziz, M., & Sjödén, A. (2015). Energy availability and the female athlete triad in elite endurance athletes. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25(5), 610–622. <https://doi.org/10.1111/sms.12261>

Meyer, J., Morrison, J., & Zuniga, J. (2017). The Benefits and Risks of CrossFit: A Systematic Review. *Workplace Health & Safety*, 65(12), 612–618. <https://doi.org/10.1177/2165079916685568>

Miele, E. M., Vitti, S., Christoph, L., O'Neill, E. C., Matthews, T. D., & Wood, R. J. (2018). The Effects Of A Six-week Ketogenic Diet On The Performance Of Short-

duration, High-intensity Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 50(5S), 792. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000538607.63990.a9>

Mountjoy, M., Sundgot-Borgen, J., Burke, L., Ackerman, K. E., Blauwet, C., Constantini, N., Lebrun, C., Lundy, B., Melin, A., Meyer, N., Sherman, R., Tenforde, A. S., Torstveit, M. K., & Budgett, R. (2018). International Olympic Committee (IOC) Consensus Statement on Relative Energy Deficiency in Sport (RED-S): 2018 Update. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 28(4), 316–331. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0136>

Mountjoy, M., Sundgot-Borgen, J. K., Burke, L. M., Ackerman, K. E., Blauwet, C., Constantini, N., Lebrun, C., Lundy, B., Melin, A. K., Meyer, N. L., Sherman, R. T., Tenforde, A. S., Klungland Torstveit, M., & Budgett, R. (2018). IOC consensus statement on relative energy deficiency in sport (RED-S): 2018 update. *British Journal of Sports Medicine*, 52(11), 687–697. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099193>

Mussoi, T. D. (2017). *Avaliação nutricional na prática clínica: da gestação ao envelhecimento*. Editora Guanabara Koogan.

Nieman, D. C., Henson, D. A., Smith, L. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Davis, J. M., Kaminsky, D. E., & Shute, M. (2001). Downloaded from journals.physiology.org/journal/jappl (189.006.215.235) on. In *J Appl Physiol* (Vol. 91). <http://www.jap.org>

Peeling, P., Binnie, M. J., Goods, P. S. R., Sim, M., & Burke, L. M. (2018). Evidence-Based Supplements for the Enhancement of Athletic Performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 28(2), 178–187. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2017-0343>

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>

Ramos-Campo, D. J., Martínez-Guardado, I., Olcina, G., Marín-Pagán, C., Martínez-Noguera, F. J., Carlos-Vivas, J., Alcaraz, P. E., & Rubio, J. Á. (2018). Effect of high-intensity resistance circuit-based training in hypoxia on aerobic performance and

repeat sprint ability. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 28(10), 2135–2143. <https://doi.org/10.1111/sms.13223>

Reed, J. L., de Souza, M. J., Kindler, J. M., & Williams, N. I. (2014). Nutritional practices associated with low energy availability in Division I female soccer players. *Journal of Sports Sciences*, 32(16), 1499–1509. <https://doi.org/10.1080/02640414.2014.908321>

Rothschild, J. A., & Bishop, D. J. (2020). Effects of Dietary Supplements on Adaptations to Endurance Training. *Sports Medicine*, 50(1), 25–53. <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01185-8>

Schubert, M. M., & Palumbo, E. A. (2019). Energy balance dynamics during short-term high-intensity functional training. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 44(2), 172–178. <https://doi.org/10.1139/apnm-2018-0311>

Sibley, B. A. (2012). Using Sport Education to Implement a CrossFit Unit. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*, 83(8), 42–48. <https://doi.org/10.1080/07303084.2012.10598829>

Silva, V. S. da, & Vieira, M. F. S. (2020). International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK) Global: international accreditation scheme of the competent anthropometrist. *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano*, 22. <https://doi.org/10.1590/1980-0037.2020v22e70517>

Southward, K., Rutherford-Markwick, K. J., & Ali, A. (2018). The Effect of Acute Caffeine Ingestion on Endurance Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Medicine*, 48(8), 1913–1928. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0939-8>

Suchomel, T. J., Nimphius, S., & Stone, M. H. (2016). The Importance of Muscular Strength in Athletic Performance. *Sports Medicine*, 46(10), 1419–1449. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0486-0>

Szivak, T. K., Hooper, D. R., Dunn-Lewis, C., Comstock, B. A., Kupchak, B. R., Apicella, J. M., Saenz, C., Maresh, C. M., Denegar, C. R., & Kraemer, W. J. (n.d.). *ADRENAL CORTICAL RESPONSES TO HIGH-INTENSITY, SHORT REST, RESISTANCE EXERCISE IN MEN AND WOMEN*. www.nasca.com

Tibana, R. A., de Almeida, L. M., Frade de Sousa, N. M., Nascimento, D. da C., Neto, I. V. de S., de Almeida, J. A., de Souza, V. C., Lopes, M. de F. T. P. L., Nobrega, O. de T., Vieira, D. C. L., Navalta, J. W., & Prestes, J. (2016). Two Consecutive Days of Extreme Conditioning Program Training Affects Pro and Anti-inflammatory Cytokines and Osteoprotegerin without Impairments in Muscle Power. *Frontiers in Physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00260>

**CONVITE PARA PARTICIPAR
DE PESQUISA DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA
DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA
EM PRATICANTES DE CROSSFIT**

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- + de 18 anos
- Praticante de CrossFit há pelo menos 3 meses
- Autodeclarado saudável
- Periodicidade mínima de treino de 3x/semana

O QUE SERÁ FEITO?

- Avaliação da composição corporal (bioimpedância e dobras cutâneas)
- Avaliação de consumo alimentar

*As avaliações serão feitas na sua própria unidade de treinamento.

QUERO PARTICIPAR. COMO PROCEDER?

Caso tenha interesse ou queira saber mais informações:
(55) 99913-4297 ou tayani@ufcspa.edu.br

AGRADECEMOS DESDE JÁ!

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “AVALIAÇÃO DA DISPONIBILIDADE ENERGÉTICA EM PRATICANTES DE CROSSFIT”, que tem como objetivo determinar a disponibilidade energética de praticantes de CrossFit através da avaliação da ingestão alimentar, do gasto energético com o exercício físico e da composição corporal.

Considerando que o CrossFit (CF) é um exercício de alta intensidade que combina exercícios de força e aeróbicos, e, portanto, requer uma ingestão de alimentos compatível com seu gasto energético, é importante avaliar se a quantidade de alimentos ingeridos está adequada/disponível tanto para o exercício realizado quanto para as demais funções do organismo (isto se chama de disponibilidade energética).

Precisaremos informações sobre:

(1) sua alimentação no dia-a-dia, para isso você precisará anotar tudo o que comer durante 3 dias (é super importante que você não mude os seus hábitos alimentares nestes 3 dias, pois nossa intenção é justamente conhecer o dia-a-dia em relação à sua alimentação);

(2) serão realizadas algumas medidas para avaliar a sua composição corporal (peso, altura e quantidade de gordura corporal – A gordura corporal será avaliada por 2 métodos – (a) Dobras cutâneas: para fazer estas medidas é usado um equipamento chamado ‘adipômetro’, parecido com uma pinça, que vai medir a quantidade de gordura em algumas regiões do corpo, como braço, perna, costas e barriga); (b) Bioimpedância: para fazer esta avaliação você só precisa ficar deitado em uma maca por alguns minutos. Vamos colocar uns adesivos nas suas mãos e pés para conectar o aparelho, que permite a passagem de uma corrente elétrica de baixa intensidade por todo o corpo. Mas não se preocupe, não existe a possibilidade de dar choque, e o teste é super rápido e você não vai sentir nenhuma dor ou desconforto;

(3) seu treino de CrossFit (quantas vezes por semana, quanto tempo cada dia, qual a sua percepção de intensidade - leve/moderado/intenso)

A sua participação será necessária em 1 encontro presencial (tempo estimado de ~40 a 50 min), que será agendado previamente com você. Neste encontro faremos a avaliação da composição corporal, conversaremos sobre seu treino de CrossFit, e iremos lhe orientar como fazer as anotações sobre alimentação.

Você tem liberdade para desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem que isto traga qualquer tipo de prejuízo a você. É importante destacar que você não terá gastos

financeiros para participar deste estudo (as avaliações serão realizadas no seu local de treino), mas caso ocorra qualquer gasto, comprovadamente relacionado com a pesquisa, você será ressarcido pelos pesquisadores. Da mesma forma, não haverá remuneração financeira pela sua participação como voluntário. Caso haja qualquer prejuízo comprovadamente decorrente desta pesquisa, haverá garantia de indenização pelos pesquisadores.

Os pesquisadores garantem manutenção de sigilo e privacidade de suas informações durante todas as fases do estudo. Serão divulgados apenas os resultados do grupo como um todo por meio de publicações científicas em congressos e/ou revistas especializadas, sendo que o nome dos participantes será mantido em absoluto sigilo. Além disso, os dados obtidos na pesquisa não serão utilizados para outros fins além dos previstos neste projeto.

Os benefícios de participar deste estudo consistem nos resultados da avaliação da sua composição corporal e do seu consumo alimentar. Os riscos em participar desta pesquisa são considerados mínimos, e estão relacionados ao seu desconforto em realizar as medidas de dobras cutâneas (cada medida é como se fosse um beliscão bem leve), mas estas avaliações serão realizadas por um membro da equipe treinado e experiente afim de evitar ou minimizar qualquer desconforto. Também gostaríamos de dizer que caso você tenha qualquer dúvida sobre os procedimentos da pesquisa pode pedir auxílio aos pesquisadores, que estarão sempre disponíveis para lhe ajudar e esclarecer dúvidas. Gostaríamos que você soubesse que todos os pesquisadores tem experiência com os testes, que estão acostumados a realizá-los e que vão seguir todos os protocolos para garantir sua segurança durante todas as etapas do estudo.

A assinatura deste termo, em duas vias, indica que você leu e entendeu todas as informações sobre a sua participação neste projeto e você concorda em participar como voluntário. Uma das vias permanece com o participante e a outra fica com o pesquisador.

Se tiver qualquer dúvida referente a assuntos relacionados com esta pesquisa, favor contatar o pesquisador responsável no telefone indicado a seguir, ou a aluna de mestrado Tayani Palma Cohen (55) 99913-4297, ou ainda o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Dados de Identificação do Pesquisador Responsável:

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Dornelles Schneider Telefone: (51) 3303-8830 e-mail:

claudias@ufcspa.edu.br

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmiento Leite, 245 - Departamento de Nutrição – Porto Alegre, RS.

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA:

Rua Sarmento Leite, 245, sala 407, Prédio 3 - CEP 90.050-170 – Porto Alegre, RS

Telefone: (51) 3303-8804

e-mail: cep@ufcspa.edu.br

Nome em letra de forma do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre _____ de _____ de _____.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO**

Juliano Marques de Barros

**Consumo Alimentar, Composição
Corporal e Desempenho
Neuromuscular em Atletas
Profissionais de Futebol**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2021

Juliano Marques de Barros

Consumo Alimentar, Composição Corporal e Desempenho Neuromuscular em Atletas Profissionais de Futebol

Projeto de pesquisa de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Reabilitação da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre

Orientador: Dra. Cláudia D. Schneider

Co-orientador: Dr. Ronei Silveira Pinto

Porto Alegre

2021

RESUMO

O futebol é considerado por muitos autores o esporte mais praticado do mundo com 240 a 400 milhões de jogadores ativos. A prática desta modalidade é capaz de melhorar a aptidão cardiovascular e metabólica, no entanto, em períodos de alta exigência de treinamento para a competição, a ingestão alimentar adequada tem se mostrado importante para evitar fadiga neuromuscular, melhorar o desempenho dos atletas e prevenir lesões.

Objetivo: Acompanhar parâmetros dietéticos, desempenho neuromuscular, composição corporal, bem-estar relacionado ao exercício e incidência de lesões em atletas de futebol masculino ao longo de uma temporada esportiva. **Métodos:** A população envolvida será de homens entre 18 e 35 anos, atletas profissionais de futebol que participem da primeira divisão da competição regional. Todos os atletas que concordarem em participar serão avaliados em três momentos durante a competição da primeira divisão (série A), que correspondem ao início da fase classificatória, final da fase classificatória e final da competição. As avaliações serão compostas por (I) avaliação do consumo alimentar (II) avaliação da composição corporal, (III) avaliação dos parâmetros neuromusculares, (IV) avaliação do bem-estar relacionado ao exercício, (V) incidência de lesões.

Palavras-chave: ingestão de alimentos; composição corporal; desempenho atlético; futebol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA	7
3. OBJETIVOS	8
3.1. OBJETIVO GERAL	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. METODOLOGIA.....	9
4.1. TIPO DE PESQUISA E DELINEAMENTO.....	9
4.2. POPULAÇÃO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	9
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	9
4.4. DESENHO EXPERIMENTAL	9
4.5. DESFECHOS E INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO	10
4.5.1. INGESTÃO ALIMENTAR	10
4.5.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS NEUROMUSCULARES	12
4.5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPOSIÇÃO CORPORAL	15
4.5.4. MARCADORES DE BEM-ESTAR E PRONTIDÃO RELACIONADOS AO EXERCÍCIO.....	18
5. ANÁLISE DE DADOS	19
6. QUESTÕES ÉTICAS.....	20
7. RECURSOS HUMANOS	22
8. CRONOGRAMA.....	23
9. ORÇAMENTO	24
10. REFERÊNCIAS	26
ANEXO I - REGISTRO ALIMENTAR	37
ANEXO II - ÍNDICE DE HOOPER.....	38
ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	39

1. INTRODUÇÃO

O futebol é o esporte mais popular do mundo, praticado em mais de 180 países por mais de 240 milhões de indivíduos (RIBEIRO., 2006). Uma partida de futebol tem duração de 90 minutos e é caracterizada por ações intermitentes de curta e longa duração, e baixa e alta intensidade (WEBER *et al.*, 2010). Apesar da maioria das demandas do futebol serem de predominância aeróbia (i.e., ~70% da partida envolve corrida leve ou caminhada) (MOHR, 2003), são as ações anaeróbias que determinam uma partida (i.e., *sprints*, mudanças de direção, saltos, acelerações e desacelerações) (HAUGEN *et al.*, 2014). Tendo em vista o progressivo aumento das demandas de alta intensidade do futebol profissional na última década (i.e., corridas de alta intensidade e distâncias de *sprints* aumentaram em 30 a 35%) (BARNES *et al.*, 2014), importantes estratégias vêm sendo propostas visando a potencialização e manutenção do desempenho dos atletas durante as temporadas competitivas. O monitoramento de marcadores físicos e nutricionais (i.e., alimentação, hidratação, suplementação de substratos energéticos associados ao monitoramento do desempenho neuromuscular) é fator determinante para a consistência e disponibilidade dos atletas durante toda a temporada, objetivando diminuir a incidência de lesões e incrementar o desempenho (CURRELL *et al.*, 2009; RYAN *et al.*, 2017). Para um jogador de futebol enfrentar as ações intermitentes de alta intensidade que compõem uma partida de futebol, é muito importante fornecer substrato energético em quantidade adequada. Vários estudos estimaram e mediram o gasto total de energia em jogadores de futebol usando: frequência cardíaca e análise de deslocamento no jogo (REILLY *et al.*, 1979; OSGNACH *et al.*, 2010). O gasto médio de energia para uma partida foi estimado em aproximadamente 1.107 kcal (OSGNACH *et al.*, 2010), enquanto 3.442 a 3.824 kcal por dia foram estimados para os dias com treinamento diário (REILLY *et al.*, 1979). Recentemente, Anderson *et al.* (2017) relataram que o gasto energético médio de jogadores de futebol de elite foi de aproximadamente 3.566 kcal durante um período de sete dias, incluindo cinco dias de treinamento e duas partidas (ANDERSON *et al.*, 2017). No entanto, além do impacto de fatores individuais (i.e., tamanho, composição corporal), existem grandes diferenças no gasto de energia

dependendo da carga de treinamento, posição do jogador e abordagem tática utilizada pelo treinador e condições ambientais (BANGSBO *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2016; BURKE AND DEAKIN, 2016.). Neste sentido, tendo em vista que a demanda muscular ao longo dos treinamentos e jogos competitivos é alta e os jogadores de futebol mantem a frequência cardíaca em uma média de 85% da intensidade máxima ao longo da duração da partida (BANGSBO J. *et al.*, 2006), o que equivale a um gasto de energético de ~ 1300 - 1600 kcal (BANGSBO J. *et al.*, 1991; FERRAUTI A. *et al.*, 2006), em que carboidratos (CHO) contribuem cerca de 60% -70% do fornecimento total de energia (FERRAUTI A. *et al.*, 2006). Assim demonstrando a importância do consumo alimentar adequado e o quanto pode contribuir com o desempenho destes atletas e minimizar a ocorrência de lesões, logo, o monitoramento da qualidade do consumo alimentar associado ao desempenho neuromuscular e composição corporal de atletas de futebol profissional se torna um fator de extrema importância no desempenho esportivo. Com base nas declarações dos especialistas da *Union of European Football Associations* (UEFA) os quais defendem uma abordagem baseada em evidências científicas para a nutrição dos jogadores, sugere-se que a “ingestão alimentar é prioridade”, ou seja, priorizar a ingestão alimentar ao invés de suplementos para atender às necessidades nutricionais de atletas de elite do futebol, como sendo fundamental para garantir um aporte eficaz aos atletas. Neste sentido, é fundamental que os clubes e associações nacionais, sempre que possível, utilizem os serviços de profissionais graduados em nutrição e pós-graduação em nutrição esportiva e/ou de exercício e que possuam registro profissional de acordo com o país para a prescrição alimentar (COLLINS *et al.*, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da importância deste tema, poucos estudos investigaram a relação entre consumo alimentar, a composição corporal e o desempenho neuromuscular em atletas profissionais de futebol durante uma temporada competitiva. Tendo em vista o importante papel que o aporte adequado de macronutrientes e micronutrientes têm na performance esportiva de jogadores de futebol profissional, acreditamos que esta investigação seja relevante para que saibamos se existe uma correlação entre o consumo alimentar e o estado de prontidão, força e potência ou a incidência de lesão. Esta investigação poderá fornecer dados relevantes para que outras equipes possam fazer planejamentos estratégicos associados ao nutricionista do clube, profissional o qual tem como papel orientar e adequar a ingestão alimentar dos atletas, avaliando as necessidades de intervenção na ingestão alimentar.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Acompanhar parâmetros dietéticos, desempenho neuromuscular, composição corporal, indicadores de bem-estar relacionado ao exercício e incidência de lesões em atletas de futebol profissional masculino ao longo de uma temporada esportiva.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o consumo alimentar no dia a dia de treinamento e em situações competitivas;

Avaliar o índice da qualidade da dieta (IQD) e o grau de processamento dos alimentos;

Avaliar se o desempenho físico em testes de força e potência está relacionado com a ingestão prévia (48h) de energia e carboidratos;

Quantificar a carga de treinamento ao longo da temporada esportiva.

4. METODOLOGIA

4.1. TIPO DE PESQUISA E DELINEAMENTO

O presente estudo caracteriza-se como um estudo de coorte.

4.2. POPULAÇÃO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A população envolvida será de homens adultos, atletas profissionais de futebol que disputarão a série principal (série A) do campeonato regional de futebol de 2022.

A proposta de estudo foi apresentada e aprovada pelo Departamento de Futebol Profissional do Esporte Clube São José, de Porto Alegre – RS (termo de anuência anexado na Plataforma Brasil). Após aprovação pelo CEP/UFCSPA será agendada uma reunião com todo o grupo de atletas para a apresentação do estudo e cada atleta poderá manifestar o seu interesse em participar do trabalho. O número de jogadores que compõe o time é de aproximadamente 24 atletas (dados de dezembro de 2021 quando o termo de anuência com o clube foi assinado). Eventualmente há novas contratações, assim como encerramento de contratos, sendo assim, todos atletas que estiverem treinando regularmente no início do estudo serão convidados a participar. Os atletas que demonstrarem interesse receberão o termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e após período para leitura e esclarecimentos de dúvidas, poderão atestar ou não o seu consentimento em ingressar no estudo.

4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Ser jogador de futebol, participando regularmente dos treinamentos.

4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Os atletas serão acompanhados durante a temporada esportiva de 2022.

No início da fase classificatória, final da fase classificatória e final da competição serão avaliados: (a) o registro alimentar, (b) a composição corporal (c) testes físicos de força e potência. Estas informações serão obtidas dentro do intervalo de uma semana, em cada um destes três 3 momentos.

Durante a temporada, a cada duas semanas serão avaliadas: (a) carga de treinamento (planilha semanal com frequência, intensidade e duração do treinamento; número de partidas disputadas, registrando o tempo de jogo para cada jogador), (b) percepção de bem-estar relacionado ao exercício.

Ao longo de toda temporada será observada a ocorrência de lesões (caso ocorra alguma lesão será registrado o nome do atleta, tipo de lesão, período de afastamento dos treinos).

4.5. DESFECHOS E INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO

Os desfechos do estudo são:

- a. Ingestão alimentar: consumo de energia, macronutrientes, micronutrientes, índice de qualidade da dieta, grau de processamento alimentar;
- b. Indicadores neuromusculares: potência muscular vertical, pico de torque, taxa de produção de torque;
- c. Composição corporal: gordura corporal, qualidade muscular, espessura muscular;
- d. Indicadores de bem-estar relacionado ao exercício;
- e. Incidência de lesões.

4.5.1. INGESTÃO ALIMENTAR

REGISTRO ALIMENTAR:

O registro alimentar recolhe informações atuais do consumo alimentar, por assinalar o tamanho da porção e a quantidade na hora do consumo. A vantagem em relação a outros métodos é que o registro pode minimizar o viés de memória (FISBERG; MARCHIONI; COLUCCI, 2009). Este método será aplicado durante três dias, não consecutivos, sendo dois dias de semana (dias típicos) e um dia do final de semana (dia atípico) (ANEXO I). Todos os participantes serão orientados, de forma individualizada, sobre a forma de

preenchimento do registro. Os participantes receberão ainda um material ilustrativo com os diferentes tamanhos dos utensílios (pratos, talheres, copos, etc.) e tamanho das porções (raso, normal ou cheio), a fim de minimizar erros no preenchimento. O indivíduo deve anotar de forma detalhada o nome do alimento ou preparação (sempre que possível os ingredientes, a marca e a forma de preparação do alimento), se a casca foi consumida ou não, adição de sal, açúcar, óleo ou molho, e se o alimento era regular, diet ou light (FISBERG, MARCHIONI, COLUCCI, 2009).

Os cálculos de energia, macro e micronutrientes serão realizados com apoio do software *WebDiet*. Dentro do programa as tabelas de composição de alimentos serão selecionadas em ordem de preferência, dispostas da seguinte maneira: (1) Tabela Brasileira de Alimentos (TACO); (2) Tabela de Composição Química de Alimentos - Sonia Tucunduva Phillipi; (3) Tabela Americana - *United States Department of Agriculture* (USDA).

A adequação de macronutrientes será avaliada com base do posicionamento dos especialistas da *Union of European Football Associations* (UEFA) os quais defendem uma abordagem baseada em evidências científicas para a nutrição dos jogadores. Serão utilizados os seguintes pontos de corte: ingestão de carboidratos: antes da temporada (60 - 180 min; 4 - 8 g/kg/dia); durante a temporada (45 - 90 min; 3 - 8 g/kg/dia); períodos de temporada congestionada (<60min; 6-8 g/kg/dia); período fora de temporada (< 4g/kg/dia). Ingestão de proteínas: 1,6 - 2,2 g/kg/dia. Ingestão de lipídios: 20% a 35% do valor energético total (VET) (COLLINS *et al.*, 2020).

A adequação de micronutrientes será realizada conforme os parâmetros estabelecidos para homens adultos (*Dietary Reference Intake*, 1997; *Dietary Reference Intake*, 2000).

ÍNDICE DE QUALIDADE DA DIETA:

O Índice de Qualidade da Dieta Revisado (IQD-R) será utilizado para avaliação da qualidade da dieta dos atletas de futebol. O IQD-R é pontuado de acordo com a participação de cada componente na dieta, nesse caso deve-se calcular a pontuação dos componentes do índice dividindo-se o total calórico dos grupos pelo total de energia consumido no período (PREVIDELLI *et al.*, 2011). É recomendado o registro de vários dias para minimizar variação

energética interpessoal, o que reforça a utilização do registro alimentar de 3 dias. Cada grupo alimentar pode receber pontuações que variam entre 0 e 20 pontos sendo os valores intermediários calculados na proporção em que os nutrientes são consumidos (PREVIDELLI *et al.*, 2011), a pontuação máxima a ser atingida no IQD-R é 100 pontos, quanto maior a pontuação maior a qualidade da dieta. Os pontos de corte adotados para o IQD-R são: “dieta de boa qualidade” (> 80 pontos), “dieta que necessita de melhoria” (de 51 a 80 pontos) e “dieta não saudável” (< 51 pontos) (MORAIS *et al.*, 2017).

GRAU DE PROCESSAMENTO DOS ALIMENTOS

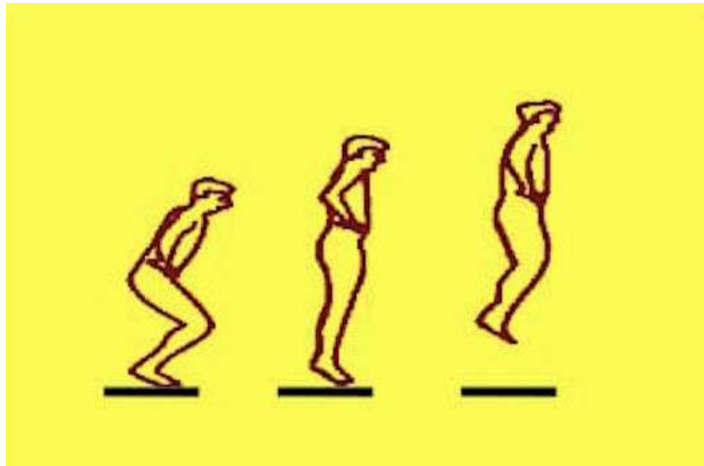
Será realizada a análise qualitativa a partir da classificação dos alimentos ingeridos em: *in natura*, minimamente processados, processados e ultraprocessados, conforme o Guia Alimentar para a População Brasileira (2014).

4.5.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS NEUROMUSCULARES

POTÊNCIA MUSCULAR:

A avaliação da potência muscular de membros inferiores será mensurada através do desempenho de salto com e sem contramovimento. Não é necessário a familiarização, pois os jogadores já estão acostumados a realizá-los nas temporadas anteriores (CHANDLER & BROWN, 2009). Serão realizadas três tentativas com 10 segundos de intervalo entre cada teste. Uma variação de 3% foi estabelecida como o mínimo entre as tentativas válidas. O maior valor será registrado para análise. Todos os saltos serão realizados de forma bilateral. Os jogadores serão sempre instruídos a realizarem os saltos da maneira “mais forte, rápida e potente” possível.

1) Salto agachado/ sem contramovimento/ *Squat Jump*:

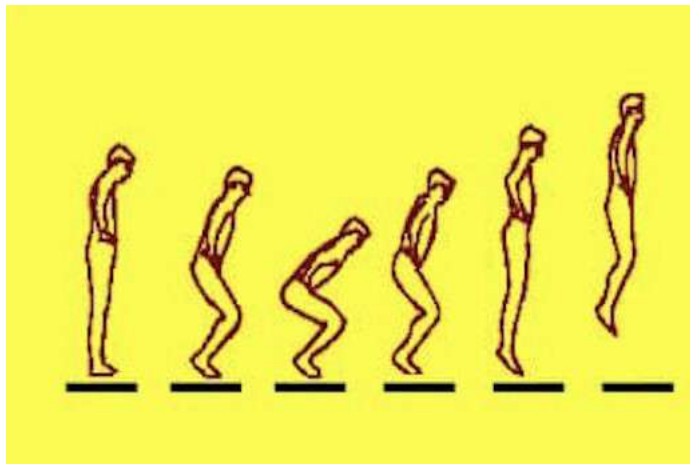


A altura de salto (cm), potência de salto (w) será avaliada usando um tapete eletrônico de contato (Jump System Pro, Cefise, Nova Odessa, Brasil) com os atletas instruídos para realizarem um esforço máximo no salto sem contramovimento, adotando um ângulo próximo a 45° quadril, em uma posição mais confortável para os atletas. Os participantes devem manter as mãos sempre nos quadris e serão instruídos a saltar com os joelhos e tornozelos totalmente estendidos e pousar em uma posição igualmente estendida para garantir a validade do teste (DE VILLARREAL ES, GONZÁLEZ-BADILLO JJ, IZQUIERDO M. *et al.*, 2008).

Três técnicas básicas serão adotadas:

- 1) Posição inicial: postura adotada (coluna erguida, ombros para trás), alinhamento do corpo, peito sobre os joelhos e mãos na cintura;
- 2) Posição durante o salto: saltando para cima sem deslocamento anterior, lateral ou posterior, com as mãos sempre na cintura e com as pontas dos pés sendo o último contato do corpo com o solo/ tapete;
- 3) Posição final: contato suave, com a ponta dos pés sendo a primeira parte do corpo em contato com o solo/ tapete.

2) Salto com contramovimento/ *Counter Movement Jump (CMJ)*:



A altura de salto (cm), potência de salto (w) será avaliada usando um tapete eletrônico de contato (*Jump System Pro*, Cefise, Nova Odessa, Brasil) com os atletas instruídos para realizar um esforço máximo (movimento mais rápido no CMJ), "saltar o mais alto possível". Nenhuma informação sobre a profundidade do contramovimento será dada. Não será permitido o auxílio dos membros superiores durante a realização do salto. Os participantes devem manter as mãos sempre nos quadris e serão instruídos a saltar com os joelhos e tornozelos totalmente estendidos e pousar em uma posição igualmente estendida para garantir a validade do teste (DE VILLARREAL ES, GONZÁLEZ-BADILLO JJ, IZQUIERDO M. *et al.*, 2008).

Três técnicas básicas serão adotadas:

- 1) Posição inicial: postura adotada (coluna erguida, ombros para trás), alinhamento do corpo, peito sobre os joelhos e mãos na cintura;
- 2) Posição durante o salto: saltando para cima sem deslocamento anterior, lateral ou posterior, com as mãos sempre na cintura e com as pontas dos pés sendo o último contato do corpo com o solo;
- 3) Posição final: desembarque suave, incluindo calcanhar de pé à ponta e joelhos dobrados.

PICO DE TORQUE E TAXA DE PRODUÇÃO DE TORQUE:

Para obtenção dos valores de pico de torque (PT) e taxas de produção de torque (TPT) serão executados protocolos isométricos de extensão e flexão de joelhos. Estes testes serão obtidos a partir de avaliações em um

dinamômetro isométrico (CEFISE e MIOTEC, Brasil), o qual será calibrado de acordo com as instruções do fabricante previamente às avaliações. Os dois membros inferiores serão testados. Será feito um aquecimento de 10 repetições. Serão realizadas 5 repetições isométricas máximas para grupos musculares agonistas e antagonistas. O participante será instruído a realizar todas as contrações da forma “tão rápida e forte quanto possível” (SAHALY *et al.*, 2001, MAFIULETTI *et al.*, 2016). Além disso, o participante receberá estímulo verbal ao longo de todos os testes, existindo também estímulo visual para o participante, o qual será a partir da demonstração do gráfico da curva de força, tendo como intuito estimular o participante a fazer o movimento mais forte e explosivo possível. As avaliações serão feitas por um mesmo avaliador. Posteriormente, serão avaliados o PT isométrico, e a TPT. O membro dominante será testado primeiro e na sequência o não dominante.

A aquisição da curva de torque produzido ao longo das contrações ocorrerá utilizando um conversor analógico digital da marca Miotool 400 com frequência de amostragem de 2000 Hz por canal (Miotec Equipamentos Biomédicos, Brasil) conectado ao canal de torque do próprio dinamômetro. A TPT será analisada na contração muscular de maior valor de torque (Nm). A TPT será determinada na fase inicial de cada contração isométrica voluntária máxima em períodos incrementais de 50ms até 200ms após o início da contração (ex. 0 – 50ms, 0 – 100ms, 100 – 250ms) e o valor obtido em cada intervalo de tempo será selecionado e posteriormente utilizado nas comparações. O início da contração será definido como o instante no qual o torque exceder a linha de base em 2,5% do PT.

4.5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPOSIÇÃO CORPORAL

COMPOSIÇÃO CORPORAL

Os perímetros corporais (braço, cintura, coxa, quadril e panturrilha) serão avaliados utilizando trena antropométrica Cescorf®, as dobras cutâneas (tricipital, subescapular, supraespinal, abdominal, coxa média e panturrilha) serão mensuradas com plicômetro científico Cescorf® (capacidade de 85 mm e precisão de 0,1 mm) e os diâmetros ósseos (umeral, maleolar, femural) com paquímetro Cescorf®. Todas medidas seguirão as

recomendações de padronização feitas pela *International Society for the Advancement of Kineanthropometry* (ISAK) (MARFELL-JONES *et al.* 2011). Para caracterização da amostra, as dobras cutâneas serão apresentadas através de seu somatório.

ESPESSURA MUSCULAR

A espessura muscular dos músculos vasto lateral, reto femoral, vasto intermédio e vasto medial dos membros direito e esquerdo serão obtidas por meio de imagens a partir de um sistema de ultrassonografia B - modo (Vivid I; GE Medical Systems, Fairfield, CT) com uma sonda de matriz linear do mesmo fabricante (GE 8L; frequência: 13 MHz, profundidade: 5 cm e largura: 4 cm). Os atletas ficarão 10 minutos em decúbito dorsal com os membros inferiores estendidos e relaxados antes da avaliação, visando uma estabilização dos fluídos corporais (ARROYO *et al.* 2016). Durante a avaliação os participantes devem permanecer nessa posição. Um gel solúvel em água, o qual promove um contato acústico sem a necessidade de causar pressão sobre a pele, será aplicado sobre o local da avaliação e o transdutor será posicionado perpendicularmente à musculatura avaliada. A pressão do transdutor sobre a pele será rigorosamente controlada pelo pesquisador durante a captura das imagens. Todas as imagens vão ser captadas pelo mesmo pesquisador. O ponto para avaliação dos músculos reto femoral e vasto intermédio será marcado em dois terços da distância entre o trocânter maior e o epicôndilo lateral do fêmur (CHILIBECK *et al.*, 2004). Para o músculo vasto lateral será usado o ponto médio entre o trocânter maior e o epicôndilo lateral do fêmur (KUMAGAI *et al.*, 2000). Já para o músculo vasto medial, será capturada a imagem no local correspondente a 30% da distância entre o epicôndilo lateral e o trocânter maior do fêmur (KORHONEN *et al.*, 2009). Os pontos serão marcados com caneta dermatográfica. Serão captadas três imagens de cada músculo nos pontos marcados. A análise das imagens será realizada no programa Image - J (versão 1.37, *National Institute of Health*, Estados Unidos da América). Para a determinação da espessura do músculo vasto intermédio será identificado o tecido ósseo (fêmur) e a aponeurose superior do músculo, sendo a distância entre eles definida como a espessura muscular; para o músculo reto femoral será identificado o tecido adiposo subcutâneo superior e

a aponeurose inferior, e a maior distância entre eles será definida como a espessura muscular; para o músculo vasto lateral será identificado o tecido adiposo subcutâneo inferior e a aponeurose inferior de modo que a maior distância entre eles será assumida como a espessura; para o músculo vasto medial será identificado o tecido ósseo (fêmur) e o tecido adiposo subcutâneo inferior, e a distância entre eles será definida como a espessura muscular. A avaliação da espessura muscular dos músculos bíceps femoral e gastrocnêmio serão feitas conforme literatura prévia (CHEN *et al.*, 2011; KUMMEL *et al.*, 2017).

QUALIDADE MUSCULAR

A qualidade muscular de extensores de joelho será avaliada com a técnica de eco intensidade seguindo a metodologia de estudos prévios (ARTS *et al.*, 2010; FUKOMOTO *et al.*, 2012; LOPEZ *et al.*, 2016). Serão utilizadas as imagens obtidas para avaliar a espessura muscular (conforme descrito no item anterior). Na imagem de ultrassonografia de cada um dos músculos do quadríceps será determinada uma região de interesse, a qual abrangerá a maior área possível do músculo, evitando selecionar a fáscia muscular (ROSENBERG *et al.*, 2014). Após isso, será calculado o valor da eco intensidade utilizando uma função de histograma de escala de cinza do programa Image-J (*National Institute of Health*, EUA, versão 1.37). O valor da eco intensidade será expresso entre 0 (preto) e 255 (branco). A média dos valores de três imagens será utilizada como valores de qualidade muscular por eco intensidade (unidades arbitrárias, UA). Após a determinação de eco intensidade das porções do quadríceps, a eco intensidade do quadríceps femoral será determinada como a média dos valores das quatro porções do quadríceps femoral (reto femoral + vasto intermédio + vasto lateral + vasto medial / 4). A qualidade muscular dos músculos bíceps femoral e gastrocnêmio serão feitas também com a seleção da maior área muscular de interesse (CHEN *et al.*, 2011; KUMMEL *et al.*, 2017).

4.5.4. MARCADORES DE BEM-ESTAR E PRONTIDÃO RELACIONADOS AO EXERCÍCIO

O questionário de *Hooper* (Hooper SL, *et al.*, 1995) é um questionário simples, autoaplicável, que possui quatro marcadores de qualidade de vida: estresse, fadiga, dor muscular e qualidade do sono. Esses fatores são pontuados de 0 a 7 pontos, sendo para dor muscular (0: muito, muito pouca a 7: muito elevada), para *stress* (0: muito, muito pouco a 7: muito elevado), para fadiga (0: muito, muito pouco a 7: muito elevada) e por fim qualidade do sono (0: muito boa a 7: muito, muito ruim). (Anexo II)

Esse questionário será aplicado a cada 2 semanas, aproximadamente 30 minutos antes das sessões de treinamento, durante 6 dias da semana conforme Mendes B., *et al.*, (2018).

5. ANÁLISE DE DADOS

Os dados serão analisados inicialmente para o pressuposto de normalidade com auxílio do teste de Shapiro-Wilk. Para identificar se há associação entre o consumo alimentar e os marcadores de fadiga será utilizado o teste de correlação de *Pearson* ou *Spearman*. Para identificar a adequação dos nutrientes será utilizado o teste “T” para uma amostra. Para identificar se houve variação dos parâmetros ao longo da temporada esportiva será utilizado o teste *Generalized Estimated Equations* (GEE), com *post hoc* de Bonferroni. Será utilizado o pacote estatístico SPSS 23.0. O nível de significância adotado será de 5%.

6. QUESTÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA). O projeto seguirá todas as premissas éticas, de acordo com a resolução 466/12, preservando os voluntários de pesquisa em relação às questões éticas. Todos os participantes assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO III). Os pesquisadores só irão iniciar as coletas após aprovação pelo CEP.

Os riscos em participar desta pesquisa são considerados mínimos, e estão relacionados ao desconforto em realizar as medidas de dobras cutâneas, porém estas avaliações serão realizadas por um membro da equipe treinado e experiente afim de evitar ou minimizar qualquer desconforto, lembrando que os atletas já estão acostumados a realizar estas avaliações periodicamente no seu clube de treinamento. Além disso, o atleta poderá se sentir desconfortável em registrar toda sua alimentação, ou ainda, ao responder ao questionário de bem-estar relacionado ao exercício (com perguntas sobre dor muscular, estresse, fadiga e qualidade do sono). Importante ressaltar que caso o atleta sinta-se desconfortável ou constrangido com qualquer pergunta ou questionário, ele não precisará respondê-la. Os pesquisadores que estiverem aplicando os testes estarão atentos para qualquer sinal de desconforto, buscando sempre minimizar qualquer possível desconforto, bem como esclarecer qualquer dúvida que surja. Os testes de força e potência podem ser cansativos, entretanto, são testes que os atletas já estão acostumados a realizar no seu clube. Os atletas poderão sentir dor ou desconforto nos músculos exercitados após a realização destes testes, lembrando que essa sensação de dor é uma resposta natural ao exercício e tende a ser minimizada em até 72h. Caso haja algum teste que o atleta não conheça, os pesquisadores irão explicar e o instruir detalhadamente como funciona, para que possa ser realizado da melhor maneira possível. Caso o atleta não se sinta em condições de realizar qualquer teste, é possível reagendar para outra data ou ainda não o fazer. Iremos informá-los que todos os pesquisadores tem experiência com os testes, estão acostumados a realizá-los e irão seguir todos os protocolos para garantir sua segurança durante todas as etapas do estudo.

Um dos benefícios em participar desta pesquisa é receber os relatórios sobre as informações coletadas, como a avaliação de gordura corporal, e da ingestão alimentar. Além disso, ao final do estudo o atleta será convidado a assistir a uma palestra onde serão apresentados todos os resultados encontrados na pesquisa (resultados do grupo como um todo, sem identificação dos participantes).

Os atletas não terão gastos financeiros para participar deste estudo, mas caso ocorram serão ressarcidos pelos pesquisadores.

7. RECURSOS HUMANOS

Juliano Marques de Barros, Mestrando, Nutricionista, Aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação – UFCSPA.

Cláudia Dornelles Schneider, Orientadora, Nutricionista, Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, UFCSPA.

Ronei Silveira Pinto, Co-orientador, Prof. Educação Física, Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, UFRGS.

Rafael Grazioli, Prof. Educação Física, Estudante de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, UFRGS.

Filipe Veeck, Prof. Educação Física, Estudante de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, UFRGS.

Fernanda Cordeiro Schneider, Acadêmica do Curso de Nutrição, UFCSPA.

8. CRONOGRAMA

	2022												2023							
Etapas/mês	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08
Análise pelo CEP	x	x	x																	
Coleta de Dados (após aprovação CEP)			x	x	x	x														
Digitação banco de dados				x	x	x	x	x	x											
Análise de dados					x	x	x	x	x	x	x	x	x							
Elaboração da dissertação														x	x	x	x	x	x	
Defesa do Mestrado																				x

9. ORÇAMENTO

Material	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Ingestão alimentar			
<i>Software</i> nutricional <i>WebDiet</i>	1	649,00	649,00
Outros			
Fotocópia para os registros alimentares	2200	0,15	330,00
Composição corporal			
Adipometro Cientifico Cescorf®	1	390,00	390,00
Balança Digital Portátil	1	300,00	300,00
Estadiômetro de parede Compacto Seca 06 - SECA®	1	113,00	113,00
Fita Antropométrica Cescorf®	1	33,50	33,50
Caneta Dermatográfica	4	10,80	43,20
Gel condutor para Ultrassom (pote com 5kg)	1	20,00	20,00
Ultrassom (Vivid I; GE Medical Systems, Fairfield, CT)	1	80.000,00	80.000,00
Folhas de transparência (pacote com 10)	5	20,00	100,00
Papel toalha (pacote c/ 1000)	1	60,00	60,00
Indicadores neuromusculares			
Tapete de saltos <i>Jump System Pro</i> (CEFISF, Brasil)	1	8.350,00	8.350,00
Dinamômetro isométrico (CEFISE e MIOTEC, Brasil)	1	150.000,00	150.000,00
TOTAL			240.388,70

O *software* para análise dos dados nutricionais, bem como os equipamentos necessários para avaliação física como: adipômetro, balança, fita antropométrica, estadiômetro e caneta dermográfica pertencem aos pesquisadores. O material de escritório, gel condutor, folhas de transparência e papel toalha, e qualquer outro material que seja necessário para o desenvolvimento do projeto serão custeados pelos pesquisadores.

O ultrassom pertence ao laboratório de Fisioterapia da UFCSPA (termo de anuência anexado à Plataforma Brasil).

O tapete de saltos e dinamômetro isocinético pertencem ao Prof. Ronei S. Pinto que é Professor coorientador deste mestrado.

10. REFERÊNCIAS

BRASIL, CASA CIVIL. DECRETO-LEI Nº 3.199, DE 14 DE ABRIL DE 1941. Estabelece as bases de organização dos desportos em todo o país. Câmara do Deputados. 1941. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1940-1949/decreto-lei-3199-14-abril-1941-413238-publicacaooriginal-1-pe.html>

ANDERSON, R.; HANRAHAN, S. J.; MALLETT, C. J. Investigating the Optimal Psychological State for Peak Performance in Australian Elite Athletes. **Journal of Applied Sport Psychology**, v. 26, n. 3, p. 318–333, 2014.

ARLIANI, G. G. et al. Professional football can be considered a healthy sport? **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA**, v. 24, n. 12, p. 3907–3911, dez. 2016.

ARROYO E, et al. Effects of supine rest duration on ultrasound measures of the vastus lateralis. **Clinical physiology and functional imaging**. 2016.

ARTS, Ilse MP et al. Normal values for quantitative muscle ultrasonography in adults. **Muscle & nerve**, v. 41, n. 1, p. 32-41, 2010.

ASGHARI, G. et al. A systematic review of diet quality indices in relation to obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 8, p. 1055–1065, 2017.

ASSUMPÇÃO, D. DE et al. Diferenças entre homens e mulheres na qualidade da dieta: estudo de base populacional em Campinas, São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 2, p. 347–358, 2017.

BANGSBO, J. et al. Recreational football for disease prevention and treatment in untrained men: A narrative review examining cardiovascular health, lipid profile, body composition, muscle strength and functional capacity. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 9, p. 568–576, 2015.

BANGSBO, J., IAIA, F. M., & KRUSTRUP, P. The Yo-Yo intermittent recovery test: A useful tool for evaluation of physical performance in intermittent sports. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v.38, n. 1, p. 37–51, 2008.

BANGSBO J, MOHR M, KRUSTRUP P. Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. **J Sports Sci** 2006;24:665–74.

BANGSBO J, NØRREGAARD L, THORSØ F. Activity profile of competition soccer. **Can J Sport Sci** 1991;16:110–6.

BARONI, B. M. et al. Efeito da fadiga muscular sobre o controle postural durante o movimento do passe em atletas de futebol. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 13, n. 5, p. 348–353, 2011.

BARRON, J. L. et al. Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 803–806, 1985.

BEYNNON, B.D.; VACEK, P.M.; NEWELL, M.K.; TOURVILLE, T. W. The Effects of Level of Competition, Sport, and Sex on the Incidence of First-Time Noncontact Anterior Cruciate Ligament Injury. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 8, p. 139–148, 2017.

BLEYER, F. T. DE S. et al. Sleep and musculoskeletal complaints among elite athletes of Santa Catarina. **Rev Dor**, 2015.

BOLANOWSKI, M.; NILSSON, B. E. Assessment of human body composition using dual-energy x-ray absorptiometry and bioelectrical impedance analysis. **Medical science monitor**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1029–33, 1993.

BOCCIA, G. et al. Fatigue-induced dissociation between rate of force development and maximal force across repeated rapid contractions. **Human Movement Science**, [s. l.], v. 54, n. June, p. 267–275, 2017.

BUNNEY, P. E., ZINK, A. N., HOLM, A. A., BILLINGTON, C. J., & KOTZ, C. M. Prior shared success predicts victory in team competitions. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

CADORE, E. L. et al. Physiological effects of concurrent training in elderly men. **International Journal of Sports and Medicine**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 689–697, 2010.

CAPLING, L. et al. Validity of dietary assessment in athletes: A systematic review. **Nutrients MDPI AG**, 1 dez. 2017.

CASTILHOS, C. B. DE et al. Qualidade da dieta de jovens aos 18 anos de idade, pertencentes à coorte de nascimentos de 1993 da cidade de Pelotas (RS), Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3309–3318, 2015.

CBF, C. B. DE F. **Regulamento de Licença de Clubes**, 2017. Disponível em: https://cdn.cbf.com.br/content/201702/20170208174032_0.pdf

CHEN, Trevor C. et al. Comparison in eccentric exercise-induced muscle damage among four limb muscles. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 2, p. 211–223, 2011.

CLARK, M. et al. Pre- and post-season dietary intake, body composition, and performance indices of NCAA division I female soccer players. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 303–319, 2003.

COELHO, D. B. et al. Avaliação da demanda fisiológica aguda no futebol. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 15, n. 6, p. 667–676, 2013.

COLLINS, J. et al. UEFA expert group statement on nutrition in elite football. Current evidence to inform practical recommendations and guide future research. **Br J Sports Med**. 2021 Apr;55(8):416. doi: 10.1136/bjsports-2019-101961. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33097528.

COOK, Gray; BURTON, Lee; HOOGENBOOM, Barb. Pre-Participation Screening: The Use of Fundamental Movements As An Assessment of Function–Part 1. **North American Journal of Sports Physical Therapy**, v. 1, n. 2, p. 62, 2006.

CORATELLA, G.; BEATO, M.; SCHENA, F. The specificity of the Loughborough Intermittent Shuttle Test for recreational soccer players is independent of their intermittent running ability. **Research in Sports Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 363–374, 2016.

CUNHA, Giovani dos Santos et al. Aerobic fitness profile of youth soccer players: effects of chronological age and playing position. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 18, n. 6, p. 700-712, 2016.

CUNHA, Giovani et al. Effect of biological maturation on maximal oxygen uptake and ventilatory thresholds in soccer players: **An allometric approach. Journal of sports sciences**, v. 29, n. 10, p. 1029-1039, 2011.

DE VILLARREAL ES, GONZÁLEZ-BADILLO JJ, IZQUIERDO M. Low and moderate plyometric training frequency produces greater jumping and sprinting gains compared with high frequency. **J Strength Cond Res**. 2008 May;22(3):715-25. doi: 10.1519/JSC.0b013e318163eade. PMID: 18438249.

DORREL, Bryan S. et al. Evaluation of the Functional Movement Screen as an Injury Prediction Tool Among Active Adult Populations: **A Systematic Review and Meta-analysis. Sports Health**, v. 7, n. 6, p. 532–537, 2015.

DA COSTA LOUZADA, M. L. et al. Healthy eating index in southern brazilian older adults and its association with socioeconomic, behavioral and health characteristics. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 16, n. 1, p. 3–7, 2012.

Dietary Reference Intakes: for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. **Washington, D.C., National Academy Press**, 1997, 432 p.

Dietary Reference Intakes: for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. **Washington, D.C., National Academy Press**, 2000, 506 p.

Dietary Reference Intakes: for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, D.C., **National Academy Press**, 2000, 564 p.

EDWARDS, R. H. Human muscle function and fatigue. **Ciba Foundation symposium**, v. 82, p. 1–18, 1981.

EKSTRAND, J. et al. Upper extremity injuries in male elite football players.

Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, v. 21, n. 7, p. 1626–1632, jul. 2013.

FERRAUTI A, HT G, MERHEIM G, et al. Indirekte Kalorimetrie Im Fußball indirect calorimetry in a soccer game. **Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin** 2006;57:142–6.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; COLUCCI, A. C. A. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 617–624, 2009.

FISBERG, R. M.; PICHETH, T. Programa Bolsa-Família : qualidade da dieta de população adulta do município de Curitiba - PR, Paraná. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 1, p. 58–67, 2013.

GALAMBOS, S. A. et al. Psychological predictors of injury among elite athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 6, p. 351–354, 2005.

GARCÍA, P. M. R. et al. Nutrient intake and food habits of soccer players: Analyzing the correlates of eating practice. **Nutrients**, 2014.

GUEDES, Dartagnan Pinto; GUEDES, Joana Elisabete Ribeiro Pinto. **Manual prático para avaliação em educação física**. Barueri, SP: Manole, 2006. p. 485.

GUENTHER, P. M.; REEDY, J.; KREBS-SMITH, S. M. Development of the Healthy Eating Index-2005. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 11, p. 1896–1901, 2008.

GUERRA, I.; SOARES, E. DE A.; BURINI, R. C. Aspectos nutricionais do futebol de competição. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 6, p. 200–206, 2001.

HAMMAMI, Mehréz et al. Effects of lower-limb strength training on agility, repeated sprinting with changes of direction, leg peak power, and neuromuscular adaptations of soccer players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, 2017.

HÄGGLUND, M.; WALDÉN, M.; EKSTRAND, J. Injuries among male and female elite football players. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 19, n. 6, p. 819–827, 2009.

HAUGEN T, TØNNESEN E, HISDAL J, SEILER S. The role and development of sprinting speed in soccer. **Int J Sports Physiol Perform**. 2014 May;9(3):432-41. doi: 10.1123/ijsp.2013-0121. PMID: 23982902.

HOOPER, S. L.; MACKINNON, L. T. Monitoring Overtraining in Athletes: Recommendations. **Sports Medicine**, v. 20, n. 5, p. 321–327, 1995.

JAIME, P. C. et al. Diet quality index adjusted for energy requirements in adults. **Cadernos de Saude Publica**, v. 26, n. 11, p. 2121–2128, 2010.

JENNER, S. L. et al. Dietary intake of professional Australian football athletes surrounding body composition assessment. p. 1–8, 2018.

KENNEDY, E. T.; OHLS, J.; CARLSON, S.M.A.; FLEMING, K. The Healthy Eating Index: Design and applications. **Journal of the American Dietetic Association**, 1995.

KERKSICK, C. M. et al. ISSN exercise & sports nutrition review update: Research & recommendations. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 1–57, 2018.

KHALLADI, K. et al. Inter-relationship between sleep quality, insomnia and sleep disorders in professional soccer players. **BMJ Open Sport and Exercise Medicine**, v. 5, n. 1, 1 abr. 2019.

KIM, S. et al. The Diet Quality Index-International (DQI-I) Provides an Effective Tool for Cross-National Comparison of Diet Quality as Illustrated by China and the United States. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3476–3484, 2003.

KIRKPATRICK, S. I. et al. Dietary assessment in food environment research: A systematic review. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 46, n. 1, p. 94–102, jan. 2014.

KIRKPATRICK, S. I. et al. Update of the Healthy Eating Index: HEI-2015.

Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, v. 118, n. 9, p. 1591–1602, 2018.

KORHONEN, Marko T. et al. Biomechanical and skeletal muscle determinants of maximum running speed with aging. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 41, n. 4, p. 844-856, 2009.

KRAUS, Kornelius et al. Efficacy of the Functional Movement Screen: a review. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 28, n. 12, p. 3571-3584, 2014.

KÜMMEL, Jakob et al. Conditioning hops increase triceps surae muscle force and achilles tendon strain energy in the stretch-shortening cycle. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, p. 1–12, 2017.

LEÃO, C. et al. Anthropometric Profile of Soccer Players as a Determinant of Position Specificity and Methodological Issues of Body Composition Estimation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 13, p. 2386, 5 jul. 2019.

LONGO, U. G. et al. Performance Activities and Match Outcomes of Professional Soccer Teams during the 2016/2017 Serie A Season. **Medicina**, v. 55, n. 8, p. 469, 12 ago. 2019.

LOOSE, O. et al. Injury incidence in semi-professional football claims for increased need of injury prevention in elite junior football. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 27, n. 3, p. 978–984, 14 mar. 2019.

MAFFIULETTI, Nicola A. et al. Rate of force development: physiological and methodological considerations. **European journal of applied physiology**, v. 116, n. 6, p. 1091-1116, 2016.

MARFELL-JONES, M.; STEWART, A.; OLDS, T.; RIDDER, H. **International standards for anthropometric assessment**.

MENDES, A. et al. The diet quality index evaluates the adequacy of energy provided by dietary macronutrients. **Revista de Nutrição**, v. 28, n. 4, p. 341–

348, 2015.

MENDES B, Palao JM, Silvério A, Owen A, Carriço S, Calvete F, Clemente FM. Daily and weekly training load and wellness status in preparatory, regular and congested weeks: a season-long study in elite volleyball players. **Res Sports Med.** 2018 Oct-Dec;26(4):462-473. doi: 10.1080/15438627.2018.1492393. Epub 2018 Jul 3. PMID: 29969288.

MOHR, M. et al. Match performance of high-standard soccer players with special reference to development of fatigue. **J Sports Sci.** 2003; 21: 519-528.

MORAIS, D. DE C. et al. Aspectos metodológicos da avaliação da qualidade da dieta no Brasil: revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2671–2680, 2017.

MOREIRA, R. et al. Assessment of nutrients intake of children in a charity daycare center: application of Dietary Reference Intake. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, v. 7, n. 2, p. 159–166, 2007.

MORIMOTO, J. M. et al. Fatores associados à qualidade da dieta de adultos residentes na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil, 2002. **Cadernos de**

MORTON RW, MURPHY KT, MCKELLAR SR, et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training- induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. **Br J Sports Med** 2018;52:376–84.

Saúde Pública, v. 24, n. 1, p. 169–178, 2008.

NARDONE, A. et al. Fatigue effects on body balance. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 105, n. 4, p. 309–20, ago. 1997.

NESPECA, M.; CYRILLO, D. C. Avaliação da qualidade da dieta por meio do índice de alimentação saudável de funcionários de uma universidade pública. **Nutrire**, v. 35, n. 2, p. 81–90, 2010.

NETTO, D. C. et al. Avaliação prospectiva das lesões esportivas ocorridas

durante as partidas do Campeonato Brasileiro de Futebol em 2016. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 54, n. 03, p. 329–334, 2019.

NOH, J. W. et al. Somatotype and body composition analysis of korean youth soccer players according to playing position for sports physiotherapy research. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 27, n. 4, p. 1013–1017, 2015.

OHAYON, M. et al. National Sleep Foundation's sleep quality recommendations: first report. **Sleep Health**, v. 3, n. 1, p. 6–19, 1 fev. 2017.

OLIVEIRA, C. et al. Nutrition and Supplementation in Soccer. **Sports**, v. 5, n. 2, p. 28, 2017.

PEDRAZA, D. F.; MENEZES, T. N. . Questionários de Frequência de Consumo Alimentar desenvolvidos e validados para população do Brasil: revisão da literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 20, p. 2697–2720, 2015.

PREVIATO, H. D. R. A.; VOLP, A. C. P.; FREITAS, R. N. Avaliação da qualidade da dieta pelo Índice de Alimentação Saudável e suas variações: Uma revisão bibliográfica. **Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria**, v. 34, n. 2, p. 88–96, 2014.

PREVIDELLI AN, ANDRADE SC, PIRES MM, FERREIRA SG, FISBERG RM, et al. Índice de Qualidade da Dieta Revisado para população brasileira. **Revista de saude publica**, v. 45, n. 4, p. 794–798, 2011.

PHILLIPS SM, FULGONI VL, HEANEY RP, et al. Commonly consumed protein foods contribute to nutrient intake, diet quality, and nutrient adequacy. **Am J Clin Nutr** 2015;101:1346S–52.

REIS N.T.; CALIXTO-LIMA, L. **Nutrição clínica - Bases para prescrição**. 1 ed. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

RIBEIRO RN, Costa LOP. Análise epidemiológica de lesões no futebol de salão durante o XV Campeonato Brasileiro de Seleções Sub 20. **Rev Bras Med do Esporte**. 2006; 12: 2-6.

RIENZI, E. et al. Investigation of anthropometric and work-rate profiles of elite

South American international soccer players. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 40, n. 2, p. 162–169, 2000.

RODRIGUES, P. R. M. et al. Viabilidade do uso de pergunta simplificada na avaliação da qualidade da dieta de adolescentes. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1565–1578, 2017.

ROSENBERG, Joseph G. et al. Reliability of panoramic ultrasound imaging to simultaneously examine muscle size and quality of the medial gastrocnemius. **Muscle & nerve**, v. 49, n. 5, p. 736-740, 2014.

SAHALY, R. et al. Maximal voluntary force and rate of force development in humans importance of instruction. **European Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 3, p. 345 350, 2001.

SCANDONE, D. R.; GIACOMELLI, L. Diet quality among adolescents: a population-based study in Campinas, Brazil. v. 15, n. 3, p. 605–616, 2012.

SLIMANI, M.; NIKOLAIDIS, P. T. Anthropometric and physiological characteristics of male soccer players according to their competitive level, playing position and age group: A systematic review. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, p. 141–163, 2019.

STRUDWICK T. Soccer Science. **Hum Kinects. Published online** 2016.

SUAREZ-ARRONES, L. et al. Effects of Strength Training on Body Composition in Young Male Professional Soccer Players. **Sports**, v. 7, n. 5, p. 104, 2019.

OPAR DA, et al. A novel device using the Nordic hamstring exercise to assess eccentric knee flexor strength: a reliability and retrospective injury study. **The Journal of orthopaedic and sports physical therapy**, v. 43, n. 9, p. 636-640, 2013.

OPAR DA, et al. The effect of previous hamstring strain injuries on the change in eccentric hamstring strength during preseason training in elite Australian footballers. **American Journal of Sports Medicine**, v. 43, n. 2, p. 377-384, 2015.

THOMAS, D.T.; ERDMAN, K.A.; BURKE, L. M. American College of Sports Medicine Joint Position Statement. Nutrition and Athletic Performance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 48, n. 5, 2016.

VAN DE HOEF, P. A. et al. Does a bounding exercise program prevent hamstring injuries in adult male soccer players? – A cluster-RCT. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 29, n. 4, p. 515–523, 2019.

VIGNE, G. et al. Activity profile in elite Italian soccer team. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 5, p. 304–310, 2010.

VITOLO, M. R. et al. Maternal Dietary Counseling in the First Year of Life Is Associated with a Higher Healthy Eating Index in Childhood. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 11, p. 2002–2007, 2010.

WEBER FS, da Silva BGC, Radaelli R, Paiva C, Pinto RS. Avaliação isocinética em jogadores de futebol profissional e comparação do desempenho entre as diferentes posições ocupadas no campo. **Rev Bras Med do Esporte**. 2010; 16: 264-268.

ANEXO I - REGISTRO ALIMENTAR

DIA ____/____/____				
Nome: _____				
	Horário	Alimentos / Bebidas/ Suplementos	Quantidade	Obs:
MANHÃ				
ALMOÇO				
TARDE				
NOITE				

ANEXO II - ÍNDICE DE HOOPER

ATLETA	Dia:				Dia:				Dia:			
	DOR MUSCULAR (0 - 7)	STRESS (0 - 7)	FADIGA (0 - 7)	QUALIDADE DO SONO (0 - 7)	DOR MUSCULAR (0 - 7)	STRESS (0 - 7)	FADIGA (0 - 7)	QUALIDADE DO SONO (0 - 7)	DOR MUSCULAR (0 - 7)	STRESS (0 - 7)	FADIGA (0 - 7)	QUALIDADE DO SONO (0 - 5)
	0: muito, muito pouca; 7: muito elevada	0: muito, muito pouco; 7: muito elevado	0: muito, muito pouco; 7: muito elevada	0: muito boa; 7: muito, muito ruim	0: muito, muito pouca; 7: muito elevada	0: muito, muito pouco; 7: muito elevado	0: muito, muito pouco; 7: muito elevada	0: muito boa; 7: muito, muito ruim	0: muito, muito pouca; 7: muito elevada	0: muito, muito pouco; 7: muito elevado	0: muito, muito pouco; 7: muito elevada	0: muito boa; 5: muito, muito ruim
ATLETA	Dia:				Dia:				Dia:			
	DOR MUSCULAR (0 - 7)	STRESS (0 - 7)	FADIGA (0 - 7)	QUALIDADE DO SONO (0 - 7)	DOR MUSCULAR (0 - 7)	STRESS (0 - 7)	FADIGA (0 - 7)	QUALIDADE DO SONO (0 - 7)	DOR MUSCULAR (0 - 7)	STRESS (0 - 7)	FADIGA (0 - 7)	QUALIDADE DO SONO (0 - 5)
	0: muito, muito pouca; 7: muito elevada	0: muito, muito pouco; 7: muito elevado	0: muito, muito pouco; 7: muito elevada	0: muito boa; 7: muito, muito ruim	0: muito, muito pouca; 7: muito elevada	0: muito, muito pouco; 7: muito elevado	0: muito, muito pouco; 7: muito elevada	0: muito boa; 7: muito, muito ruim	0: muito, muito pouca; 7: muito elevada	0: muito, muito pouco; 7: muito elevado	0: muito, muito pouco; 7: muito elevada	0: muito boa; 5: muito, muito ruim

ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa denominada **“Consumo alimentar, composição corporal e desempenho neuromuscular em atletas profissionais de futebol”** e este termo de consentimento lhe trará informações sobre o estudo. Pedimos que você leia com atenção, e use o tempo que achar necessário, para que entenda o objetivo do estudo e o seu envolvimento como voluntário. Caso você queira mais detalhes ou informações sobre a pesquisa, sinta-se à vontade para perguntar. O objetivo deste estudo é “acompanhar parâmetros dietéticos, desempenho neuromuscular, composição corporal, bem-estar relacionado ao exercício e incidência de lesões em atletas de futebol masculino ao longo de uma temporada esportiva”. Esta investigação poderá fornecer dados relevantes para o planejamento nutricional dos atletas.

A sua participação nesta pesquisa se dará em horários pré-determinados, conforme a sua disponibilidade, no local onde você costuma realizar o treinamento, ou seja, você não terá de se deslocar para nenhum lugar em função da pesquisa. Não se preocupe que as avaliações desta pesquisa possam atrapalhar a sua rotina de treinos, pois o seu treinador está sabendo e concorda com a sua participação na pesquisa. A sua participação será necessária em 3 momentos ao longo da temporada esportiva. Precisaremos informações sobre: (1) sua alimentação no dia-a-dia, para isso você precisará anotar tudo o que comer durante 3 dias (lhe forneceremos folhas para isso e explicaremos como anotar); (2) serão realizadas algumas medidas para avaliar a sua composição corporal (peso, altura e quantidade de gordura corporal – para fazer estas medidas é usado um equipamento chamado adipômetro, parecido com uma pinça, que vai medir a quantidade de gordura em algumas regiões do corpo, como braço, perna, costas e barriga) (duração de ~30min); além disso, será feita uma avaliação com ultrassom nos músculos da coxa. Você só precisa ficar deitado em uma maca em repouso por ~30 min. Essa avaliação com ultrassom é um exame de imagem que não causa nenhuma dor ou desconforto. (3) serão realizados alguns testes de força e potência das suas pernas. Você já realiza a maioria destes testes no seu dia-a-dia de treinamento, como o teste de saltos e o teste de força de perna) (duração $\pm$ 1h). Além disso, ao longo da temporada esportiva, a cada 2

semanas, gostaríamos que você preenchesse um questionário sobre a sua percepção quanto à dor muscular, estresse, fadiga e qualidade do seu sono. Este questionário deve ser preenchido aproximadamente 30 minutos antes das suas sessões de treinamento (duração ~5min).

Os riscos em participar desta pesquisa são considerados mínimos, e estão relacionados ao seu desconforto em realizar as medidas de dobras cutâneas, mas estas avaliações serão realizadas por um membro da equipe treinado e bastante experiente afim de evitar ou minimizar qualquer desconforto, lembrando que estas medidas você já está acostumado a realizar no seu local de treinamento. Além disso, você pode se sentir desconfortável em responder algumas das perguntas sobre sua alimentação, dor muscular, estresse, fadiga e qualidade do sono. Caso você venha sentir-se constrangido com alguma pergunta, você não precisará respondê-la. As perguntas são simples e você terá privacidade para responder sozinho, além disso, nos questionários não estará o seu nome, somente um código, para evitar qualquer tipo de constrangimento. Também gostaríamos de dizer que caso você tenha qualquer dúvida sobre os testes ou questionários pode pedir auxílio aos pesquisadores, que estarão sempre disponíveis para lhe ajudar e esclarecer dúvidas. E se mesmo assim não quiser responder a algum teste (inteiro ou em parte), não haverá nenhum problema, nem com a equipe de pesquisa nem com seu clube de treinamento. Você é livre para participar e responder somente o que tiver vontade. Os testes de força e potência podem ser cansativos, entretanto, são testes que você já está acostumado a fazer de vez em quando no seu clube. Você pode sentir alguma dor ou desconforto nos músculos exercitados nos testes de força e potência, mas essa dor é uma resposta natural ao exercício e costuma passar em até 72h. Caso haja algum teste que você não conheça, os pesquisadores irão lhe explicar e mostrar detalhadamente como funciona, para que você possa realizá-lo da melhor maneira possível. Caso você não se sinta em condições de realizar qualquer teste, é possível reagendar para outra data ou ainda não fazê-lo. Gostaríamos que você soubesse que todos os pesquisadores tem experiência com os testes, que estão acostumados a realizá-los e que vão seguir todos os protocolos para garantir sua segurança durante todas as etapas do estudo. Caso ocorra qualquer problema ou complicação decorrente dos testes

realizados para esta pesquisa, os pesquisadores se responsabilizam em fornecer o suporte adequado para o tratamento, sem custos para o participante.

Um dos benefícios de participar desta pesquisa é receber os relatórios sobre as informações coletadas, como a sua avaliação de gordura corporal e a avaliação do seu perfil alimentar. Além disso, ao final do estudo você será convidado a assistir a uma palestra onde serão apresentados todos os resultados encontrados na pesquisa (resultados do grupo como um todo, sem identificação dos participantes).

Você tem liberdade para desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem que isto traga qualquer tipo de prejuízo a você. É importante destacar que você não terá gastos financeiros para participar deste estudo, mas caso ocorra qualquer gasto, comprovadamente relacionado com a pesquisa, você será ressarcido pelos pesquisadores. Da mesma forma, não haverá remuneração financeira pela sua participação como voluntário. Caso haja qualquer prejuízo comprovadamente decorrente desta pesquisa, haverá garantia de indenização pelos pesquisadores.

Os pesquisadores garantem manutenção de sigilo e privacidade de suas informações durante todas as fases do estudo. Serão divulgados apenas os resultados médios dos grupos por meio de publicações científicas em congressos e/ou revistas especializadas, sendo que o nome dos participantes será mantido em absoluto sigilo. Além disso, os dados obtidos na pesquisa não serão utilizados para outros fins além dos previstos neste projeto.

A assinatura deste termo de consentimento, em duas vias, indica que você entendeu todas as informações sobre a sua participação neste projeto e você concorda em participar como voluntário. Uma das vias permanece com você e a outra fica com o pesquisador. De forma alguma esse consentimento lhe faz renunciar aos seus direitos legais, e nem libera os investigadores ou instituição envolvida de suas responsabilidades pessoais e/ou profissionais. Se tiver qualquer dúvida referente a assuntos relacionados com esta pesquisa, favor contatar o pesquisador responsável no telefone indicado a seguir, ou o aluno de mestrado Juliano Marques de Barros pelo telefone (51) 99830-7070, ou ainda o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Dados de Identificação do Pesquisador Responsável:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Dornelles Schneider

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite, 245 - Departamento de Nutrição – Porto Alegre, RS.

Telefone: (51) 3303-8830

e-mail: claudias@ufcspa.edu.br

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA:

Rua Sarmento Leite, 245, sala 407, Prédio 3 - CEP 90.050-170 – Porto Alegre, RS

Telefone: (51) 3303-8804

e-mail: cep@ufcspa.edu.br

Nome do Participante: _____

Assinatura do Participante: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

(Cidade e data), _____, ____ de _____ de 20__

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Programa de Pós-Graduação Ciências da Reabilitação

PROJETO DE PESQUISA

TRATAMENTO DA HIPOSSALIVAÇÃO COM *TRANSCUTANEOUS ELECTRIC NERVE STIMULATION* E CARACTERÍSTICAS VOCAIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO PÓS-RADIOTERAPIA

Fg^a Ms.Vera Beatris Martins

Orientador: Dr. Fabrício Edler Macagnan

Porto Alegre, fevereiro de 2021

SUMÁRIO

Resumo	3
Introdução	4
Problema da Pesquisa	5
Justificativa	5
Objetivos	6
Revisão da Literatura	7
Materiais de Métodos	10
Fluxograma	14
Orçamento	18
Referencias bibliográficas	19
Anexos e Apêndices	24
Apêndice A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	25
Apêndice B - Anamnese e Avaliação	29
Apêndice C - Ficha de Avaliação Médica e Exame de Nasofibrolaringoscopia	32
Apêndice D - Protocolo de Gravação de Voz	33
Anexo B- Protocolo do Índice de Desvantagem Vocal -IDV	34
Anexo C - Protocolo de Análise Perceptivoauditiva - Escala GRBASI	35

Resumo

Pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia podem apresentar sintomas de xerostomia em decorrência da hipossalivação das glândulas salivares presentes no campo irradiado. A saliva é importante para a hidratação e lubrificação do aparelho fonador, influenciando a produção da voz. Pacientes com hipossalivação podem apresentar dificuldades na emissão vocal. A *Transcutaneous Electric Nerve Stimulation* vem demonstrando resultados positivos no que se refere ao aumento do fluxo salivar. Não existem, no entanto, estudos que avaliem a eficácia do tratamento da hipossalivação com *Transcutaneous Electric Nerve Stimulation* sobre a voz. Em função disso, o objetivo principal desta pesquisa é analisar o efeito da *Transcutaneous Electric Nerve Stimulation* sobre a hipossalivação e sobre a voz de pacientes com câncer de cabeça e pescoço pós-radioterapia. Trata-se de um ensaio clínico do tipo *Cross-over*. Serão incluídos 50 pacientes. Estes pacientes serão submetidos a doze sessões de eletroestimulação. No momento controle será mensurada a saliva no primeiro encontro, além das avaliações de voz e exame de nasofibrolaringoscopia. Após 15 dias será coletada apenas saliva. Finalmente no 30º dias será coletada a saliva novamente e repetidas todas as avaliações iniciais. Na semana seguinte iniciar-se-á a eletroestimulação, duas vezes por semana durante seis semanas. Na última sessão, além da eletroestimulação, todas as avaliações serão repetidas. O volume de saliva será mensurado antes e após cada eletroestimulação por meio da técnica *spitting*. As características acústicas e perceptivoauditivas da voz serão mensuradas por meio de programa computadorizado e escala GRBASI. A qualidade de vida em voz será avaliada pelo protocolo *Voice Handicap Index* / Índice de Desvantagem Vocal. Os resultados serão analisados estatisticamente e discutidos com a literatura.

Palavras Chave: Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea; hipossalivação; xerostomia; qualidade vocal; análise acústica; radioterapia; neoplasias de cabeça e pescoço

Introdução

As principais modalidades de tratamento para as neoplasias de cabeça e pescoço são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, isoladas ou associadas. A modalidade do tratamento será definida em função do tipo celular e grau de diferenciação, local e extensão do tumor primário, presença de metástases linfonodais, das características macroscópicas do tumor e do comprometimento ósseo e muscular¹.

Outra fator muito importante para definir o tratamento é a possibilidade de preservação da fala, da salivação e do mecanismo da deglutição, sem comprometer o limite oncológico¹.

A radioterapia é o tratamento que usa a radiação ionizante com o objetivo de impedir a replicação das células neoplásicas. Pode ser iniciada com o objetivo curativo, adjuvante (no pré ou no pós-operatório) ou como tratamento paliativo. O tratamento provoca efeitos colaterais que ocorrem quando células normais localizadas dentro do campo de tratamento sofrem dano temporário ou permanente.

Pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de tumores em região de cabeça e pescoço, podem apresentar alterações nas funções de mastigação, deglutição, da voz, da fonação e audição. A irradiação local pode afetar de maneira irreversível a produção e a qualidade da saliva nas glândulas salivares principais e secundárias. A xerostomia, definida como uma sensação subjetiva de boca seca, que geralmente implica em uma diminuição acentuada na secreção da saliva, é um sintoma muito encontrado em pacientes que se submetem ao tratamento de radioterapia de cabeça e pescoço.

A saliva é importante para a deglutição, mastigação, gustação, nutrição, saúde bucal e a possibilidade do uso de próteses dentárias^{2,3}. A sua ausência ou diminuição causa um impacto negativo na qualidade de vida destes pacientes. Ela contribui para a hidratação e lubrificação de todo o aparelho fonador, sendo estes fatores importantes para a produção da voz. O movimento em ondas das pregas vocais é necessário para a saúde orgânica e funcional do aparelho fonador e precisa de uma mucosa íntegra. Para tal, o grau de hidratação assume importante papel.

Pesquisas têm demonstrado a importância da hidratação laríngea para boa qualidade vocal⁴. Por outro lado, alguns trabalhos demonstram o efeito negativo da xerostomia sobre a função vocal^{5,6} e reforçam a necessidade da reabilitação do aparelho fonador.

A *Transcutaneous Electric Nerve Stimulation* (TENS) vem demonstrando resultados positivos no que se refere ao tratamento da hipossalivação induzida por radioterapia promovendo aumento do fluxo salivar⁷. É uma técnica razoavelmente nova para esta finalidade e por isso há um número limitado de pesquisas que tenham testado seu efeito sobre a hipossalivação observada em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados com radioterapia.

Além disso, não existem, até o momento, estudos avaliando a eficácia da TENS sobre a voz de pacientes com hipossalivação. A alteração vocal em consequência da xerostomia ou hipossalivação induzida pela radiação é comum^{5,6} e, portanto, uma tentativa de restaurar a produção de saliva pode ser útil para a lubrificação do aparelho fonador e, talvez, possa contribuir para a qualidade da produção da voz. Assim, o objetivo deste estudo é analisar o efeito da *Transcutaneous Electric Nerve Stimulation* (TENS) sobre a hipossalivação e sobre a voz de pacientes com câncer de cabeça e pescoço pós-radioterapia.

Problema de pesquisa

Embora haja considerável número de pesquisas que identificam a redução salivar como um evento frequente ao longo do tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço, poucos estudos avaliam o tratamento desta disfunção. Mais recentemente, a aplicação da TENS vem demonstrando reverter esse quadro de hipossalivação ao recuperar a perda do fluxo salivar observado nestes pacientes. No entanto, em nenhum momento houve avaliação da interferência do baixo volume de saliva sobre a voz dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia. Por essa razão, questiona-se se o tratamento da hipossalivação através da TENS influenciará positivamente as características vocais de tais pacientes.

Justificativa

A redução do fluxo salivar é uma sequela frequente após a radioterapia para neoplasias de cabeça e pescoço, que pode influenciar negativamente as funções estomatognáticas, entre elas a voz, principal meio de comunicação do ser humano, comprometendo assim a qualidade de vida. Existem pesquisas que abrangem tratamentos para o aumento do fluxo salivar, em sua

maioria, envolvendo o uso de medicamentos como a pilocarpina e metacolina dentre outros⁸. No entanto há evidências de efeitos adversos e contraindicações apontando certas limitações deste método de tratamento^{9,10}. Logo, é importante estudar o efeito de tratamentos alternativos que possam melhorar a hipossalivação e as características vocais desses pacientes.

A TENS já aparece nesse cenário como opção terapêutica capaz de promover efeitos equivalente e até superiores ao tratamento farmacológico⁷. A eletroestimulação pode ser uma opção capaz de atingir um público maior, com melhor relação custo/benefício além do menor risco de efeitos adversos quando comparado ao tratamento farmacológico. A possibilidade do aumento do fluxo salivar com subsequente benefício sobre a voz neste quadro clínico e, o baixo custo do tratamento, quando comparado às demais técnicas, justificam a realização deste estudo na busca de evidências científicas para tratamentos alternativos com melhor relação custo/benefício. apresenta boa relação risco/benefício.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o efeito da TENS sobre a hipossalivação e sobre a voz de pacientes com câncer de cabeça e pescoço pós-radioterapia.

Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros vocais por meio das análises perceptivoauditivas e acústica e o volume salivar de pacientes com câncer da cabeça e pescoço que evoluíram com hipossalivação após tratamento radioterápico.
- Verificar o efeito da reabilitação da função das glândulas salivares com eletroestimulação sobre as características vocais perceptivoauditivas e acústicas e sobre o volume saliva.
- Verificar o impacto da hipossalivação sobre a qualidade de vida antes e após o tratamento com TENS.
- Verificar a correlação entre as características vocais perceptivoauditivas e acústicas e a hipossalivação antes e após o tratamento com TENS.

REVISÃO DE LITERATURA

A radioterapia usa a radiação ionizante principalmente para as neoplasias malignas¹¹. Pode ser iniciada com o objetivo curativo, adjuvante (no pré ou no pós-operatório) ou como tratamento paliativo. Os efeitos colaterais agudos permanecem até três meses após o início da radioterapia, em células que se dividem rapidamente, tais como células epiteliais, membranas mucosas, folículos pilosos e medula óssea. Após o término do tratamento radioterápico, a alteração aguda, geralmente, é reparável dentro deste período de três meses. Por outro lado, os efeitos colaterais crônicos surgem a partir de seis meses e podem perdurar por anos após a radioterapia. Tais efeitos se observam em células que se dividem lentamente, como em músculos e vasos sendo que o dano nesses tecidos é, em geral, permanente^{11,12}.

Pacientes submetidos a radioterapia em região de cabeça e pescoço, podem apresentar alterações nas funções de mastigação, deglutição, voz, fala e audição¹³. O tratamento provoca efeitos colaterais que ocorrem quando células normais localizadas dentro do campo de tratamento sofrem dano temporário ou permanente. Os efeitos observáveis são: mucosite, xerostomia, alteração ou perda do paladar e sensibilidade, inapetência, odinofagia, emagrecimento, desidratação, dificuldade para falar, comer e dormir, trismo, fibrose, osteorradionecrose, necrose de tecido, cáries dentárias, doença periodontal, dermatite, perda da audição, edema de laringe¹⁴. Os mais comumente apresentados são a mucosite e a xerostomia¹⁵.

A radioterapia na região da cabeça e pescoço pode afetar de maneira irreversível a quantidade e a qualidade da saliva produzida nas glândulas salivares principais e secundárias. A saliva apresenta pH neutro e é composta por 99% de água e o restante por proteínas (enzimas e imunoglobulinas) e outros compostos inorgânicos (bicarbonato, sódio, potássio, cálcio, cloreto e flúor). A saliva é importante para a digestão dos alimentos; proteção dos dentes contra cáries; prevenção de infecções bacterianas e fúngicas, além de tornar possível a mastigação e a deglutição¹⁶.

Dentre as alterações mais observadas nos pacientes após a radioterapia de cabeça e pescoço está a sensação de boca seca (xerostomia) quando as glândulas salivares principais e secundárias se encontram no campo de irradiação. A redução da quantidade da saliva produzida está normalmente associada à fibrose das estruturas que compõem as glândulas salivares. O limiar de dose para a ocorrer a xerostomia/ hipossalivação temporária gira em torno de 20 Grays (GY). Danos mais intensos e até mesmo definitivos na produção salivar ocorrem a partir

de 60 GY¹. O diagnóstico da xerostomia se baseia em impressões subjetivas e quadro clínico que envolve alterações estomatognáticas (perda gustativa, redução da eficiência da mastigação, dificuldade na deglutição, entre outros), modificação na qualidade da saliva (redução do pH, e modificação dos elementos constituintes da saliva) que elevam o risco de desenvolvimento de cáries e alterações periodontais acarretando, inclusive, prejuízos perceptíveis na fala^{2,3,13,17}.

A saliva é um fator importante para a lubrificação e hidratação do sistema fonador. A falta ou diminuição da saliva pode causar alterações na hidratação da laringe interferindo na produção da voz¹⁸. A vocalização é realizada através da passagem de ar que vem dos pulmões pela laringe, fazendo vibrar as pregas vocais para dessa maneira produzir as ondas mecânicas que compõem som da voz humana. A produção da voz considerada normal, ocorre quando as ondas sonoras são geradas com o máximo de proveito e com o mínimo de esforço físico¹⁹. É fundamental para a qualidade vocal, a presença de tecidos flexíveis que possibilitem a vibração necessária para gerar a frequência fundamental, composta por um número suficiente de harmônicos definidos e amplos para promover com clareza a comunicação oral. Um dos fatores mais importantes para a produção natural da é a hidratação laríngea, pois na falta de hidratação é possível observar sinais típicos de acúmulo de secreção sobre a mucosa das pregas vocais, que se torna tanto mais viscosos quanto maior for o estado de desidratação^{20,21}. Observa-se também, brilho laríngeo atípico e, nos casos mais acentuados, linha atrófica de mucosa caracterizando o quadro de desidratação denominado síndrome de desidratação laríngea (SICCA)⁴.

Estudos demonstram que o grau de hidratação das pregas vocais determina a produção natural da voz por interferir no limiar de pressão fonatória, ou seja, quanto maior a desidratação maior será a viscosidade do tecido e portanto maior será o limiar de pressão fonatória^{22, 23}. Outros autores afirmam que ao ingerir água a viscosidade do tecido reduz e a flexibilidade tecidual aumenta facilitando a vibração das pregas vocais.²⁴ Para promover a hidratação laríngea, tanto sistêmica como superficialmente, pode-se usar drogas mucolíticas, aumento da umidade do ar ou aumento no consumo de água²⁵. Outras opções de tratamento incluem estimulantes salivares mecânicos (goma de mascar sem açúcar, sucos cítricos), medicamentos (pilocarpina, metacolina entre outros),⁸ saliva artificial, mas em geral tais medidas acompanham grande leque de efeitos adversos e por terem curto prazo de efeito são considerados tratamentos paliativos para pacientes com câncer de cabeça e pescoço que evoluem com hipossalivação após três meses do término da radioterapia.

Estudos recentes sugerem que o tratamento da hipossalivação através da TENS pode aumentar o fluxo salivar após estimulação elétrica^{26,27,28,29}. Esta técnica se mostrou eficaz mesmo em pacientes com xerostomia induzida por radioterapia.⁷ A TENS é uma corrente de baixa frequência, quando comparada a todo o espectro das frequências de corrente elétrica disponíveis para uso terapêuticos e é indicada principalmente para diminuição da dor e aumento do fluxo sanguíneo. O objetivo é excitar seletivamente fibras nervosas A-B (sensoriais) e produzir um efeito analgésico através de um fenômeno chamado de –teoria das comportas segundo a qual os sinais elétricos da TENS alcançam primeiro as regiões neurais superiores responsáveis pela interpretação da dor enquanto que os sinais algícos são conduzidos por fibras nervosas mais lentas ficando assim em segundo plano. A TENS é uma corrente elétrica do tipo pulsada, com onda bifásica, geralmente simétrica onde um componente de onda (quadrada) positiva e seguida por um pico elétrico negativo. Essa característica propicia a estimulação de receptores nervosos e apresenta um componente de corrente direta igual a zero, ou seja, as áreas sob as ondas positivas e negativas são iguais, não produzindo efeitos polares^{30,31}.

A transmissão da corrente elétrica, através de eletrodos aderidos a pele, atua sobre mecanorreceptores periféricos que conduzem potenciais de ação através de fibras A-Beta até interneurônios medulares que inibem a retransmissão dos estímulos dolorosos conduzidos pelas fibras A-Delta e Tipo C^{32,33}. Essa condução elétrica foi detalhadamente descrita e batizada como –Teoria das Comportas que descreve os mecanismos pelos quais acredita-se que este tipo de estimulação elétrica pode reduzir a percepção algica.³¹ Contudo, pulsos elétricos de baixa frequência e de larga duração podem ultrapassar o limiar de excitação da placa motora e provocar contração muscular²⁹.

Por outro lado, o mecanismo pelo qual a TENS estimula as glândulas salivares ainda não é claro, porém acredita-se que a corrente elétrica atue sobre o nervo aurículo temporal induzindo aumento da atividade secretomotora²⁵⁻²⁸. É muito provável que o percurso anatômico pelo qual as perturbações elétricas promovidas durante a eletroestimulação alcancem os nervos aferentes que transportam tais impulsos para os núcleos salivares (centro da salivação) na medula onde a interação e modulação neural possivelmente promovem respostas eferentes que controlam os mecanismos do reflexo salivar^{34,35}.

Especula-se que a eletroestimulação só beneficiaria indivíduos com glândulas salivares funcionais, porém é perfeitamente presumível que a RT danifique o parênquima destas

glândulas, mas mesmo assim observara-se aumento do fluxo salivar mesmo nos indivíduos que iniciaram o tratamento a partir de total ausência de saliva³⁶. Entretanto, as melhores respostas ao tratamento ocorreram nos indivíduos com maior fluxo salivar inicial. Infelizmente, não há informações disponíveis na literatura a respeito do grau de lesão do parênquima das glândulas salivares nem mesmo a respeito da possibilidade de reversão da disfunção destas glândulas através da TENS. Contudo, os resultados clínicos disponíveis atestam de maneira bastante evidente que o TENS recupera o fluxo salivar de pacientes com câncer de cabeça e pescoço que apresentaram hipossalivação após o tratamento de RT. Por esta razão, este estudo avaliará o efeito da reabilitação do fluxo salivar destes pacientes sobre o volume salivar e sobre as características vocais perceptivoauditivas e acústicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento

Ensaio clínico do tipo *Cross-over*.

Considerações éticas e local de realização

A coleta dos dados ocorrerá no Ambulatório do Sistema Único de Saúde (SUS) do Hospital Santa Rita (HSR) do Complexo Hospitalar Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). A autorização para a realização do estudo foi solicitada ao diretor do hospital Dr. Carlos Eugenio Escovar (anexo A). O projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da ISCMPA como instituição. Por se tratar de um ensaio clínico, o protocolo de estudo será, paralelamente, cadastrado na plataforma eletrônica do *Clinical Trails* (<https://clinicaltrials.gov/>) conforme exigido pelas principais diretrizes internacionais de elaboração e publicação de trabalhos científicos. Todos os pacientes participantes deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Todo o estudo será executado em conformidade com as normas brasileiras de pesquisa em seres humanos preconizados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). De acordo com as normas técnicas estabelecidas pelo código de ética da Fonoaudiologia os exames e avaliações

fonoaudiológicas realizados não são caracterizados como invasivos, portanto representam baixo/muito baixo de risco para os pacientes.

Seleção da Amostra

A amostra será composta por pacientes que realizaram radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço e que desenvolveram hipossalivação após 90 dias do término da irradiação.

Critérios de inclusão:

1. Indivíduos adultos a partir de 18 anos, ambos os sexos, em acompanhamento oncológico para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço (cavidade oral e orofaringe) no hospital Santa Rita com no mínimo 4.000 CGY, de irradiação externa de dose total^{36,37};
2. Ter terminado a radioterapia há no mínimo 90 dias;
3. Não apresentar lesão cancerígena em glândulas salivares (sublingual, submandibular e parótida);
4. Não apresentar história câncer de assoalho bucal;
5. Não ter sofrido esvaziamento cervical nível I;
6. Apresentar hipossalivação/xerostomia.

Critérios de exclusão:

1. Existência de doença laríngea ativa confirmada por laudo médico;
2. Presença de tumores que comprometam o fechamento velo-faríngeo (EVF);
3. Respiradores orais (orgânicos e funcionais);
4. Uso de substâncias protetoras glandulares ou estimulantes salivares durante ou após a radioterapia e o período de coleta de dados;
5. Volume de fluxo salivar estimulado maior que 1,0 ml/minuto;
6. Alterações cutâneas na região de aplicação da eletroterapia ou quaisquer outras alterações que contraindiquem a TENS;
7. Uso de marca-passo ou quaisquer outros dispositivos que impossibilite a estimulação elétrica;

8. Suspeita ou confirmação de gravidez;
9. Indisponibilidade de tempo para participar do estudo (2x/semana durante um mês);
10. Excesso de faltas ao longo do tratamento (>30% do total de sessões).

Procedimentos

Alocação dos Pacientes

Após a seleção, os pacientes serão alocados de forma sequencial iniciando sempre pela fase controle e seguido pela fase de tratamento.

- Fase controle (C), os pacientes passarão pela avaliação clínica, coleta de saliva, registro de voz e exame de nasofibrolaringoscopia no primeiro dia, No 15º será coletada saliva e 30º dia, a saliva será novamente coletada e repetidas todas as avaliações iniciais.
- Fase intervenção com TENS (TENS). Na semana seguinte ao término da fase controle, iniciar-se-á a fase intervenção. Neste período os pacientes iniciarão o tratamento com eletroestimulação (2x/semana por seis semanas, totalizando 12 sessões). Para a realização da eletroestimulação serão utilizados eletrodos de silicone, colocados na região das glândulas parotidas, sublingual e submandibulares. O aparelho a ser utilizado será o Neurodyn II, com uma frequência de 50Hz e 250µs, durante 20 minutos.
- No último dia, após a eletroestimulação, os pacientes passarão por todas as avaliações novamente.

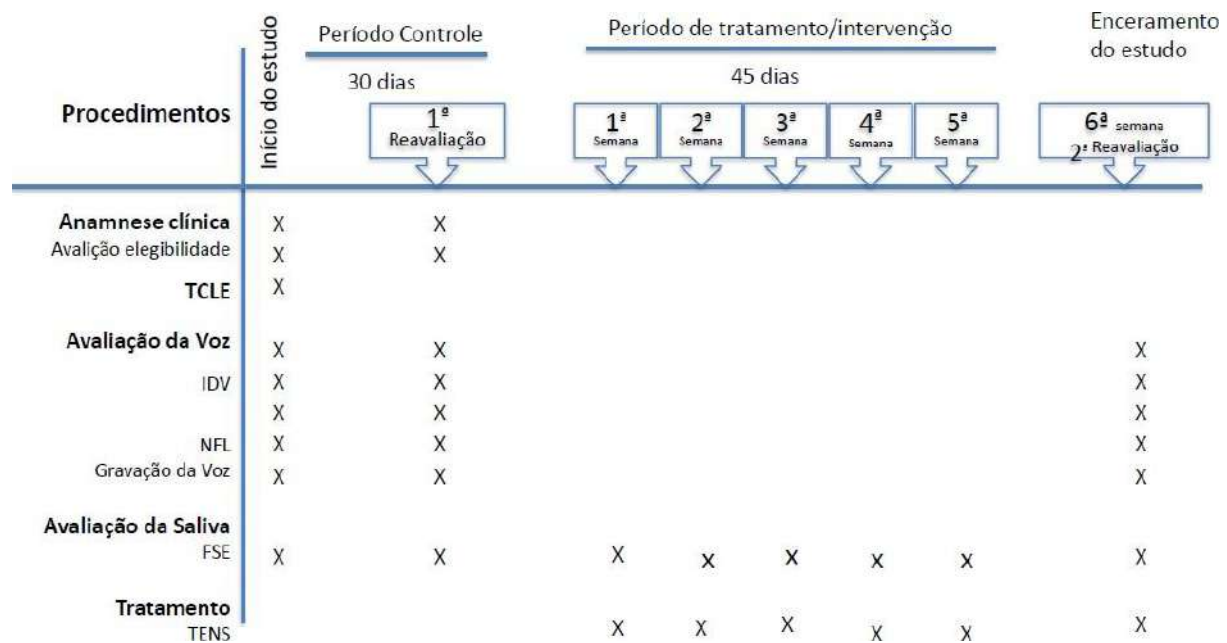
Avaliações:

1. Anamnese (Apêndice B), onde serão coletados dados que caracterizam as condições clínicas dos voluntários com por exemplo a dose total de irradiação utilizada no tratamento radioterápico, o tempo de término da radioterapia e demais variáveis que compõem a propedêutica da avaliação fonoaudióloga;
2. Avaliação médica e nasofibrolaringoscopia para inspeção objetiva da cavidade oral, orofaringe e laringe e verificação de alterações estruturais e funcionais da laringe. Os dados serão registrados em protocolo elaborado pelos autores (Apêndice C);
3. Mensuração do fluxo salivar por meio da técnica de sialometria de *Spitting*^{9,31,39}

utilizando-se o kit da marca *Halitus*®, e demais procedimentos conforme descritos por Eisbruch et al (2003)^{40,41};

4. Avaliação clínica vocal será realizada em sala silenciosa com ruído ambiental inferior a 50dBNPS. O nível de pressão sonora da sala será medido com decibelímetro da marca RadioShack. (Apêndice D);
 - a. A voz será gravada em um gravador digital (gravador *Zoom H4n Pro digital Handy Recorder* 4 canais) e microfone *Behringer ecm8000 Omnidirecional professional* colocado a uma distância de 4 cm dos lábios dos indivíduos para a vogal sustentada e a 10cm para as amostras de fala encadeada.
 - b. A amostra de voz coletada constará da vogal prolongadas /a/, de fala espontânea com resposta a pergunta "o que acha de sua voz" e os meses do ano;
 - c. Será aplicado o protocolo *Voice Handicap Index* (Índice de Desvantagem Vocal-IDV)⁴² (Anexo B);
5. - A avaliação das características vocais será realizada por meio de:
 - a. Análise acústica: realizada com o *Multi Dimensional Vocal Profile Advanced (MDVPA)* da Pentax ou o programa Praat
 - b. Análise perceptivo-auditiva: realizada individualmente e independentemente por 5 fonoaudiólogas independentes, com experiência na análise perceptivoauditiva de voz de ao menos cinco anos, que utilizarão o protocolo . escala GRBASI^{43,44} (Anexo C). As juízas estarão cegas quanto a idade, diagnóstico, tratamento ao período a que se refere a gravação (se no período controle ou pós período intervenção TENS).

Fluxograma



TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido IDV: Índice de Desvantagem Vocal
 NFL: Nasofibrolaringoscopia FSE: Fluxo Salivar Estimulado
 TENS: *Transcutaneous electrical nerve stimulation*

Se ocorrerem faltas, serão reagendadas as recuperações das sessões.

Cálculo do tamanho da mostra

Para o cálculo do tamanho da amostra consideramos que o tratamento da hipossalivação através da TENS será grande o suficiente para reduzir, pelo menos, a metade do desvio padrão das alterações vocais encontradas após o tratamento de radioterapia na região da cabeça e pescoço de campo aberto. Segundo o estudo de *Karlsson T et al.* 2016,⁴⁵ a variação da frequência das ondas vocais (*Jitter*) dos pacientes submetidos à este tipo de RT é de 3.3 ± 3.8 . Se a diferença entre as médias antes e depois do tratamento for de 1.9 o resultado do cálculo

amostral indica que 44 voluntários serão suficientes para expressar o comportamento desta população, considerando o uso de um teste que compare dados com distribuição normal e bicaudal, com poder de detecção de heterogeneidade de 90% e nível de significância de 0.05. Porém, presumindo a possibilidade de abandono durante o protocolo de tratamento, serão incluídos 6 voluntários adicionais totalizando 50 indivíduos em todo o estudo.

Análise estatística

Os dados qualitativos serão apresentados como frequência absoluta e percentual e os quantitativos através de média e desvio-padrão/erro-padrão ou mediana e amplitude interquartil, conforme as características de suas distribuições. A normalidade das variáveis será verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações entre grupos serão realizadas através de teste t de Student ou Mann-Whitney. As associações serão testadas pelo teste de Qui-Quadrado ou teste Exato de Fisher, e as correlações pelo teste de correlação de Spearman. As comparações intra-momentos serão avaliadas através de modelos de equações de estimações generalizadas (GEE) com post-hoc de Bonferroni conforme o método *intention to treat*. A determinação do ponto de corte preditor de melhora clínica será definida a partir da análise de probabilidade condicional obtida pela curva ROC. O tamanho do efeito padronizado será avaliado pelo Choen's D teste, onde se verificará o número necessário de tratamentos para a obtenção de sucesso (NNT) através da estimativa de sucesso (binominal effects size display – BESD). A significância estatística adotada será de 5% ($p < 0,05$) e todas as análises serão realizadas no software estatístico SPSS versão 23.

Desfecho Primário

As características vocais são o desfecho primário desse estudo, o qual indicará se a quantidade de saliva produzida exerce ou não efeito positivo sobre a voz dos indivíduos do estudo. As demais variáveis fazem parte dos desfechos secundários.

Equipe de Pesquisa

1. Pesquisadora Principal: Fg^a Ms. Vera Beatris Martins – Responsável pela implementação e condução da pesquisa, análise e interpretação dos resultados e elaboração do artigo científico.
2. Orientador: Fabrício Edler Macagnan; Professor do Departamento de Fisioterapia, do Programa de Residência Multiprofissional em Saúde Ênfase em Oncohematologia e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
3. Colaborador: Fga. Ms. Émille Dalbem Paim - Auxílio nos procedimentos da coleta de dados, pesquisa bibliográfica, colaboração na interpretação de dados e escrita do artigo.
4. Colaborador Dr. Virgílio Zanella – Médico Cirurgião de Cabeça e Pescoço da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, responsável pela execução dos exames de cavidade oral e Nasofibrolaringoscopia para avaliação da laringe, colaboração na interpretação de dados e escrita do artigo.

Cronograma

A pesquisa iniciar-se-á após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e tem previsão de término em junho 2023. Na tabela a seguir estão relacionadas as atividades a serem realizadas, de acordo com os respectivos meses.

	2021				2022				2023			
	2-5	6-8	9-10	11-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12
Submissão do projeto												
Recrutamento												
Tratamento												
Reavaliação												
Análise de dados												
Produção científica												
Defesa da tese												

Orçamento

Com o decorrer da pesquisa, serão utilizadas folhas de ofício para impressão dos termos de consentimento livre e esclarecido, aparelho de eletroestimulação, utensílios para sialometria, e canetas esferográficas. Todos os custos serão financiados pelos pesquisadores. A análise vocal acústica será realizada no Laboratório de Voz do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal de Santa Maria/RS e, portanto, não haverá custo adicional envolvida nesta análise. Quanto aos exames de nasofibrolaringoscopia, estes fazem parte do acompanhamento dos pacientes com neoplasia em região de cabeça e pescoço, dessa forma, que os dados serão coletados do prontuário de informações clínicas conforme as rotinas assistenciais estabelecidas, pois todos os participantes da pesquisa, impreterivelmente estarão sendo acompanhados pela equipe de cirurgia de cabeça e pescoço. Apenas a avaliação da voz e o tratamento da hipossalivação serão oferecidos de forma adicional à rotina, mas nenhum destes procedimentos implica em custos extras à instituição, pois serão financiados pelos pesquisadores.

Material	Quantidade	Valor unitário	Valor Total
Folhas de ofício	100	0,15	15,00
Canetas	5	1,5	7,5
Álcool	1	10,00	10
Algodão	1	3,00	3
Aparelho Neurodyn	1	500,00	500,00
Eletrodos	8	2,30	9,20
Kit de Sialometria Halitus	2	110,00	220,00
gravador Zoom H4n Pro digital Handy Recorder 4 canais	1	1.899,00	1.899,00
microfone Behringer ecm8000 Omnidirecional professional	1	522,00	522,00
		total	3.185,70

Financiamento próprio.

Referências bibliográficas

- 1 Novaes, PERS. Radioterapia em neoplasias de cabeça e pescoço. in: Carrara De Angelis, E., Furia, CLB., Mourão, LF., Kowalski, LP. Atuação da fonoaudiologia no câncer de cabeça e pescoço. São Paulo: Lovise, 2000.
- 2 Andrade dos Santos JN, Rodrigues de Matos F, Serafim Santana IT, Pereira de Matos AL. Análise de Reações Adversas após o Tratamento da Radioterapia em Adultos com Câncer de Cabeça e Pescoço. Rev. Brasileira.De.Cancerologia [Internet]. 4º de fevereiro de 2020 [citado 13º de setembro de 2020];65(4):e-12648. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/648>
- 3 Pinna R, Campus G, Cumbo E, Mura I, Milia E. Xerostomia induced by radiotherapy: an overview of the physiopathology, clinical evidence, and management of the oral damage. Ther Clin Risk Manag. 2015;11:171-188.
- 4 Fujita, RR., Ferreira, AE.; Síndrome Sicca. In: Behlau, M.; O melhor que vi e ouvi – atualização em laringologia e voz, Rio de Janeiro. Ed. Revinter, 1998
- 5 Roh JL; Kim AY; Cho MJ. Xerostomia following radiotherapy of head and neck affects vocal functions. Journal of clinical oncology 2005, 23 (13),3016-3023.
- 6 Roh, JL; Kim, HB; Kim, AY. The effect of acute xerostomia on vocal function. Arch otolaryngol. Head Neck Surg. 2006; 132:542-546.
- 7 Paim, ED., Macagnan, F., Martins VB., Zanella, VG., Guimarães, B.,Berbert, MCB - Efeito agudo da Transcutaneous Electric Nerve Stimulation (TENS) sobre a hipossalivação induzida pela radioterapia na região de cabeça e pescoço: um estudo preliminar -Revista CoDAS 2018;30 (3):e2017-0143
- 8 Parpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. Annu Rev Food Sci Technol. 2013;4:267–276.
- 9 Pedrazas CHS, Azevedo MNL, Torres SR. Manejo do paciente com hipossalivação. RevPerio News. 2007; 1(4): 369-373.

- 10 Neto CB, Sugaya NN. Tratamento da xerostomia em pacientes irradiados na região da cabeça e do pescoço. Rev. Biocienc. 2004; v.10 (3):147-151.
- 11 Aragüés IH, Pérez AP, Fernández RS. Inflammatory Skin Conditions Associated With Radiotherapy. Actas Dermo-Silfiliog. 2017; 108(3):209-20.
- 12 Citrin, DE. (2017). *Recent Developments in Radiotherapy. New England Journal of Medicine*, 377(11), 1065–1075.
- 13 Gois, J. N et al . Manifestações da deglutição em pacientes com câncer de orofaringe submetidos à terapia conservadora: revisão sistemática. J. Bras. Patol. Med. Lab., 2020; 56, e1752020,. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442020000100301&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 15 set. 2020.
- 14 Santos, J, Matos, F, Santana, I, Matos, A. Análise de Reações Adversas após o Tratamento da Radioterapia em Adultos com Câncer de Cabeça e Pescoço. Revista Brasileira de Cancerologia. 2019;65 (4).648.
- 15 Álvarez GGJ et al. Alteraciones en la cavidad bucal en pacientes tratados con radioterapia de cabeza y cuello. Medellín, Colombia. Rev. Odont. Mex [revista en la Internet]. 2017 Jun [citado 2020 Sep 15] ; 21(2): 87-97. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2017000200087&lng=es.
- 16 Alves, KT; Severi,LSP.; Componentes salivares associados à prevenção de cárie dental - revisão literatura. Rev. Odont. Univ. Cid São Paulo,2016;28(1):37-42 jan-abril
- 17 De Castro GJ, Federico MH. Evaluation, prevention and management of radiotherapy-induced xerostomia in head and neck cancer patients. Curr Opin Oncol. 2006;18:266–70.
- 18 De Lima, EDA et al. Saliva e hidratação : importância da quantidade e da qualidade da saliva para manutenção da condição bucal satisfatória em pacientes com paralisia cerebral. Revista Campo do Saber, 2017, 3 (1).

- 19 Oliveira, ISG. Vibração das pregas vocais em diferentes frequências [manuscrito] : análise teórico-experimental. 2017. 117 f., enc.: il. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.
- 20 Siqueira, MA et al. Hidratação vocal em profissionais e futuros profissionais da voz. Rev. CEFAC, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 908-914, Aug. 2016. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-18462016000400908&lng=en&nrm=iso>. access on 12 Sept. 2020..
- 21 Miri AK, Barthelat F, Mongeau L. Effects of dehydration on the viscoelastic properties of vocal folds in large deformations. J Voice. 2012;26(6):688-97.
- 22 Verdolini, C.; Titze, I. & Druker. Changes in phonation threshold pressure with induced conditions of hydration. Journal of Voice, 4 (2), 1990.
- 23 Zhuang P, Sprecher AJ, Hoffman MRet al. Phonation threshold flow measurements in normal and pathological phonation. Laryngoscope. 2009;119:811–815.
- Verdolini, K, Sandage, M & Titze, I. Effect of hydration treatments on laryngeal nodules and polyps and related measures. Journal of Voice, 8:30-47, 1994.
- 24
- 25 Behlau, M & Pontes, P. Higiene vocal. Informações básicas. São Paulo. editora Lovise. 1993.
- Kumud M, Vaishali K, Shekharc K. Evaluation of the Effect of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (Tens) On Salivary Flow in Patients with Xerostomia. Annalsof Dental Research. 2012; 2 (2): 44-50.
- 26
- 27 Chapa AG, Garza SB, Garza EM, Martínez SG. Hiposalivación y xerostomía; diagnóstico,modalidades de tratamiento en la actualidad: Aplicación de neuroelectroestimulación. RevMexPeriodontol. 2012; 3(1): 38-46.

- 28 Strietzel FP, Lafaurie GI, Mendoza GR, Alajbeg I, Pejda S, et al. Efficacy and Safety of an Intraoral Electrostimulation Device for Xerostomia Relief. *Arthritis & Rheumatism*. 2011; 63(1): 180–190.
- 29 Wolff A. Electroestimulación, una alternativa para el manejo de la hiposalivación y la xerostomia. *RAAO*. 2012; 2: 51-52.
- 30 Silveira DWS, Gusmão CA. A utilização da estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) no tratamento da espasticidade – uma revisão bibliográfica. *Rev. Saúde*. 2008; 4(1): 64-71.
- 31 NimmaVB, Ramesh T, Reddy RS, Reddy RL, Swapna L. A Effect of TENS on whole saliva in healthy adult Indians: evaluation of influence of protocol on quantity of saliva measured. *Cumhuriyet Dent J*. 2012; 15(3):235-240.
- 32 Rushton DN. Electrical stimulation in the treatment of pain. *Ann Disability and Rehabilitation*. 2002; 24 (8): 407-15
- 33 Greer KR, Hoyt JW. Pain: theory, anatomy, and physiology. *Crit Care Clin*. 1990; 6 (2): 227-34.
- 34 Dawes C, Cross HG, Baker CG, Chebib FS, The influence of gland size on flow rate and composition of human parotid gland saliva. *J Can Dent Assoc*. 1978;44:21-25.
- 35 Hargitai IA, Sherman RG, Strother JM. The effect of electrostimulation on parotid saliva flow: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99:316-20.
- 36 Paim ED, Berbert MCB, Zanella VG, Martins VB, Macagnan FE. Effects of transcutaneous electrical nerve stimulation on the salivary flow of patients with hyposalivation induced by radiotherapy in the head and neck region—A randomised clinical trial. *J Oral Rehabil*. 2019;00:1–9.
- 37 Wisemann, LR.; Fauld, D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties

and clinical potential in xerostomia. *drugs* 49:143-55, 1995

- 38 Johnson, J T.; Ferretti, G.A.; Nethery, J.; Valdez, I H.; Fox, P C.; Ng. D.; Muscoplat, CC.; Gallacher, S. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *N Engl. J. Méd.* 329:390-5, 1993
- 39 Navazesh M. Method for collecting saliva. In: *Saliva as a diagnostic fluid.* Ann N Y Acad Sci. 1993; 694:72-7.
- 40 Falcão DP, Mota LMH, Pires AL, Bezerra ACB. Sialometria: aspectos de interesse clínico. *Rev. Bras. Reumatol.* 2013,53(6):525-531.
- 41 Eisbruch A, Rhodus N, Rosenthal D, Murphy B, Rasch C, Sonis S, et al. How should we measure and report radiotherapy-induced xerostomia? *Semin Radiat Oncol.* 2003; 13(3):226-34
- 42 Behlau, M; Santos,LMA;Oliveira,G - Cross-cultural adaptation and validation os the handicap index into brazilian Portuguese. *J. Voice* 2009
- 43 Hirano M. *Clinical examination of voice* - Viena, Springer-Verlang. 1981.100p.
- 44 Dejonckere PH, Remacle M, Fresnel-Elbaz E, Woisard V, Crevier-Buchman L, Millet B. Differentiated perceptual evaluation of pathological voice quality: reliability and correlations with acoustic measurements. *Rev Laryngol. Otol. Rhinol.* 1996; 117(3):219- 24.
- 45 Karlsson, T., Tuomi L., Andréll P., Johansson, M., Finizia, C. (2016): Effects of voice rehabilitation after radiotherapy for laryngeal cancer: a longitudinal study. *Logopedics Phoniatrics Vocology.*

ANEXOS E APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da Pesquisa:

TRATAMENTO DA HIPOSSALIVAÇÃO COM *TRANSCUTANEOUS ELECTRIC NERVE STIMULATION* E CARACTERÍSTICAS VOCAIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO PÓS-RADIOTERAPIA

Pesquisadores responsáveis:

Fgª Ms Vera Beatris Martins (51) 99971.15.32

Prof. Dr. Fabricio Edler Macagnan (51) 99374-1286

1 – Justificativa e objetivos da pesquisa:

Pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço, quando submetidos à radioterapia, podem ter problemas como boca seca (xerostomia) e dificuldades para mastigar e engolir alimentos duros e secos. Existem também a possibilidade de desenvolvimento de dificuldades para falar e produzi voz. Em decorrência disto, a falta de saliva também aumenta o risco de desenvolvimento de cáries e certas doenças de gengivas. Portanto, a saliva é importante para muitas funções e a falta de lubrificação e hidratação das estruturas que produzem a voz pode prejudicar a habilidade da fala. Estudos que testem tratamentos que tenham como objetivo aumentar a quantidade de saliva são, portanto, importantes para todos os pacientes que desenvolvem dificuldade em produzir naturalmente e em quantidade adequada este importante fluido. Sendo assim, este estudo tem como objetivo verificar se o tratamento da boca seca (xerostomia) causada pela redução da quantidade de saliva produzidas pelas glândulas salivares, através de um recurso terapêutico que utiliza a técnica de eletroestimulação pode melhora a produção da saliva e consequentemente a qualidade da voz.

2 – Procedimento a ser usado:

Você está sendo convidado a fazer parte deste estudo, pois o seu médico lhe informou a respeito de uma neoplasia maligna (câncer) situada na região da cabeça e pescoço. Um tratamento foi lhe oferecido. Dentre as diferentes intervenções você realizou radioterapia entre outros tratamentos e cuidados específicos. Atualmente, você está em acompanhamento clínico junto ao ambulatório da Equipe de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita do Complexo Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre onde rotineiramente são avaliados uma série de aspectos que descrevem as suas condições de saúde (condições clínicas). Neste ambulatório diferentes profissionais da saúde estão constantemente realizando uma série de perguntas e avaliações. Muitas destas informações serão requeridas pela equipe de pesquisa através do acesso ao prontuário eletrônico onde estas informações estão armazenadas. Neste prontuário serão coletados informações a respeito de todo o tratamento que você vem realizando. Portanto, se você aceita participar deste estudo, os pesquisadores terão acesso a estas

informações. Porém, nenhuma informação será disponibilizada ou utilizada de forma que possa lhe identificar no futuro. Os dados serão única e exclusivamente necessários para fins científicos e de maneira alguma a sua identidade será revelada. Números e códigos irão substituir sua identificação e o total sigilo a respeito de dados que possam lhe identificar serão mantidos é um principais dos compromissos assumidos pela equipe.

Inicialmente será agendado um exame de nasofibrolaringoscopia com o cirurgião de cabeça e pescoço, da própria equipe que está lhe fornecendo a assistência, que, conjuntamente com a fonoaudióloga e pesquisadora proponente deste estudo, irá verificar as condições da sua laringe (garganta) e de suas pregas vocais. Será introduzido um fino aparelho de vídeo pela narina para visualizar como você está engolindo a saliva e como se movimentam as suas cordas vocais. Trata-se de um discreto incômodo durante a introdução do aparelho que irá durar poucos minutos até que a coleta das imagens seja realizada. Além desse exame, iremos acrescentar a avaliação da qualidade da voz. Este procedimento consiste na gravação de alguns sons (fonemas) e frases que você terá que ler em voz alta. Haverá também alguns questionários para serem preenchidos. São testes e perguntas bastante simples que não envolvem nenhum tipo de risco à saúde, apenas a inconveniente necessidade de tempo para responder as questões. Por isso, é preciso reforçar que a sua participação é totalmente voluntária. E você tem total poder para tomar a decisão de aceitar ou recusar participar desta pesquisa. Contudo, ao aceitar você estará manifestando o seu consentimento e a sua concordância em fazer parte de todos os procedimentos que estão sendo citados neste documento (termo de consentimento livre e esclarecido). Não haverá custo adicional, mas também não haverá nenhum tipo de pagamento ao fazer parte do estudo. Se você decidir participar, receberá, após as avaliações iniciais, um tratamento de oito sessões de eletroestimulação. Já foram publicados resultados bastante promissores a respeito da recuperação da capacidade de produzir saliva em pacientes que apresentam condições clínicas similares a que você está vivenciando. Se os resultados observados em estudos prévios se confirmarem, espera-se que haja alívio da sensação de boca seca, mas não sabemos, ainda, se haverá ou não melhora na sua habilidade de fala.

No começo você ficará, assim como todos os demais voluntários que aceitarem o tratamento proposto, em um período de avaliação e acompanhamento clínico. Este período será de 30 dias. Você deverá comparecer ao hospital para a primeira avaliação (primeiro encontro), 15 dias após (segundo encontro) e no trigésimo dia (terceiro encontro). Ao término deste período iniciarão as sessões de eletroestimulação. Em cada encontro será avaliado a quantidade de saliva, enquanto que a qualidade da sua voz será gravada apenas em três momentos: 1) no primeiro encontro, 2) no terceiro encontro (trigésimo dia) e 3) ao final do estudo (após encerrado o tratamento por eletroestimulação).

Para medir a quantidade de saliva, você deverá mastigar uma bolinha de silicone por 5 minutos e cuspir a saliva em um frasco. Sua saliva será analisada em um laboratório. Para o tratamento com eletroestimulação, será feita a limpeza da sua pele com álcool e serão colados 4 eletrodos de silicone que permanecerão por 20 minutos. A técnica de eletroestimulação é bastante estudada e existem pesquisas demonstrando os benefícios sobre a reabilitação da função das glândulas salivares através do aumento da quantidade de saliva produzida. No entanto, existe pouca informação a respeito dos benefícios em relação a qualidade da voz. Porém, se você está sendo convidado a participar desta pesquisa, é porque o seu prontuário foi previamente analisado e identificamos uma possibilidade de obtenção de benefício ao participar deste estudo. Em princípio você não apresenta nenhuma

contraindicação para receber o tratamento, ainda assim, caso ocorra algum desconforto ou mesmo se você deseja interromper sua participação, todas as medidas e cuidados médicos serão tomados para minimizar e evitar qualquer dano à sua saúde. É muito importante que você saiba que nenhum prejuízo ao seu tratamento de base será imposto. Você terá todo suporte necessário pela equipe de pesquisa e terá a garantia de que todos os seus direitos enquanto paciente e voluntário de pesquisa serão assegurados pelas normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa (CONEP) através do comitê de ética em pesquisa (CEP) desta instituição, conforme descrito ao longo deste documento.

Qual benefício terei em participar deste estudo? Não sabemos exatamente qual o efeito do tratamento sobre a qualidade da voz, mas em relação ao fluxo salivar esperasse importante melhora ao final do tratamento. Contudo, é fundamental que você saiba, que nem todos os pacientes se beneficiam do tratamento. A partir de análises matemáticas podemos afirmar que a probabilidade de obtenção de algum benefício é significativa, mas de maneira alguma isso representa uma certeza de sucesso terapêutico para todos os envolvidos.

Qual risco terei em participar deste estudo? Essa pergunta é muito importante, pois retrata de maneira bastante direta o conjunto de informações disponíveis na literatura sobre a possibilidade terapêutica que a estimulação elétrica representa para pacientes com câncer de cabeça e pescoço que desenvolvem hipossalivação após o tratamento de radioterapia. Até o momento, não há nenhum efeito adverso sério descrito na literatura. Essa técnica já foi amplamente testada e os principais efeitos indesejáveis são considerados leves ou muito leves e no geral representam desconforto no local da estimulação, sensação de formigamento no rosto que sede após a retirada do estímulo elétrico e movimentos involuntários que podem ser gerados durante a estimulação. Todos são efeitos direto da corrente elétrica que sedem imediatamente ao final da sessão. Outra informação importante é a quantidade de pacientes que desistem do tratamento. São raros os casos descritos até o momento. Isso ajuda no entendimento de que a tolerância da técnica é realmente muito boa e raros são os pacientes que desistem. Nos estudos anteriormente conduzidos pelo nossa equipe, não houve nenhuma desistência. Porém, isso não significa que você tenha que necessariamente concluir todo o tratamento. Você tem total liberdade para declinar e interromper o tratamento se assim deseja. Lembre-se de que não ocorrerá nenhum prejuízo em seu tratamento ambulatorial habitual. Você tem todas as garantias asseguradas por esse documento que foi avaliado e aprovado pelo CEP desta instituição. Leia o restante do documento e veja como proceder em caso de dúvida.

3 – Garantias de liberdade de escolha e privacidade:

A participação neste estudo é totalmente voluntaria, você é totalmente livre para participar ou não desta pesquisa.

Mesmo que sua participação seja muito importante para a realização deste estudo, você poderá, se assim desejar, interromper sua participação em qualquer momento da pesquisa, sem que isto implique em qualquer penalidade ou constrangimento a sua pessoa. A participação ou não nesta pesquisa não prejudicará em nada seu atendimento e tratamento nesta Instituição. Você terá a liberdade de interromper as consultas de avaliação e acompanhamento no momento em que desejar. Terá a liberdade de perguntar o que quiser e será respondido da melhor maneira possível. É garantido que sua identidade será mantida em completo sigilo

respeitando-se sempre os aspectos éticos da pesquisa. Os dados serão utilizados exclusivamente para fins de ensino e pesquisa, não sendo permitido qualquer forma de identificação.

Eu, _____(paciente) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi todas as informações que julguei necessárias e esclareci minhas dúvidas. Poderei solicitar, a qualquer momento, novas informações e modificar minha decisão de participar da pesquisa, se assim o desejar. Fui informado pela Fonoaudióloga Vera Martins (pesquisadora responsável) ou colaborador da pesquisa de que todos os dados serão confidenciais, bem como o meu tratamento não será modificado em razão desta. Estou ciente de que poderei retirar meu consentimento em participar da pesquisa, ou suspender as consultas de acompanhamento, no momento em que eu quiser. Posso falar com a Fonoaudióloga Vera Martins para esclarecimentos sobre esta pesquisa e perguntar sobre meus direitos como participante deste estudo fora do horário das consultas, agendando novo horário pelo telefone (51) 9 9971-1532. Fui informado de que em caso de dúvidas remanescentes poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia (ISCMPA) se sentir necessidade através dos contatos descritos abaixo. Dessa forma autorizo a minha inclusão neste estudo e declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura: _____

Assinatura do Voluntário Apto à Participar da Pesquisa

Porto Alegre _____ de _____ de 2020

Data da assinatura do Termo

Membro da equipe responsável pela leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CONTATOS:

-Fga. Vera Beatris Martins – email: vera.martins@santacasa.org.br / Tel-Whatsapp: (51) 9 9971-1532

-Ft. Dr. Fabricio Edler Macagnan – e-mail: fabriciom@ufcspa.edu.br / Tel – Whatsapp: (51) 9 9327-5509

Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA- Telefone (51) 3214-8571, endereço: Av. Independência, 155 – 6º andar do Hospita Don Vicente Scherer - Porto Alegre -RS. E-mail: cep@santacasa.org.br

ETIQUETA

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Idade: _____

Telefone: _____ Sexo: F () M ()

Endereço: _____

Email: _____

Estado Civil: () Solteiro () Casado () Viúvo () Divorciado

Escolaridade: () Superior completo () Superior Incompleto () Ensino Médio Completo () Ensino Médio Incompleto () Ensino Fundamental Completo () Ensino Fundamental Incompleto () Analfabeto

HISTÓRICO CLÍNICO/ DIAGNÓSTICOS/ COMORBIDADES: _____

TRATAMENTO(S) REALIZADO (S): () RT dose total _____ () QT nº de ciclos e fármaco _____

() RT e QT _____ () Cirurgia _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

ASPECTOS RESPIRATÓRIOS:

() AA () TQT Tipo: _____ nº: _____

SE EM USO DE TQT, POSSUI QUE QUANTIDADE DE SECREÇÃO? () grande () média () pequena

QUAL O ASPECTO DA SECREÇÃO? () clara () amarelada () esverdeada

QUAL A VISCOSIDADE DA SECREÇÃO? () fluida () espessa

EPISÓDIOS DE PNEUMONIA NOS ÚLTIMOS 6 MESES? () sim () não

FUMA? () SIM () NÃO. SE SIM, QUANTOS CIGARROS POR DIA? _____

ALIMENTAÇÃO ATUAL

VIA : () VO () Enteral () Parenteral () SNE () SNG () GTT () JJT () SOE

TIPO DE DIETA: () Pastosa Liquidificada () Pastosa () Branda () Normal () Líquida Completa

QUANTIDADE:

OBSERVA ALGUMA DESTAS DIFICULDADES AO ENGOLIR? () alimento parado () tosse ou engasgo () dor ()

necessidade de ficar pigarreando após engolir

UTILIZA PRÓTESE DENTÁRIA? () sim () não

INGERE BEBIDA ALCOOLICA? () sim () não Quantas doses por dia? _____

QUANTO A SALIVA

OBSERVOU MUDANÇA NA QUANTIDADE: () sim () não

ACHOU QUE MUDOU A VISCOSIDADE? () Sim () não

ESTÁ DIFÍCIL DE ENGOLIR? () sim () não

APRESENTA DIFICULDADE PARA FALAR? () sim () não

APRESENTA DIFICULDADE PARA MASTIGAR? () sim () não

UTILIZA ALGUM MÉTODO PARA MELHORAR? () sim () não. Se sim, qual? _____

INGERE QUANTOS COPOS DE ÁGUA POR DIA? _____

ACORDA A NOITE PARA BEBER ÁGUA? _____

OBSERVOU MUDANÇA NO PALADAR? () SIM () NÃO

OBSERVOU MUDANÇA NO OLFATO? () SIM () NÃO

JA FEZ TRATAMENTO PARA XEROSTOMIA? () SIM () NÃO

Com medicamento? Qual? _____

() suco cítrico () goma de mascar sem açúcar () outro _____

AVALIAÇÃO

PRESENÇA DE SALIVA EM CAVIDADE ORAL? () Sim () Não

LÁBIOS:

Secos: Sim _____ Não _____

Fissurados: Sim _____ Não _____

Eritematoso: Sim _____ Não _____

Ressecados: Sim _____ Não _____

MUCOSA E LÍNGUA

Seca: Sim: _____ Não _____

Eritematoso: Sim _____ Não _____

Fissurada: Sim _____ Não _____

Mucosite: Sim _____ Não _____

PALATO DURO E MOLE

Secos: Sim _____ Não _____

Fissurados: Sim _____ Não _____

Eritematoso: Sim _____ Não _____

Ressecados: Sim _____ Não _____

COMISSURA LABIAL

Seca: Sim: _____ Não _____

Eritematoso: Sim _____ Não _____

Fissurada: Sim _____ Não _____

Mucosite: Sim _____ Não _____

ESCALA VISUAL ANALÓGICA: de 0-10. Como está sua produção de saliva?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Avaliação videoendoscópica

Sensibilidade laríngea: () adequada () reduzida () ausente

Mobilidade/contração faríngea: (0) adequada/(1) reduzida/(2) ausente

() Deglutição de saliva Refluxo de saliva: () não () sim

() Clearance faríngeo Estase salivar: () não () sim

Se identificada estase, preencher a questão abaixo:

Estase salivar: () base da língua () valécula () epiglote () seios piriformes () aritenóides () pregas vocais () reconstrução

Gerenciamento da estase: () limpeza efetiva () limpeza parcialmente efetiva () limpeza inefetiva () Penetração de saliva

() Aspiração de saliva com tosse e engasgo () Aspiração silente

Repouso: () tremor () movimentos involuntários

Mobilidade da faringe e laringe: () Inspiração () Deglutição de saliva () Tosse () Prender a respiração () - [i] glissando

Coaptação glótica: () completa () incompleta

Paralisia pv D ou E () adução () Abdução /

Avaliação da intensidade da Hipossalivação de acordo com EISBRUCH et al. (2003).

.Intensidade da Xerostomia		
Grau 1 ()	Grau 2 ()	Grau 3 ()
Discreta secura, sem interferências nos hábitos.	Secura em boca, requerendo líquido para conseguir engolir.	Secura em boca causando alteração na dieta, interferência no sono, fala ou outras atividades.

Avaliação da intensidade da Hipossalivação de acordo com EISBRUCH et al. (2003).

.Intensidade da Hipossalivação

Grau 0- 1 ()

Grau 2 ()

Grau 3 ()

> 0,2 ml/min

0,1- 0,2 ml/min

< 0,1 ml/min

MENSURAÇÃO DA SALIVA

Valor de parâmetro: >0,7ml/min normal <0,7ml/min reduzido

ANTES DA EE

Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml
 Data ____/____/____ Resultado: ____ml

DEPOIS DA EE

Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml
 Resultado: ____ml

Observações:

Apêndice C – Ficha de Avaliação Médica e exame de nasofibrolaringoscopia

Aspecto:

Cavidade Oral	Orofaringe	Laringe	Estase de saliva
() normal	() normal	() normal	() não
() alterado	() alterada	() alterada	() sim-Local: _____

Mobilidade:

Cavidade Oral	Faringea	Laringea	Pregas vocais
() presente	() presente	() presente	() presente
() ausente	() ausente	() ausente	() ausente

PROVAS FUNCIONAIS DA LARINGE

-Inspiração habitual

-Inspiração com esforço

-vogal prolongada /I/ glissando

-fala

-AA A com ataque vocal

-tosse

Apêndice D - Protocolo de gravação da voz

Vogais sustentadas /a/

Meses do ano

Fala espontânea – Fale-me sobre o seu problema de voz ou Diga-me como esta sua voz.

ANEXO B - PROTOCOLO DO INDICE DE DESVANTAGEM VOCAL - IDV

Publicação da validação: Behlau, Santos, Oliveira, 2009/*in press*

Instruções: "As afirmações abaixo são usadas por muitas pessoas para descrever suas vezes e o efeito de suas vozes na vida. Circula e resposta que indica o quanto você compartilha da mesma experiência"

0 = Nunca 1 = Quase nunca 2 = Às vezes 3 = Quase sempre 4 = Sempre

Questões	Subescala	
1. As pessoas têm dificuldade em me ouvir por causa da minha voz.	Físico	0 1 2 3 4
2. Fico sem ar quando falo	Orgânico	0 1 2 3 4
3. As pessoas têm dificuldade de me entender em lugares barulhentos	Físico	0 1 2 3 4
4. Minha voz varia ao longo do dia	Orgânico	0 1 2 3 4
5. Minha família tem dificuldade em me ouvir quando os chamo de um outro cômodo da casa	Físico	0 1 2 3 4
6. Uso o telefone menos do que eu gostaria	Físico	0 1 2 3 4
7. Fico tenso quando falo com os outros por causa da minha voz	Emocional	0 1 2 3 4
8. Tenho tendência a evitar grupos de pessoas por causa da minha voz.	Físico	0 1 2 3 4
9. As pessoas parecem se irritar com a minha voz.	Emocional	0 1 2 3 4
10. As pessoas perguntam: -O que você tem na voz?	Orgânico	0 1 2 3 4
11. Falo menos com amigos, vizinhos e parentes por causa da minha voz.	Físico	0 1 2 3 4
12. As pessoas pedem para eu repetir o que falo quando conversamos pessoalmente.	Físico	0 1 2 3 4
13. Minha voz parece rouca e seca	Orgânico	0 1 2 3 4
14. Sinto que tenho que forçar a minha voz sair.	Orgânico	0 1 2 3 4
15. Acho que as pessoas não entendem o meu problema de voz.	Emocional	0 1 2 3 4
16. Meu problema de voz limita minha vida social e pessoal.	Físico	0 1 2 3 4
17. Não consigo prever quando a minha voz vai sair clara.	Orgânico	0 1 2 3 4
18. Tento mudar minha voz para que ela saia diferente.	Orgânico	0 1 2 3 4
19. Eu me sinto excluído nas conversas por causa da minha voz.	Físico	0 1 2 3 4
20. Faço muito esforço para falar	Orgânico	0 1 2 3 4
21. Minha voz é pior no final do dia	Orgânico	0 1 2 3 4
22. Meu problema de voz me causa prejuízos econômicos.	Físico	0 1 2 3 4
23. Meu problema de voz me chateia	Emocional	0 1 2 3 4
24. Fiquei menos expansivo por causa do meu problema de voz.	Emocional	0 1 2 3 4
25. Minha voz faz com que eu me sinta em desvantagem.	Emocional	0 1 2 3 4
26. Minha voz falha no meio da fala	Orgânico	0 1 2 3 4
27. Fico irritado quando as pessoas me pedem para repetir o que falei.	Emocional	0 1 2 3 4
28. Fico constrangido quando as pessoas me pedem para repetir o que falei.	Emocional	0 1 2 3 4
29. Minha voz me faz sentir incompetente	Emocional	0 1 2 3 4
30. Tenho vergonha do meu problema de voz	Emocional	0 1 2 3 4

Anexo C -Protocolo de análise perceptivo-auditiva escala GRBASI

Analise dos seguintes aspectos:

(G) Grau geral da disфонia	0 sem alteração; 1, levemente alterado; 2, moderadamente alterado; e 3, alteração severa
(R) Rugosidade	0 sem alteração; 1, levemente alterado; 2, moderadamente alterado; e 3, alteração severa
(B) Soprosidade	0 sem alteração; 1, levemente alterado; 2, moderadamente alterado; e 3, alteração severa
(A) Astenia	0 sem alteração; 1, levemente alterado; 2, moderadamente alterado; e 3, alteração severa
(S) Tensão	0 sem alteração; 1, levemente alterado; 2, moderadamente alterado; e 3, alteração severa
(I) Instabilidade	0 sem alteração; 1, levemente alterado; 2, moderadamente alterado; e 3, alteração severa

Voz 1: G R B A S I

Voz 2: G R B A S I

Voz 3: G R B A S I

Voz 4: G R B A S I

Voz 5: G R B A S I

Voz 6: G R B A S I

Voz 7: G R B A S I

Voz 8: G R B A S I

Voz 9: G R B A S I

Voz 10: G R B A S I

Voz 11: G R B A S I

Voz 12: G R B A S I

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO**

**Antônio Alexandre de Medeiros Lira
AAML**

**Modulação neurobiológica e empatia
no aprimoramento das habilidades de
comunicação em saúde**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre
2021

Antônio Alexandre de Medeiros Lira

AAML

Modulação neurobiológica e empatia no aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde

Projeto de pesquisa submetido ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Reabilitação da Fundação Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto
Alegre como requisito para qualificação de
doutorado

Orientador: Prof. Dra. Mauriceia Cassol

Porto Alegre

2021

Modulação neurobiológica e empatia no aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde

BANCA AVALIADORA

Profa. Dra. Marta Quintanilha Gomes

Departamento de Educação e saúde
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Aline de Souza Pagnussat

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Porto Alegre

2021

SUMÁRIO

1.	APRESENTAÇÃO:	5
2.	IDENTIFICAÇÃO:	5
3.	RESUMO	5
4.	EMBASAMENTO TEÓRICO	6
	4.2 EMPATIA.....	6
	4.3 COMUNICAÇÃO NÃO VERBAL	7
	4.3.1 LINGUAGEM CORPORAL	7
	4.3.2 EXPRESSÃO FACIAL	7
	4.3.3 VOZ E EMOÇÃO	8
	4.4 ASPECTOS NEUROBIOLÓGICOS DAS INTERAÇÕES SOCIAIS	8
	4.4.1 OCITOCINA	9
	4.5 A ATUAÇÃO DO FONAUDIÓLOGO NO APRIMORAMENTO DA COMUNICAÇÃO INTERPESSOAL	9
	4.5.1 PROCESSO DE COMUNICAÇÃO VERBAL CONSCIENTE	10
	4.5.2 COMUNICAÇÃO NÃO VIOLENTA	10
	4.6 RELAÇÃO MÉDICO-PACIENTE.....	10
5.	PROBLEMA	11
6.	JUSTIFICATIVAS	11
7.	HIPÓTESE	11
8.	OBJETIVOS	11
	8.1 OBJETIVO GERAL.....	11
	8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
9.	DESFECHOS PRIMÁRIOS:	12
10.	DESFECHOS SECUNDÁRIOS:	12
11.	DELINEAMENTO:	12
12.	SUJEITOS	12
	10.1 AMOSTRA	12
13.	METODOLOGIA	13
	11.1 DESENHO DO ESTUDO	13
	11.2 PARTICIPANTES	13
	11.3 RANDOMIZAÇÃO	13
	11.4 PLANEJAMENTO DO ESTUDO	13
	11.4.1 Coleta inicial.....	14
	11.4.2 Desempenho de papéis	15
	11.4.3 AVALIAÇÃO DO MARCADOR NEUROBIOLÓGICO OCITOCINA	16
	11.5 APRIMORAMENTO DAS HABILIDADES DE COMUNICAÇÃO EM SAÚDE E EMPATIA	17
	11.6 COLETAS PÓS-APRIMORAMENTO	19
	11.7 AVALIAÇÃO POR JUÍZES	19
14.	ANÁLISE DOS DADOS	20
15.	RISCOS E BENEFÍCIOS	21
16.	ASPECTOS ÉTICOS	22
17.	CRONOGRAMA	23
18.	ORÇAMENTO	24
19.	REFERÊNCIAS	25
20.	APÊNDICE	27
	APÊNDICE A (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- TCLE)	27
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	28
21.	ANEXOS	29
	ANEXO A – INVENTÁRIO DE EMPATIA (IE)	29
	ANEXO B – INVENTÁRIO DE HABILIDADES SOCIAIS (IHS)	31
	ANEXO C – QUESTIONÁRIO REDUZIDO DE AUTORREGULAÇÃO (QRAR).....	34
	ANEXO D – PROTOCOLO GLOBAL DE AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO NÃO VERBAL (NBAM).....	35
	ANEXO E – ESCALA CARE DE EMPATIA	37

1. Apresentação:

Título do projeto de trabalho: **Modulação neurobiológica e empatia no aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde**

Área de conhecimento: Ciências da Saúde

Sub-área de conhecimento: 4.07.00.00 – 3 Fonoaudiologia

Grupo de pesquisa: Estudos em Fonoaudiologia: Avaliação, promoção e reabilitação da comunicação humana.

Linha de pesquisa: Reabilitação Músculo-esquelética.

2. Identificação:

Autor: Antônio Alexandre de Medeiros Lira

E-mail do autor: alexandre.lira-al@hotmail.com

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mauriceia Cassol

E-mail da orientadora: mcassol@ufcspa.edu.br

3. RESUMO

Introdução: A comunicação é um processo de troca de informações, ideias e sentimentos entre um emissor e um receptor. Esse processo é importante no estabelecimento de relações mais assertivas durante o atendimento em saúde¹. Quando as relações interpessoais não são bem estabelecidas, pode haver prejuízos na forma em que nos comunicamos, ocasionando impactos sociais e profissionais que afetam a qualidade de vida do sujeito². Do ponto de vista fisiológico, diversas mudanças e adaptações ocorrem em nosso corpo de acordo com nosso estado emocional. Essas mudanças podem trazer alterações no comportamento e consequentemente na forma de comunicação³. **Objetivo:** Verificar a efetividade de um programa de aprimoramento das habilidades de comunicação nas interações sociais e na modulação dos parâmetros neurobiológicos em estudantes de medicina.

Método: Trata-se de um ensaio clínico randomizado onde serão convidados a participar do estudo acadêmicos do curso de medicina da UFCSPA. Os estudantes serão randomizados de acordo com o sexo e nota no Inventário de Habilidades Sociais (IHS) e divididos em Grupo Controle (GC) e Grupo Intervenção (GI). Todos os estudantes responderão os seguintes instrumentos: Questionário de caracterização da amostra, Inventário de Empatia (IE), Questionário Reduzido de Autorregulação (QRAR), Protocolo de reconhecimento de emoções faciais básicas (REF) e Protocolo de Impressões prosódicas de emoções básicas. Os participantes do GC e GI irão realizar uma tarefa de atendimento simulado a um ator profissional, membro da equipe de pesquisa, com o objetivo de mensurar a capacidade do participante em interagir de forma assertiva com o paciente nas diversas situações. Esse atendimento será gravado em vídeo. Três juízes, sendo um psicólogo especialista em comportamento não verbal e dois fonoaudiólogos que atuam na área de voz, avaliarão de forma cegada, os vídeos dos atendimentos simulados de ambos

os grupos nos seguintes aspectos: expressividade verbal, vocal, não verbal e empatia. Serão realizadas duas coletas de amostra de saliva em cada participante, de ambos os grupos, após o atendimento simulado, para verificação das respostas no parâmetro de ocitocina, sendo a primeira coleta antes da intervenção e a segunda após a última intervenção. O GI irá participar de 6 oficinas semanais com duração de duas horas cada e com ênfase no aprimoramento das habilidades de comunicação interpessoal: expressividade verbal, não verbal e empatia. O GC irá participar de uma única oficina com duração de três horas sobre como superar o medo de falar em público. Após as oficinas, ambos os grupos irão repetir todos os procedimentos realizados anteriormente: protocolos, atendimento simulado e coletas de saliva. Todos os dados serão tabulados e analisados estatisticamente.

Palavras-chave: Comunicação; relações interpessoais; empatia; treinamento da voz; neurotransmissores.

4. Embasamento teórico

4.1 Relações sociais

O ser humano é por essência um ser social e as relações sociais têm um papel-chave no bem-estar pessoal e profissional do ser humano. As interações sociais podem ser tanto um espaço para o estabelecimento de vínculos construtivos, como também pode ser um dos campos onde mais facilmente se produzem conflitos. Desta forma, a utilização de uma comunicação assertiva é essencial para que os relacionamentos interpessoais sejam eficazes. O desenvolvimento de habilidades sociais demonstra ser primordial na promoção de relações sociais bem-sucedidas. De acordo com a forma como nos comunicamos podemos ter ou não a compreensão, colaboração e envolvimento da outra pessoa neste processo^{1,2}. Um dos elementos que podem contribuir para uma melhor interação social é a empatia.

4.2 Empatia

A empatia é um componente essencial do comportamento humano e está relacionada à capacidade de percepção e envolvimento emocional com o outro. Sua origem tem referência com o cuidado materno em mamíferos sendo crucial para manutenção e regulação das interações sociais das pessoas. Podemos observar a presença de empatia por meio das trocas de expressões faciais, nas interações entre mães e filhos, como algo intrínseco ao ser humano. Mas a empatia pode ser observada em vários contextos sociais diferentes, demonstrando ser uma experiência

emocional compartilhada^{3,4}. Uma das formas de manifestação da empatia está na capacidade de percepção da comunicação não verbal do outro durante uma interação.

4.3 Comunicação não verbal

A comunicação não verbal é uma forma de expressão comunicativa que utiliza aspectos que relacionam o corpo e o ambiente. São manifestações comportamentais relacionadas ao contexto individual e social no qual o indivíduo está inserido. Por meio da comunicação não verbal conseguimos nos conectar à outra pessoa gerando percepção e assim criando relacionamentos eficazes no âmbito pessoal ou profissional. A comunicação não verbal traz elementos essenciais para que sejam estabelecidos o vínculo social e a empatia por meio do reconhecimento das emoções pela expressão facial e linguagem corporal⁵.

A utilização da comunicação não verbal é essencial para que haja envolvimento e conexão entre os sujeitos. Por meio dela, podemos expressar nossos sentimentos e intenções, e quando ela é compreendida de forma consciente pode-se compreender melhor o outro e assim perceber quais as intenções comunicativas estão sendo expressas. Essa competência permiti interagir de forma mais eficaz diante de um contexto específico⁶. A comunicação não verbal pode se manifestar por meio de alguns canais como a linguagem corporal e a expressão facial.

4.3.1 Linguagem corporal

A linguagem corporal é um canal da comunicação não verbal que traz alguns elementos que transmitem uma mensagem por meio da manifestação do corpo e que podem estar ligados ou não a uma mensagem verbal. Esses elementos da linguagem corporal são expressos por gestos, postura, toque, contato visual, imagem pessoal, distância interpessoal e o ambiente em que estão inseridos^{7,8}.

4.3.2 Expressão facial

A face tem grande capacidade comunicativa. Ela é um dos principais canais de comunicação de estados emocionais, é capaz de nos fornecer feedback não verbal da interação com os outros e é uma das principais fontes de informações. Essa

capacidade de expressar e interpretar expressões faciais nos outros começa já em nossa primeira infância, quando identificamos sinais que possam atender às nossas necessidades. Desenvolver a capacidade de ler e interpretar as expressões faciais das emoções, durante uma interação, é uma importante habilidade para criar conexão e gerar empatia. Além dos canais de linguagem corporal e expressão facial, a emoção também pode se manifestar por meio da voz^{7,9}.

4.3.3 Voz e emoção

Por meio de alterações em alguns parâmetros vocais é possível inferir sobre o estado emocional do outro. Assim como a face se ajusta em movimentos musculares adequados à cada estado emocional, a voz também sofre alterações nessas mudanças comportamentais. Os principais parâmetros vocais que se alteram de acordo com as mudanças emocionais são a frequência, qualidade vocal, ressonância, ritmo e intensidade. Da mesma forma, como na expressão facial, é possível treinar o reconhecimento de padrões vocais emocionais por meio da escuta de bancos de vozes com diversas manifestações emocionais. Aliar a capacidade de reconhecimento vocal das emoções a de leitura de expressões faciais pode ser um fator potenciador para conexão e interação humana^{7,10}.

4.4 Aspectos neurobiológicos das interações sociais

Estudos apontam que as interações sociais quando positivas ou negativas desencadeiam no corpo humano a liberação de neurohormônios que são estimulados no sistema nervoso central, mais especificamente no sistema límbico, e que podem contribuir ou não no fortalecimento das relações humanas¹¹. São exemplos de alguns neurohormônios liberados durante as interações sociais: ocitocina, vasopressina, dopamina, adrenalina, cortisol, serotonina e testosterona. Esses hormônios têm participação na modulação de comportamentos sociais e podem ser impactados por mudanças em padrões emocionais, comportamentais e corporais¹².

Algumas evidências demonstram que a aplicação de intervenções específicas é capaz de modular alguns destes parâmetros hormonais. Um estudo¹¹ envolvendo massagem e indução de emoção positiva e negativa em mulheres, demonstrou maiores níveis de ocitocina no grupo de massagem e indução positiva e níveis baixos no grupo com indução negativa. Em uma pesquisa envolvendo jovens israelenses e

palestinos foi aplicado um programa para aprimoramento da comunicação destes grupos através do diálogo. O programa foi capaz de melhorar os parâmetros de empatia entre os sujeitos do grupo intervenção e seus níveis de ocitocina aumentaram, fato ocorrido apenas no grupo que participou das sessões de aprimoramento comunicativo¹³.

4.4.1 Ocitocina

A ocitocina é um neuropeptídeo sintetizado no hipotálamo e lançado para a circulação através da neurohipófise. São encontrados neuroreceptores de ocitocina na amígdala, região relacionada a comportamentos sociais. A partir de interações sociais positivas como a empatia, ela pode ser encontrada em níveis maiores^{11,12}. Já quando estamos em comportamentos sociais mais agressivos seus níveis são reduzidos e consequentemente ocorre a diminuição da capacidade de reconhecimento emocional do outro¹⁴.

4.5 A atuação do Fonoaudiólogo no aprimoramento da comunicação interpessoal

A comunicação é a principal forma de estabelecer interações sociais e essas interações podem ser influenciadas de acordo com a forma como nos comunicamos. O fonoaudiólogo é o profissional que atua na pesquisa, avaliação e aprimoramento da comunicação humana. A literatura aponta o fonoaudiólogo como o profissional mais recomendado para atuar no aprimoramento das habilidades de comunicação¹⁷. Um estudo realizado por fonoaudiólogos envolvendo o treinamento das habilidades de comunicação, em estudantes universitários, verificou que após as intervenções os sujeitos desenvolveram aspectos orais e corporais da comunicação, assim como, aspectos emocionais e interacionais¹⁸.

Pode-se então esperar que sujeitos que demonstrem uma comunicação verbal e corporal mais consciente, com empatia e de forma clara e objetiva possam ser capazes de estabelecer melhores interações sociais e assim apresentem modulações neurobiológicas específicas em relação a outros tipos de indivíduos¹².

4.5.1 Processo de comunicação verbal consciente

Além do aprimoramento de aspectos relacionados à forma como nos comunicamos, o fonoaudiólogo pode se utilizar de algumas estratégias que visam o desenvolvimento de uma expressão verbal mais consciente. Diversas abordagens têm como objetivo aprimorar a capacidade das pessoas em expressar-se de forma autêntica e gerar conexão com o outro. Uma das estratégias mais utilizadas é a Comunicação Não Violenta (CNV).

4.5.2 Comunicação Não Violenta

A Comunicação Não Violenta é um processo de comunicação consciente criado pelo pesquisador Marshall Rosenberg. O objetivo da CNV é inspirar conexões sinceras entre as pessoas de maneira que as necessidades de todos sejam atendidas por meio da doação compassiva. O processo da CNV envolve a expressão verbal e a escuta empática. Essa metodologia oferece uma forma de como expressar nossas ideias sem qualquer crítica ou análise externa que insinue que o que sentimos está errado¹⁹.

4.6 Relação médico-paciente

A relação entre médico-paciente é um elemento visto cada vez mais como essencial no atendimento médico auxiliando desde o processo diagnóstico à aderência ao tratamento. A comunicação está inserida como um importante aspecto na construção desta relação de forma eficaz. Estudos demonstram que uma comunicação eficaz aliada a fatores como empatia e escuta ativa, podem ser determinantes para maior adesão e melhores resultados aos tratamentos^{20,21}.

Diversos estudos já demonstram resultados positivos no treinamento das habilidades de comunicação em estudantes de medicina^{22,23,24}. Os principais resultados têm relação com aumento empatia dos estudantes e melhores habilidades lidar com o paciente e em situações de conflito.

5. Problema

Um programa de aprimoramento das habilidades de comunicação com enfoque na empatia, pode promover a modulação em parâmetros neurobiológicos e melhorar a qualidade das interações sociais em saúde?

6. Justificativas

- Existe a necessidade de aprofundar o tema para produzir maiores evidências científicas relacionadas aos efeitos de intervenções fonoaudiológicas na contribuição com o aperfeiçoamento da comunicação em interações sociais;
- Estudos demonstram que um processo de comunicação eficaz entre médico e paciente é imprescindível para o sucesso no processo terapêutico;
- A realização de um aprimoramento de comunicação interpessoal, durante o período de formação do profissional médico, poderia auxiliá-lo no exercício de sua profissão promovendo uma relação positiva com os pacientes;
- Pessoas que utilizam uma comunicação eficaz em suas relações interpessoais demonstram parâmetros neurobiológicos específicos quando comparadas a diferentes formas de interação.

7. Hipótese

Supõe-se que os estudantes que irão participar das oficinas de aprimoramento comunicacional demonstrem resultados positivos nos aspectos interacionais da comunicação (expressividade verbal, não verbal e empatia) e apresentem modulações no padrão neurobiológico com elevação dos índices de ocitocina ao final do estudo.

8. Objetivos

8.1 Objetivo geral

Verificar a efetividade de um programa de aprimoramento das habilidades de comunicação e empatia na modulação da ocitocina e nos aspectos interacionais em estudantes de medicina.

8.2 Objetivos específicos

- Correlacionar as modulações neurohormonais com os parâmetros de empatia; pré e pós aprimoramento;
- Avaliar as modulações neurohormonais da ocitocina: pré e pós aprimoramento fonoaudiológico;
- Analisar o impacto das oficinas de aprimoramento nos parâmetros de interação social: habilidades sociais e empatia;
- Verificar o efeito do aprimoramento fonoaudiológico na percepção e utilização da expressão não verbal;

9. Desfechos primários:

Modulação da ocitocina; empatia; expressividade comunicativa.

10.Desfechos secundários:

Autorregulação; habilidades sociais; reconhecimento de expressões faciais; percepção prosódica emocional da voz.

11.Delineamento:

Ensaio clínico randomizado

12. Sujeitos

Serão convidados a participar da pesquisa estudantes de medicina matriculados em qualquer período letivo.

10.1 Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado por meio da diferença entre duas medidas com grupos dependentes com o Teste-T Pareado. Os parâmetros adotados para o teste foram α de 5%, β de 10% e K de 90%. Para o cálculo foi utilizada a estimativa da ocitocina antes e após a intervenção em indivíduos que obtiveram altas notas em um parâmetro de empatia¹².

Foram utilizados os seguintes parâmetros dessa variável: desvio padrão (30,09) e mínima diferença clinicamente relevante (7 pontos). O tamanho da amostral calculado foi de 34 participantes por grupo.

13. Metodologia

11.1 Desenho do estudo

Trata-se de um ensaio clínico randomizado

11.2 Participantes

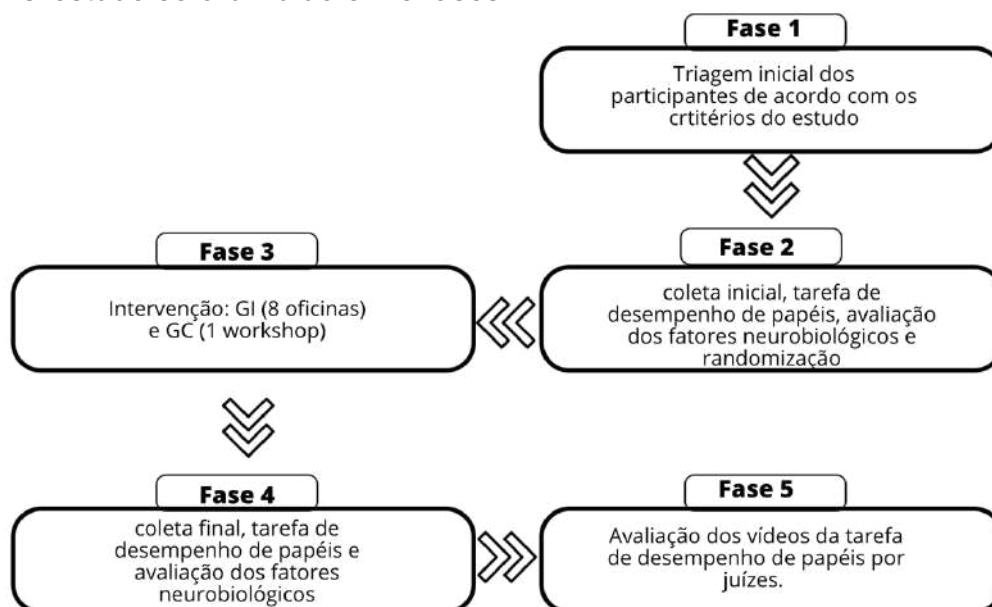
A amostragem será feita por conveniência e serão convidados estudantes de medicina que tenham interesse em participar da pesquisa. Os convites serão realizados via ASCOM (Assessoria de comunicação-UFCSPA) e serão enviados via e-mail e/ou por mídias sociais e disponibilizados aos alunos participantes do programa de tutoria do curso de medicina. Serão incluídos na amostra estudantes de medicina com idade entre 18 e 45 anos em qualquer período de formação. Todos os participantes devem assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice B). Como critério de exclusão adotar-se-á: ter participado de algum treinamento de comunicação interpessoal ou similar, indivíduos que frequentarem menos que 75% das intervenções durante o estudo.

11.3 Randomização

Os participantes serão randomizados de forma estratificada pela plataforma random.org de acordo com o sexo e nota no Inventário de Habilidades Sociais- IHS (anexo C) e serão divididos em GC (Grupo controle) e GI (Grupo intervenção).

11.4 Planejamento do estudo

O estudo será dividido em 5 fases:



11.4.1 Coleta inicial

No primeiro momento todos os participantes responderão os seguintes questionários:

- Questionário de caracterização da amostra (Apêndice A);
- Inventário de Empatia⁴ (Anexo A)
 - O Inventário de Empatia (IE) é um protocolo de autoavaliação que tem por objetivo medir a capacidade de empatia do indivíduo. Ele avalia componentes cognitivos, afetivos e comportamentais da empatia e é formado por 40 itens que são respondidos por meio de uma escala tipo *Likert*, de acordo com as frequências dos comportamentos descritos, com variação entre nunca (1) e sempre (5).
- Inventário de habilidades sociais²⁵ (IHS) (Anexo B)
 - O Inventário de Habilidades Sociais é um instrumento de autorrelato que avalia as dimensões situacionais e comportamentais das habilidades sociais. Esse instrumento é validado no Brasil e compreende cinco fatores sociais: Enfrentamento com risco, autoafirmação na expressão de afeto positivo, conversação e desenvoltura social, auto exposição a desconhecidos e a situações novas e autocontrole da agressividade e situações aversivas. O IHS é composto por 42 itens que são marcados em uma folha de respostas em uma escala tipo Likert de cinco pontos variando entre nunca (1) e sempre (5).
- Questionário reduzido de autorregulação²⁶ (Anexo C)
 - A autorregulação é uma função executiva regulada pelo córtex pré-frontal do lobo frontal do cérebro essencial para manter o sujeito ativo na busca pelos seus objetivos. O questionário reduzido de autorregulação é uma versão adaptada ao português brasileiro do Short Self-Regulation Questionnaire (SSRQ) que contém 31 questões que são assinaladas em uma escala tipo *Likert* e que avaliam a capacidade generalizada para regular o comportamento de modo a alcançar resultados futuros desejados.

- Teste de reconhecimento de emoções faciais básicas²⁷
 - A habilidade para reconhecer emoções básicas no outro é essencial para que haja conexão interpessoal e empatia. A face nos revela o estado emocional por meio de movimentos musculares que foram amplamente estudados, quantificados e avaliados. A tarefa de reconhecimento de emoções básicas (alegria, tristeza, raiva, nojo, desprezo, surpresa e medo) será realizada por meio da visualização de pequenos vídeos, com exibição de expressões faciais em atores, sem som, pertencente à um banco de dados criado com base nos testes de Ekman e Friesen. Cada sujeito irá visualizar 15 vídeos, com duração de 3 segundos aproximadamente, e em seguida fará descrição da emoção percebida dentre as sete emoções básicas. Não há limite de tempo para esta atividade e o sujeito poderá repetir a visualização de cada vídeo.
- Teste de Impressões prosódicas de emoções básicas²⁸ (*Database of German Emotional Speech*)
 - O *Database of Emotional Speech* é um banco de dados alemão de vozes com variações emocionais na prosódia relacionados as emoções básicas. Esse banco contém 10 sentenças com 6 emoções (neutro, raiva, medo, alegria, tristeza, nojo e tédio) gravados por 10 atores. A percepção da variação emocional por meio da voz é um fator auxiliar na percepção do estado emocional do outro o que pode facilitar no processo de empatia. Os procedimentos adotados nesse teste serão a escuta de 10 frases e descrição de qual emoção foi percebida por cada sujeito.

11.4.2 Desempenho de papéis

Logo após o preenchimento dos protocolos, os sujeitos irão participar de um atendimento médico simulado com o contexto de duas situações: resolução de conflitos e tomada de decisões. Nesta etapa cada participante, de ambos os grupos, irá exercer um papel de profissional da medicina e atenderá um membro da equipe de pesquisa de forma simulada. O papel do paciente será exercido por um ator profissional o qual atuará trazendo uma demanda pré-estabelecida, pela equipe de

pesquisa, a fim de que seja resolvida pelos participantes, de forma individual, quando solicitados a atuarem como profissional da saúde. Os participantes não terão conhecimento de que se trata de uma atuação por parte dos pacientes.

As demandas a serem resolvidas pelos participantes, no papel de profissional da medicina, serão sorteadas de forma aleatória e terão como tema: primeira consulta, comunicação de más notícias, acompanhamento terapêutico e orientações a familiares.

Essa etapa terá a duração média de 5 minutos e será registrada em vídeo para posterior avaliação de juízes especialistas. A realização dessa tarefa será em uma sala reservada, com horário agendado para cada participante. Será realizada na presença do participante, do ator e de um membro da equipe de pesquisa para gravação em vídeo da atividade.

A tarefa de desempenho de papéis foi elaborada com base em um estudo semelhante realizado com estudantes de medicina que receberam treinamento de comunicação e exerceram o papel de profissional de medicina, realizando atendimentos simulados em pacientes que eram atores profissionais²⁹. O objetivo dessa atividade é mensurar a capacidade do participante em interagir de forma assertiva com o paciente nas diversas situações.

11.4.3 Avaliação do marcador neurobiológico ocitocina

No segundo momento, após a coleta inicial e atividade de desempenho de papéis, serão realizadas as coletas para a avaliação do marcador neurobiológico ocitocina. Segundo a literatura esse fator está relacionado a aspectos interacionais na comunicação. A empatia tem relação com o aumento da ocitocina^{3,12-16}.

Para essa avaliação, serão realizadas coletas de saliva dos participantes que serão posteriormente analisadas em laboratório. Serão coletadas duas amostras em cada fase, sendo a primeira antes da tarefa de desempenho de papéis - *base line*, e a segunda 15 minutos após a realização da tarefa, a qual será posteriormente analisada para verificação dos índices de ocitocina presentes na amostra.

As coletas serão realizadas em um mesmo período do dia, manhã (08h – 11h) ou tarde (14h-17h), observando jejum de uma hora antes das coletas, em todos os participantes e em dois momentos: fases 2 e 4. Serão realizadas coletas de saliva por meio do dispositivo Salivette, posteriormente armazenados a temperaturas inferiores

a -20°C, e as análises serão realizadas no laboratório de imunologia celular e molecular da UFCSPA. Para realização deste procedimento, os participantes irão em um ambiente isolado, sem a presença de qualquer outro participante ou membro da equipe de pesquisa, mascar o dispositivo Salivette por 2 minutos e depois retornar ao local da entrega da amostra, que será feita a um membro da equipe de pesquisa específico e qualificado para recepção e armazenamento dessa amostra.

Para análise das amostras será utilizado o teste de “ELISA” (Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay) que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Os modelos para análise serão da marca Cayman Chemical – CAYM 500440-96SW.

O objetivo destas análises é a verificação do efeito das interações sociais, observadas aqui por meio da tarefa de desempenho de papéis, no aspecto neurobiológico de ocitocina nos participantes.

Para controle de fatores que possam interferir nas medidas de ocitocina os participantes serão questionados a respeito do uso de algumas substâncias: antidepressivos, ansiolíticos, utilização de drogas psicoativas como o MDMA e ocitocina em spray.

Todos os sujeitos serão orientados quanto ao procedimento e seguirão todos os protocolos preventivos e sanitários estabelecidos pela UFCSPA segundo o item 15. Os participantes que não estiverem aptos, segundo esses critérios, não irão realizar a coleta das amostras.

11.5 Aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde e empatia

O GI irá participar de 6 oficinas de aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde e empatia com duração de 2 horas e realizadas semanalmente, de forma presencial, em pequenos grupos, distribuídos segundo à disponibilidade dos participantes.

As oficinas contemplarão conteúdos relacionados ao desenvolvimento da expressividade da comunicação verbal, não verbal, vocal e da empatia, voltados ao aprimoramento das relações humanas. Esses conteúdos foram escolhidos baseados em estudos de aprimoramento das habilidades de comunicação em jovens¹² e estudantes de medicina^{8,18,21-24}.

Os encontros serão ministrados por um fonoaudiólogo especialista em voz e com prática profissional nesse tipo de abordagem. A metodologia das oficinas de aprimoramento contemplará um momento de intervenção pedagógica, no qual serão discutidos os conteúdos específicos programados, e um momento de intervenção prática, no qual serão treinadas estratégias de comunicação interpessoal entre os participantes com o objetivo de promover um aprofundamento dos conhecimentos expostos. Além da realização dos encontros os participantes receberão um material de apoio, impresso e digital, contendo os pontos principais de cada oficina para auxiliá-los no processo de desenvolvimento.

O aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde no GI abordará os seguintes temas: Escuta ativa, empatia, aspectos da comunicação não verbal (linguagem corporal, expressões e microexpressões faciais, sinais vocais), aspectos da comunicação verbal e Comunicação verbal consciente: Comunicação Não Violenta. O quadro 1 refere-se aos conteúdos e intervenções realizadas em todas as oficinas no GI.

O GC irá participar de um *workshop* de comunicação com duração de 3 horas com o tema: Como superar o medo para falar em público.

	Conteúdo	Estratégias e atividades
Oficina 1	Escuta ativa	Intervenção pedagógica: Conteúdo expositivo sobre escuta ativa • Como ouvir o outro • O poder da presença Prática em grupo sobre escuta ativa
Oficina 2	Empatia	Intervenção pedagógica: Conteúdo expositivo sobre empatia • Conceito de empatia • Como desenvolver empatia durante o atendimento médico • Relação entre comunicação e empatia Prática em grupo sobre empatia
Oficina 3	Aspectos da comunicação não verbal – linguagem corporal	Intervenção pedagógica: Conteúdo expositivo sobre comunicação não verbal: • Gestos • Postura • Toque • Contato visual • Imagem pessoal • Distância interpessoal Prática em grupo sobre percepção e leitura de linguagem corporal

Oficina 4	Aspectos da comunicação não verbal – expressão e microexpressão facial	Intervenção pedagógica: • Conteúdo expositivo sobre leitura e interpretação das expressões faciais Prática sobre leitura e interpretação de expressões e microexpressões faciais
Oficina 5	Aspectos da comunicação verbal	Intervenção pedagógica: • Conteúdo expositivo sobre sinais vocais durante a comunicação • Voz e emoção • Como identificar padrões emocionais na voz Prática sobre expressividade vocal (utilização de pausa, ênfase e entonação)
Oficina 6	Aplicabilidade do modelo de comunicação verbal consciente: Comunicação Não Violenta (CNV).	Intervenção pedagógica: • Conceito de CNV • Componentes da CNV • A CNV durante o atendimento médico Práticas em grupo de CNV

11.6 Coletas pós-aprimoramento

Após o *workshop* de comunicação para o GC e as oficinas de aprimoramento fonoaudiológico para o GI os participantes respectivamente serão convidados à responder os anexos (A,B,C), os testes de reconhecimento de emoções faciais básicas e de Impressões prosódicas de emoções básicas e irão realizar a atividade de desempenho de papéis (atendimento simulado - **item 11.4.2**). Em seguida, será coletada a segunda amostra de saliva dos participantes para avaliação dos parâmetros neurobiológicos de ocitocina em ambos os grupos.

11.7 Avaliação por juízes

Os vídeos referentes à tarefa de desempenho de papéis realizados pelos participantes da pesquisa, nos momentos pré e pós-intervenção, serão enviados, de forma aleatória, em relação ao grupo e momentos, para os juízes como forma de cegamento. Os juízes serão formados por três avaliadores sendo um psicólogo especialista em comportamento não verbal e dois fonoaudiólogos que atuam na área de voz. A escolha destes juízes será realizada de acordo com a expertise de cada profissional em relação à temática abordada no estudo. A avaliação pelos juízes tem como objetivo mensurar a utilização da expressividade comunicativa durante o atendimento simulado realizado por todos os participantes de ambos os grupos. Os parâmetros de comunicação avaliados pelos juízes serão: expressividade não verbal e aspectos relacionados à empatia sob a perspectiva do outro. Nesta etapa, serão

adotados dois instrumentos: protocolo global de avaliação do comportamento não verbal *Non verbal Behavior Analysis Matrix* – NBAM³⁰ (ANEXO E) e o protocolo *Consultation and Relational Empathy* -CARE³¹ (ANEXO F). Esses instrumentos serão utilizados pelos três juízes que deverão possuir conhecimento e prática em sua utilização.

O protocolo NBAM³⁰ descreve e avalia a utilização do comportamento não verbal do sujeito. Inicialmente o protocolo utiliza a descrição dos dados observados, ou seja, aquilo que é percebido, sem interpretações, apenas relatando aspectos da expressão facial, linguagem corporal e verbais do falante. No segundo momento, são feitas as inferências e hipóteses segundo os dados apresentados pelos sujeitos.

Já o protocolo CARE³², avalia a empatia sob a perspectiva do outro. É uma escala que foi desenvolvida na Escócia com o objetivo de ser utilizada em consultórios em nível de atendimento primário. Por meio dela, o paciente avalia a quantidade de empatia que foi percebida após cada atendimento médico visando ser um instrumento capaz de auxiliar os profissionais na melhora da relação médico-paciente.

14. Análise dos dados

Os dados do presente estudo passarão por análise descritiva e inferencial. O software utilizado será o SPSS 25.0.

A descrição das variáveis qualitativas nominais será realizada por meio de frequência relativa percentual e de frequência absoluta. A descrição das variáveis quantitativas contínuas e quantitativas discretas será realizada por meio de medidas de variabilidade (desvio-padrão), tendência central (média e mediana) e posição (mínimo, primeiro quartil, terceiro quartil e máximo).

A análise inferencial de associação entre as variáveis qualitativas nominais e os grupos de pesquisa será realizada com o teste Qui-Quadrado de Pearson. Para selecionar o teste adequado, os dados quantitativos contínuos e discretos passarão por análise de normalidade com o Teste Shapiro Wilk. A comparação das variáveis quantitativas entre dois grupos independentes será realizada com o Teste-T Independente ou com o Teste de Mann-Whitney. A comparação simultânea entre os momentos de avaliação e os grupos de intervenção será realizada com o teste ANOVA de medidas repetidas. Nos casos em que houver diferença estatística no teste de ANOVA de medidas repetidas será realizada a comparação múltipla por meio

do Teste de Tukey, e os valores de significância serão ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes. A correlação entre as variáveis quantitativas foi realizada com o teste de Correlação de Pearson e teste de Correlação de Spearman. Será considerado um nível de significância de 5% para as análises inferenciais.

15. Riscos e benefícios

É importante ressaltar que, tratando-se de uma pesquisa que envolve seres humanos, existem riscos que afetam o indivíduo de forma psíquica, física, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual. Porém, estes riscos serão amenizados por meio de acolhimento, pelos pesquisadores nos casos em que houver desconforto, e se necessário, realizados encaminhamentos específicos e acompanhamento especializado.

Os benefícios esperados neste estudo são o aprimoramento das habilidades de comunicação interpessoal e, em consequência dessa mudança comportamental, usufruir de uma melhoria na sua qualidade de vida e desempenho profissional.

15.1 Prevenção de riscos relacionados à pandemia COVID-19

Para fins de prevenção e proteção contra o contágio do novo coronavírus, serão adotadas as seguintes medidas durante a pesquisa: higienização das salas destinadas as oficinas, abertura de janelas para ventilação do ambiente, ocupação da sala de acordo com o limite da capacidade de cada sala estabelecido pela UFCSPA, distanciamento de dois metros entre cada indivíduo, disponibilização de álcool em gel em sala, utilização de máscaras cirúrgicas triplas ou PFF2 que serão disponibilizadas pelos pesquisadores aos participantes, e demais atribuições que forem solicitadas de acordo com as diretrizes de segurança em saúde estabelecidas pela UFCSPA. Além disso, todos os participantes deverão ter sido imunizados, em segunda dose para COVID-19 e não poderão participar se apresentarem qualquer sintoma respiratório durante as oficinas.

Os sujeitos serão orientados que, ao surgimento de sintomas respiratórios, não participem das oficinas, realizem o exame diagnóstico de COVID-19 e comuniquem de imediato a equipe de pesquisa. Nesses casos, as oficinas serão suspensas até o resultado diagnóstico do sujeito. Em caso positivo, todos os sujeitos precisarão realizar o teste diagnóstico para COVID-19. Caso negativo, as oficinas prosseguirão.

16. Aspectos éticos

Este trabalho será realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA para a coleta dos dados e está de acordo com os aspectos éticos exigidos para o desenvolvimento de pesquisas em seres humanos, conforme resolução 466/12. O estudo será registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC). Os indivíduos que participarem do grupo controle serão convidados a participar de uma palestra de comunicação em saúde, ao fim da pesquisa, visando o recebimento da intervenção.

17. CRONOGRAMA

Período	Elaboração do projeto	Submissão ao CEP	Coleta dos dados <i>baseline</i>	Oficinas	Segunda coleta de dados	Análise dos dados	Revisão de literatura	Redação dos manuscritos
2021	X						X	
Fev								
Mar	X						X	
Abr	X						X	
Mai	X						X	
Jun	X						X	
Jul	X						X	
Ago	X						X	
Set	X						X	
Out		X					X	
Nov		X					X	
Dez		X					X	
2022		X					X	
Jan								
Fev		X					X	
Mar		X					X	
Abr			X				X	
Mai			X	X			X	
Jun				X			X	
Jul				X			X	
Ago				X	X		X	
Set					X	X	X	
Out						X	X	X
Nov						X	X	X
Dez						X	X	X
2023						X	X	X
Jan								
Fev						X	X	X
Mar						X	X	X
Abr						X	X	X
Mai						X	X	X
Jun						X	X	X
Jul						X	X	X
Ago						X	X	X
Set						X	X	X

18. ORÇAMENTO

Produto	Fonte	Destino	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Caneta esferográfica	Compra	Anotações	50	R\$1,00	R\$50,00
Fotocópias Preto/branco	Compra	Protocolos	500	R\$0,10	R\$50,00
Pasta para arquivo	Compra	Arquivamento	2	R\$15,00	R\$30,00
Caixa de clips	Compra	Organização de material	1	R\$3,00	R\$3,00
Folhas A4	Compra	Anotações	100	R\$0,08	R\$8,00
Tubo Salivette	Compra	Coleta de amostra	100	R\$ 430,12	R\$430,12
Kit ELISA	Compra	Análise de amostra (Ocitocina)	192	R\$2.526,09 (96 poços)	R\$5.052,18
Total					R\$5.623,30

19. REFERÊNCIAS

- 1- Grazziotin JBDD, Scortegagna SA. **Relacionamento interpessoal, produtividade e habilidades sociais: um estudo correlacional.** Psico-USF. 2013; 18(3):491-500
- 2- Bandeira M, et al. **Qualidades psicométricas do Inventário de Habilidades Sociais (IHS): estudo sobre a estabilidade temporal e a validade concomitante.** *Estudos de psicologia* 5.2. 2000: 401-419.
- 3- Filgueiras GB, et al. **Aspectos neurobiológicos e sociais da evolução da empatia humana.** Research gate. 2019
- 4- Falcone Eliane Mary et al. **Inventário de Empatia (IE): desenvolvimento e validação de uma medida brasileira.** Avaliação Psicológica: Interamerican Journal of Psychological Assessment. 2008;(7)3:321-334.
- 5- Santos TD, Adrada e Silva MA. **Comunicação não verbal com profissionais da voz: o que se pesquisa na fonoaudiologia.** Revista CEFAC. 2016;18(6):1447-1455
- 6- Sousa LFLL, Sena EFC. **A importância da comunicação não-verbal do professor universitário no exercício de sua atividade profissional.** Revista CEFAC. 2010;2(5):784-787
- 7- Knapp ML, Hall JA. **Comunicação não verbal na interação humana.** JSN editora,1999.
- 8- Hale AJ, Freed J, Ricotta D, Farris G, Smith CC. **Twelve tips for effective body language for medical educators.** Medical teacher. 2017; 39(9): 914-919.
- 9- Ekman P. **Facial expression and emotion.** American psychologist.1993;48 (4):384, 1993.
- 10-Scherer KR. **Expression of emotion in voice and music.** Journal of voice.1995;9(3): 235-248.
- 11-Campos DCF, Graveto JMN. **Oxitocina e comportamento humano.** Revista de Enfermagem Referência. 2010; 3(1):125-130
- 12-Influs Moran, et al. **A social neuroscience approach to conflict resolution: dialogue intervention to Israeli and Palestinian youth impacts oxytocin and empathy.** Social neuroscience. 2019;14(4):378-389
- 13-Carney DR, Cuddy AJC, Yap AJ. **Power posing: Brief nonverbal displays affect neuroendocrine levels and risk tolerance.** Psychological science.2010;(21)10:1363-1368
- 14-Marsh N et al. **Oxytocin and the neurobiology of prosocial behavior.** The Neuroscientist. 2020: DOI:10.1177/1073858420960111
- 15-Campos JF, David HMSL. **Análise de cortisol salivar como biomarcador de estresse ocupacional em trabalhadores de enfermagem.** Revista Enfermagem UERJ.2014;(22)4: 447-453.
- 16-Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. **Salivary cortisol as a biomarker in stress research.** Psychoneuroendocrinology.2009; (34)2:163-171.
- 17-Breakey LK. **Fear of public speaking-the role of the SLP.** Thieme Medical Publishers. 2005:107-117.
- 18-Souza RASA, Fernandes ACN, Ferreira LP. **Oficina de expressividade para universitários em situação de apresentação de seminários.** Distúrbios da Comunicação. 2013;(25)3.

- 19-Rosenberg MB. **Comunicação Não Violenta: técnicas para aprimorar relacionamentos pessoais e profissionais.** Ágora, 2006.
- 20-Marinus M, Queiroga B, Moreno L, Lima L. **Comunicação nas práticas em saúde: revisão integrativa da literatura.** Saúde e Sociedade 2014; (23):1356-1369.
- 21-Barros PS, Falcone EMO, Pinho VD. **Avaliação da empatia médica na percepção de médicos e pacientes em contextos público e privado de saúde.** Arq. ciênc. Saúde. 2011;(18)1:36-43.
- 22-Kataoka H, Iwase T, Ogawa H, Mahmood S, Sato M, De Santis J, Gonnella, J. **Can communication skills training improve empathy? A six-year longitudinal study of medical students in Japan.** Medical teacher.2019;41(2):195-200.
- 23-Son D, Shimizu I, Ishikawa H, Aomatsu M, Leppink J. **Communication skills training and the conceptual structure of empathy among medical students.** Perspectives on medical education.2018; 7(4): 264-271.
- 24-D'souza PC, Rasquinha SL, D'souza TL, Jain A, Kulkarni V, Pai K. **Effect of a single-session communication skills training on empathy in medical students.** Academic Psychiatry.2019;1-6.
- 25-Fleck Marcelo et al. **Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida "WHOQOL-bref".** Revista de saúde pública. 2000; (34):178-183
- 26-Zilda AP, Del Prette A, Barreto MCM. **Análise de um Inventário de Habilidades Sociais (IHS) em uma Amostra de Universitários.** Analise. 1998;(14) 3: 219-228
- 27-Almeida AA, Behlau M. **Adaptação cultural do Questionário Reduzido de Autorregulação: sugestões de aplicação para área de voz.** CoDAS.2017;(29)5
- 28-Ávila RF et al. **Empatia e reconhecimento de expressões faciais de emoções básicas e complexas em estudantes de Medicina.** Jornal Brasileiro de Psiquiatria. 2016; (65)3:209-214
- 29-Burkhardt F et al. **A database of German emotional speech.** In: Ninth European Conference on Speech Communication and Technology. 2005
- 30-Bagacean C et al. **Simulated patient and role play methodologies for communication skills and empathy training of undergraduate medical students.** BMC medical education.2020; 20(1):1-8.
- 31-López R, Gordillo F, Soto J.**Protocolo NBAM (Nonverbal Behavior Analysis Matrix). Manual de Análisis de Comportamiento no Verbal: más allá de la comunicación.** Pirámide. 2016:178-191.
- 32-Scarpellini GR et al. **Escala CARE de empatia: tradução para o português falado no Brasil e resultados iniciais de validação.** Medicina (Ribeirão Preto). 2014;(47)1:51-58

20. APÊNDICE

Apêndice A (Termo de consentimento Livre e Esclarecido- TCLE)



Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nós, Profa. Dra. Mauriceia Cassol e doutorando Antônio Alexandre de Medeiros Lira, responsáveis pela pesquisa **"Modulação neurobiológica e empatia no aprimoramento das habilidades de comunicação em saúde"** estamos realizando este convite para você participar deste estudo.

A presente pesquisa tem como objetivo **verificar a efetividade de um programa de aprimoramento das habilidades de comunicação e empatia na modulação da ocitocina e nos aspectos interacionais em estudantes de medicina**. Acreditamos que ela seja importante, pois existem poucos estudos na área. O estudo será realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Serão realizadas avaliações antes e após o período de intervenção do estudo. A intervenção acontecerá por meio da realização de 6 (seis) oficinas realizadas de forma semanal com a duração de 2 horas. Essas oficinas contemplarão aspectos relacionados ao aprimoramento da comunicação em saúde e empatia. E as avaliações e a reavaliações serão realizadas por meio da aplicação de escalas e testes e coletas de saliva para análise da ocitocina.

É importante destacar que, tratando-se de uma pesquisa que envolve seres humanos, existem riscos que afetam o indivíduo de forma psíquica, física, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual. Porém, estes riscos serão amenizados por meio de acolhimento pelos pesquisadores nos casos em que houver desconforto e realizados os devidos encaminhamentos e acompanhamentos. Os benefícios esperados neste estudo são o aprimoramento das habilidades de comunicação interpessoal e empatia, em consequência dessa mudança comportamental, usufruir de uma melhoria na sua qualidade de vida pessoal e profissional.

Durante todo o período da pesquisa você pode esclarecer qualquer dúvida, bastando para isso entrar em contato com algum dos pesquisadores responsáveis ou com o Comitê de Ética da UFCSA. Você tem o direito de não aceitar participar desta pesquisa ou de retirar a sua permissão a qualquer momento, sem riscos de prejuízos ou perda de benefícios.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, sendo garantida privacidade do participante e assegurado o sigilo da sua participação.

Os gastos utilizados para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente causados pela participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Caso tenha alguma dúvida em relação ao estudo ou sobre os seus direitos como voluntário da pesquisa, contate a Profa. Dra. Mauriceia Cassol (pesquisadora responsável), telefone (51) 3303-8884, e-mail m.cassol@ufcspa.edu.br, ou o doutorando Antônio Alexandre de Medeiros Lira (pesquisador), telefone (48) 98500-3752, e-mail alexandre.lira-al@hotmail.com, ou o Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSA, telefone (51) 3303-8804, endereço: Rua Sarmento Leite, 245.

Eu após a leitura e esclarecimento de dúvidas referentes a este documento, acredito estar devidamente informado(a) acerca desta pesquisa, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento sem riscos de prejuízos e perda de benefícios. Estou ciente em relação aos objetivos, à importância do estudo, aos procedimentos aos quais serei submetido(a), aos riscos e benefícios desta pesquisa e à garantia do anonimato e esclarecimentos sempre que desejar. Diante disso, aceito participar desta pesquisa de forma voluntária. Confirmando que recebi uma via deste documento.

Assinatura do participante

Nome do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

Mauriceia Cassol

Nome do Pesquisador Responsável

_____ de _____ de 20____

Apêndice B – Questionário de Caracterização da Amostra

Q1 Nome completo: _____
Q2 Sexo: (M) (F) **Q3** Data de nascimento: ____/____/____ **Q4** Idade: ____ **Q5** Estado civil: _____ **Q6** Telefone: (____) _____ - _____ **Q7** E-mail: _____
Q8 Etnia: () Branca () Parda () Negra () Indígena () Amarela
Q9 Curso de graduação _____ **Q10** Semestre: _____
Q11 Realiza atualmente tratamento(s) terapêutico(s)/medicamentoso(s)?
() Sim () Não **Q11.1** Se sim, que tipo de tratamento(s):

Q12 Quantas horas dorme por dia? _____

Q13 Como você avalia a qualidade do seu sono?

() Ótimo () Bom () Regular () Ruim

Dê uma nota de 0 à 10 para as seguintes afirmações, considerando-se 0 como nota mínima/definitivamente não; e 10, nota máxima/definitivamente sim.

Q14 Qual nota você daria para a sua saúde em geral:

() 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () 8 () 9 () 10

Q15 Você se considera uma pessoa tímida?

() 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () 8 () 9 () 10

Q16 Você se considera uma pessoa extrovertida?

() 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () 8 () 9 () 10

Q17 Você se considera um bom comunicador?

() 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 () 7 () 8 () 9 () 10

21. ANEXOS

Anexo A – Inventário de Empatia (IE)

Validação brasileira: Falcone EMO, Ferreira MC, Luz RCM, Fernandes CS, Faria CA, D'Augustin JF, Sardinha A, Pinho VD (2008)

Nome: _____ Data: _____

Instrução: Abaixo você encontrará uma série de afirmações que descrevem reações em diversas situações sociais. Por favor, leia cada uma delas e responda com que frequência essas afirmações se aplicariam a você, marcando o número de acordo com a escala abaixo. Caso nunca tenha passado por alguma dessas situações, tente imaginar como você reagiria ao enfrenta-la. **Responda a todas as perguntas.**

1	2	3	4	5
Nunca	Raramente	Regularmente	Quase sempre	Sempre

01	Quando faço um pedido, procuro me certificar de que este não irá trazer incômodo à outra pessoa	1	2	3	4	5
02	Eu adiria a decisão de terminar um relacionamento se percebesse que o meu par está com problemas	1	2	3	4	5
03	Se estiver com pressa e alguém insistir em continuar conversando comigo, encerro imediatamente o assunto dizendo apenas que tenho que ir	1	2	3	4	5
04	Quando alguém faz algo que me desagrada, demonstro livremente a minha raiva	1	2	3	4	5
05	Quando alguém está me confundindo um problema, exponho minha opinião objetivamente, apontando os seus erros e acertos	1	2	3	4	5
06	Costumo me colocar no lugar da outra pessoa quando estou sendo criticado, para tentar perceber os sentimentos e razões dela	1	2	3	4	5
07	Ao ter que fazer um pedido a uma pessoa que está ocupada, declaro o meu reconhecimento do quanto ela está atarefada, antes de fazer o pedido	1	2	3	4	5
08	Quando recebo uma crítica, costumo me defender imediatamente	1	2	3	4	5
09	Quando percebo que minha opinião contrasta com a do meu interlocutor, procuro me expor de forma mais incisiva	1	2	3	4	5
10	Antes de pedir a uma pessoa para mudar um comportamento que me incomoda, procuro me colocar no lugar dela para entender o que a leva a ter tal atitude	1	2	3	4	5
11	Tenho facilidade de entender o ponto de vista de outra pessoa, mesmo quando ela me critica	1	2	3	4	5
12	Antes de apontar um comportamento que me incomoda em alguém, procuro demonstrar que considero seus sentimentos e que compreendo suas razões	1	2	3	4	5
13	Ao fazer um pedido incompatível com os interesses de outra pessoa, procuro ser persuasivo até conseguir o que desejo	1	2	3	4	5
14	Ao acabar de ouvir um amigo que está com problemas, evito comentar sobre minhas conquistas	1	2	3	4	5
15	Eu abriria mão de fazer um pedido importante se este causa-se incômodo considerável à outra pessoa	1	2	3	4	5
16	Quando pretendo terminar uma relação, procuro pôr em prática a minha decisão em vez de ficar pensando muito a respeito	1	2	3	4	5
17	Quando recebo uma crítica, esforço-me para identificar as razões que levaram a outra pessoa a me criticar	1	2	3	4	5
18	Quando discordo do meu interlocutor, procuro ouvi-lo e, em seguida, demonstro compreender o seu ponto de vista antes de expressar o meu	1	2	3	4	5
19	Quando alguém expõe uma opinião contrária à minha, sinto-me incomodado e procuro logo demonstrar o meu ponto de vista	1	2	3	4	5
20	Se alguém me deve algo, cobro-lhe a dívida imediatamente, mesmo que ela possa ter motivos que justifiquem o não pagamento	1	2	3	4	5
21	Antes de expressar a minha opinião sobre algo com que não concordo, eu procuro compreender o lado de todas as pessoas envolvidas	1	2	3	4	5
22	É melhor terminar logo uma relação com uma pessoa do que ficar adiando, mesmo que naquele dia ele(a) não esteja bem	1	2	3	4	5
23	Se eu fizer um pedido e receber uma negativa, procuro entender as razões do outro, mesmo me sentindo frustrado	1	2	3	4	5

24	Quando alguém age comigo de maneira hostil, respondo da mesma forma	1	2	3	4	5
25	Quando recebo uma crítica, procuro expressar para a outra pessoa a minha compreensão do que ela disse, para me certificar de que a entendi	1	2	3	4	5
26	Quando alguém me faz um pedido que não posso ou não quero atender, digo "não" sem rodeios	1	2	3	4	5
27	Evito revelar os meus problemas pessoais quando percebo que a outra pessoa não está bem	1	2	3	4	5
28	Consigo compreender inteiramente os sentimentos e razões de outra pessoa que se comportou comigo de forma hostil ou prejudicial	1	2	3	4	5
29	Antes de desabafar meus problemas com um amigo procuro me certificar de que ele está receptivo a me ouvir	1	2	3	4	5
30	Não consigo ficar calado quando ouço alguém falar um absurdo	1	2	3	4	5
31	Antes de expressar minhas opiniões em uma conversa, procuro compreender as opiniões da outra pessoa, especialmente quando estas são diferentes das minhas	1	2	3	4	5
32	Eu sou do tipo que não leva desaforo pra casa	1	2	3	4	5
33	Costumo me colocar no lugar de uma pessoa que está me revelando um problema para ver como me sentiria e o que pensaria se a situação fosse comigo	1	2	3	4	5
34	Durante uma conversa procuro demonstrar interesse pela outra pessoa, adotando uma postura atenta	1	2	3	4	5
35	Quando percebo que alguém se comporta de um modo que me incomoda, expresso imediatamente a minha insatisfação para deixar as coisas bem claras	1	2	3	4	5
36	Antes de encerrar um relacionamento, eu me coloco no lugar da outra pessoa para avaliar como irá se sentir	1	2	3	4	5
37	Ao fazer um pedido conflitante com os interesses de outra pessoa, procuro expressar meu reconhecimento sincero do incômodo que estou lhe causando	1	2	3	4	5
38	Quando alguém não paga o que me deve, fico muito irritado e não hesito em cobrar a dívida	1	2	3	4	5
39	Deixo de revelar uma experiência de sucesso se percebo que a outra pessoa está triste ou com problemas	1	2	3	4	5
40	Se decidir recusar um pedido, vou direto ao ponto	1	2	3	4	5

Anexo B – Inventário de Habilidades Sociais (IHS)

INVENTÁRIO DE HABILIDADES SOCIAIS

Almir Del Prette e Zilda Aparecida Pereira Del Prette

Leia atentamente cada um dos itens que se seguem. Cada um deles apresenta uma ação ou sentimento (parte grifada) diante de uma situação dada (parte não grifada). Indique, na FOLHA DE RESPOSTAS, a frequência com que você age ou se sente tal como descrito no item. Se uma dessas situações nunca lhe ocorreu, responda como se tivesse ocorrido, considerando o seu possível comportamento. RESPONDA TODAS AS QUESTÕES.

1. Em um grupo de pessoas desconhecidas, *fico à vontade, conversando naturalmente.*
2. Quando um de meus familiares (pais, irmãos mais velhos ou cônjuge) insiste em dizer o que eu devo fazer, contrariando o que penso, *acabo aceitando para evitar problemas.*
3. Ao ser elogiado(a) sinceramente por alguém, *respondo-lhe agradecendo*
4. Em uma conversação, se uma pessoa me interrompe, *solicito que aguarde até eu encerrar o que estava dizendo.*
5. Quando um(a) amigo(a) a quem emprestei dinheiro, esquece de me devolver, *encontro um jeito de lembrá-lo(a).*
6. Quando alguém faz algo que eu acho bom, mesmo que não seja diretamente a mim, *faço menção a isso, elogiando-o(a) na primeira oportunidade.*
7. Ao sentir desejo de conhecer alguém a quem não fui apresentado(a), *eu mesmo(a) me apresento a essa pessoa.*
8. Mesmo junto a conhecidos da escola ou trabalho, *encontro dificuldade em participar da conversação* (“enturmar”).
9. *Evito fazer exposições ou palestras* a pessoas desconhecidas.
10. Em minha casa *expresso sentimentos de carinho através de palavras e gestos* a meus familiares.
11. Em uma sala de aula ou reunião, se o professor ou dirigente faz uma afirmação incorreta, eu *exponho meu ponto de vista.*

12. Se estou interessado(a) em uma pessoa para relacionamento sexual, *consigo abordá-la para iniciar conversa*ção.
13. Em meu trabalho ou em minha escola, se alguém me faz um elogio, *fico encabulado(a) sem saber o que dizer*.
14. *Faço exposição (por exemplo palestras)* em sala de aula ou no trabalho, quando sou indicado(a).
15. Quando um familiar me critica injustamente, *expresso meu aborrecimento diretamente a ele*.
16. Em um grupo de pessoas conhecidas, se não concordo com a maioria, *expresso verbalmente minha discordância*.
17. Em uma conversa com amigos, *tenho dificuldade em encerrar a minha participação, preferindo aguardar que outros o façam*.
18. Quando um de meus familiares, por algum motivo, me critica, *reajo de forma agressiva*.
19. Mesmo encontrando-me próximo(a) de uma pessoa importante, a quem gostaria de conhecer, *tenho dificuldade em abordá-la para iniciar conversa*ção.
20. Quando estou gostando de alguém com quem venho saindo, *tomo a iniciativa de expressar-lhe meus sentimentos*.
21. Ao receber uma mercadoria com defeito, *dirijo-me até a loja onde a comprei, exigindo a sua substituição*.
22. Ao ser solicitado(a) por um(a) colega para colocar seu nome em um trabalho feito sem a sua participação, *acabo aceitando mesmo achando que não devia*.
23. *Evito fazer perguntas a pessoas desconhecidas*.
24. *Tenho dificuldade em interromper uma conversa ao telefone mesmo com pessoas conhecidas*.
25. Ao deixar de gostar de uma pessoa com quem vinha saindo, *tenho dificuldade em romper o relacionamento*.
26. Em campanhas de solidariedade, *evito tarefas que envolvam pedir donativos ou favores a pessoas desconhecidas*.
27. Se um(a) amigo(a) abusa de minha boa vontade, *expresso-lhe diretamente meu desagrado*.
28. Quando um de meus familiares (filhos, pais, irmãos, cônjuge) consegue alguma coisa importante pela qual se empenhou muito, *eu o elogio pelo*

seu sucesso.

29. Na escola ou no trabalho, quando não compreendo uma explicação sobre algo que estou interessado(a), *faço as perguntas que julgo necessárias ao meu esclarecimento.*
30. Em uma situação de grupo, quando alguém é injustiçado, *reajo em sua defesa.*
31. Ao entrar em um ambiente onde estão várias pessoas desconhecidas, *cumprimento-as.*
32. Ao sentir que preciso de ajuda, *tenho facilidade em pedi-la* a alguém de meu círculo de amizades.
33. Quando meu(minha) parceiro(a) insiste em fazer sexo sem o uso da camisinha, *concordo para evitar que ele(a) fique irritado(a) ou magoado(a).*
34. No trabalho ou na escola, *concordo em fazer as tarefas que me pedem e que não são da minha obrigação*, mesmo sentindo um certo abuso nesses pedidos.
35. Se estou sentindo-me bem (feliz), *expresso isso para as pessoas de meu círculo de amizades.*
36. Quando estou com uma pessoa que acabei de conhecer, *sinto dificuldade em manter um papo interessante.*
37. Se preciso pedir um favor a um(a) colega, *acabo desistindo de fazê-lo.*
38. *Consigo “levar na esportiva” as gozações de colegas de escola ou de trabalho a meu respeito.*
39. Ao receber uma avaliação muito abaixo do que merecia, *fico chateado(a) mas evito discuti-la com o professor.*
40. Em uma situação de conflito de opiniões, *consigo convencer os demais para a minha posição.*
41. Em uma fila (banco, cinema, etc), se um estranho passa à minha frente, *fico calado(a) sem manifestar meu desagrado.*
42. *Prefiro ocultar minha opinião* a ferir sentimentos alheios, mesmo quando solicitado(a) a dizer o que penso.

Anexo C – Questionário Reduzido de Autorregulação (QRAR)

Adaptação brasileira: Almeida AA, Behlau M (2017)

Nome: _____ Data: _____

Instrução: Por favor, responda às seguintes perguntas circundando a resposta que melhor descreve como você é. Se você DISCORDA TOTALMENTE, circule o 1. Se você DISCORDAR, circule o 2. Se você estiver INCERTO(A), circule o 3. Se você CONCORDAR, circule o 4, e se você CONCORDAR TOTALMENTE, circule o 5. Não há respostas certas ou erradas. Tente trabalhar rapidamente e não pensar muito sobre suas respostas

Legenda:

1	2	3	4	5
Discordo Totalmente	Discordo	Incerto	Concordo	Concordo Totalmente

01	Geralmente eu controlo meu progresso até atingir meus objetivos	1	2	3	4	5
02	Tenho dificuldade em tomar decisões	1	2	3	4	5
03	Distraio-me dos meus planos facilmente	1	2	3	4	5
04	Só percebo as consequências dos meus atos quando já é tarde demais	1	2	3	4	5
05	Sou capaz de atingir objetivos que defino para mim	1	2	3	4	5
06	Eu adio a tomada de decisões	1	2	3	4	5
07	É difícil perceber quando estou no limite (álcool, comida, doces)	1	2	3	4	5
08	Se eu quiser mudar, certamente eu consigo	1	2	3	4	5
09	Quando decido mudar alguma coisa, me sinto pressionado(a) com tantas escolhas	1	2	3	4	5
10	Apesar de uma decisão tomada, tenho dificuldade em seguir as etapas para realizá-la	1	2	3	4	5
11	Acho que não aprendo com os meus erros	1	2	3	4	5
12	Consigo continuar com um plano que está funcionando	1	2	3	4	5
13	Geralmente, preciso errar só uma vez para aprender	1	2	3	4	5
14	Tenho valores pessoais e procuro respeitá-los	1	2	3	4	5
15	Quando tenho um problema ou desafio, começo a procurar as possíveis soluções	1	2	3	4	5
16	Tenho dificuldade para definir meus próprios objetivos	1	2	3	4	5
17	Tenho muita força de vontade	1	2	3	4	5
18	Quando quero mudar algo, presto bastante atenção em como eu estou fazendo	1	2	3	4	5
19	Tenho dificuldade em fazer planos para alcançar meus objetivos	1	2	3	4	5
20	Sou capaz de resistir às tentações	1	2	3	4	5
21	Estabeleço objetivos e controlo meu progresso	1	2	3	4	5
22	Na maioria das vezes não presto atenção no que estou fazendo	1	2	3	4	5
23	Tendo a repetir a mesma coisa, mesmo que não esteja dando certo	1	2	3	4	5
24	Geralmente acho diversas soluções quando quero mudar algo	1	2	3	4	5
25	Quando tenho um objetivo, geralmente planejo como alcançá-lo	1	2	3	4	5
26	Quando eu decido mudar algo, presto bastante atenção em como estou agindo	1	2	3	4	5
27	Frequentemente não percebo o que estou fazendo até que alguém chame minha atenção	1	2	3	4	5
28	Geralmente penso antes de agir	1	2	3	4	5
29	Aprendo com os meus erros	1	2	3	4	5
30	Sei como quero ser	1	2	3	4	5
31	Desisto facilmente	1	2	3	4	5

Anexo D – Protocolo global de avaliação do comportamento não verbal (NBAM)

López R, Gordillo F, Soto. 2016.

Tabela de abreviações:

D – Dados: aquilo que é percebido, sem interpretações, puramente descrição.

EF – Expressões faciais (FACS)

G – Gestos

P – Postura

PA – Paralinguagem

PR – Proxêmica (Distância interpessoal)

H – Háptica (tacésica/toque)

A – Aparência

O – Oculésica (olhar)

I – Inferências: Agrupe os dados e interprete seu significado.

H – Hipóteses: Agrupe as inferências para interpretações mais aprofundadas

Nível 1. Dados

Dato	Frame/print/foto	Verbalização associada/ tempo	Comportamento
D-EF1			
D-EF2			
D-EF3			

D-EF4			
D-EF4			
D-G1			
D-G2			
D-G3			
D-G4			

Anexo E – Escala CARE de Empatia

Scarpellini GR,2014.

Por favor, avalie as afirmações abaixo a respeito da consulta de hoje.
Por favor, selecione apenas uma resposta por item e responda a todos os itens.

<i>Como foi o médico ou a médica em</i>	Ruim	Regular	Bom	Muito Bom	Excelente	Não se aplica
1. Deixar você à vontade (sendo gentil e amigável, tratando você com respeito; sem ser frio(a) ou ríspido(a))	☐	☐	☐	☐	☐	☐
2. Deixar você contar sua “história” (dando tempo para você descrever sua doença completamente, com suas próprias palavras; sem lhe interromper ou distrair)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
3. Realmente ouvir (prestando atenção no que você dizia; sem ficar olhando nas anotações ou no computador enquanto você falava)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
4. Estar interessado em sua pessoa como um todo (perguntando ou sabendo detalhes importantes da sua vida, sua situação; sem lhe tratar “apenas como um número”)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
5. Entender plenamente suas preocupações (demonstrando que ele ou ela tinha entendido corretamente suas preocupações; não esquecendo ou desconsiderando nada)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
6. Mostrar cuidado e compaixão (demonstrando estar genuinamente preocupado, relacionando-se com você em um nível humano; não sendo indiferente ou insensível)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
7. Ser positivo (tendo uma abordagem e uma atitude positivas; sendo honesto(a), sem ser negativo(a) sobre os seus problemas)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
8. Explicar as coisas claramente (respondendo completamente suas questões, explicando claramente, dando informações adequadas para você; não sendo vago)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
9. Ajudar você a manter o controle (conversando sobre o que você pode fazer para melhorar sua saúde; encorajando ao invés de ficar “dando sermão”)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
10. Planejar junto com você o que será feito (conversando sobre as possibilidades, envolvendo você nas decisões na medida em que você quer estar envolvido(a); não ignorando os seus pontos de vista)	☐	☐	☐	☐	☐	☐

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA SOBRE O PERFIL
INFLAMATÓRIO E A FUNCIONALIDADE DE PACIENTES COM
COVID-19: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Prof. Dr. Rodrigo Della Múa Plentz

Porto Alegre, RS
2020

RESUMO

A COVID-19 se expandiu mundialmente, gerando um cenário de emergência em saúde pública. Casos graves da doença apresentam redução na contagem de linfócitos e maior concentração sérica de interleucinas, sendo sugerido que a tempestade de citocinas possa estar associada à gravidade da doença. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da estimulação elétrica sobre o perfil inflamatório, expressão de proteína α -klotho, funcionalidade, força muscular periférica e arquitetura muscular de pacientes com COVID-19 em VMI. Para isso os pacientes serão randomizados em dois grupos: grupo controle e grupo intervenção. O grupo intervenção iniciará o protocolo de estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) sobre os rins no segundo dia de ventilação mecânica invasiva (VMI) e, após a suspensão do bloqueador neuromuscular pela equipe médica, será iniciado o protocolo de estimulação elétrica neuromuscular (EENM) no músculo quadríceps concomitante à TENS renal. Como desfechos do estudo serão avaliados o perfil inflamatório pela dosagem de interleucinas (IL-2, IL-6 e IL10), fator de necrose tumoral e proteína C reativa, a funcionalidade através do *Perme Intensive Care Unit Mobility Score* e da *ICU Mobility Scale*, a expressão da proteína α -Klotho pelo método sanduíche de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); a força muscular de membros inferiores pelo *Medical Research Council* (MRC); a força de preensão manual por dinamometria e a arquitetura muscular do quadríceps por ultrassonografia. Para análise dos dados será utilizado o teste de ANOVA para medidas repetidas com *post hoc* de Bonferroni. Para possíveis associações serão utilizadas as correlações de *Pearson* ou *Spearman*, de acordo com a distribuição dos dados. O nível de significância adotado será de 5%.

Palavras-chave: COVID-19; Estimulação Elétrica, Ensaio clínico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	HIPÓTESES.....	6
2.1	HIPÓTESE NULA	6
2.2	HIPÓTESE ALTERNATIVA.....	6
3	OBJETIVOS	7
3.1	OBJETIVO GERAL	7
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4	METODOLOGIA.....	8
4.1	DELINEAMENTO.....	8
4.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA	8
4.3	RANDOMIZAÇÃO	8
4.4	LOCAL DA PESQUISA	8
4.5	DESFECHOS	9
4.5.1	Desfechos Primários.....	9
4.5.2	Desfechos Secundários	9
4.6	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	9
4.6.1	Critérios de Inclusão	9
4.6.2	Critérios de Exclusão	9
4.7	AVALIAÇÕES	10
4.7.1	Avaliação do perfil inflamatório	10
4.7.2	Avaliação da funcionalidade	10
4.7.3	Avaliação da expressão da proteína α -Klotho	11
4.7.4	Avaliação da força muscular de membros inferiores.....	11
4.7.5	Avaliação da força de preensão palmar	11
4.7.6	Avaliação da arquitetura muscular	12
4.8	PROTOCOLOS DE INTERVENÇÃO	12
4.8.1	Estimulação elétrica nervosa transcutânea	12
4.8.2	Estimulação elétrica neuromuscular.....	13
4.9	RISCOS E BENEFÍCIOS.....	15
4.10	ASPECTOS ÉTICOS.....	15
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
5	ORÇAMENTO.....	17
6	CRONOGRAMA.....	18
	REFERÊNCIAS	19
	APÊNDICES	21
	ANEXOS.....	24

1 INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19 se expandiu mundialmente e já apresenta mais de 1.500.000 de casos no Brasil, com o número de óbitos acima de 100.000 (WHO, 2020). Os primeiros casos de infecção por SARS-CoV-2 foram descritos em uma cidade da China e acredita-se que a origem zoonótica do novo coronavírus sejam os morcegos (LU et al., 2020). Trata-se de um vírus de fácil e rápida transmissão, ocorrendo principalmente através de gotículas respiratórias (BULUT; KATO, 2020). A gravidade da infecção vem sendo classificada a partir dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes, podendo ser assintomática, leve (sintomas gripais, sem pneumonia), moderada (presença de pneumonia, porém sem hipoxemia), grave (manifestações de hipoxemia) ou crítica, no qual o paciente apresenta síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) ou insuficiência respiratória, além de disfunção de múltiplos órgãos (BULUT; KATO, 2020).

É proposto que a patogênese da COVID-19 seja a ligação do vírus SARS-CoV-2 ao receptor da enzima conversora de angiotensina II das células do trato respiratório (RIVELLESE; PREDILETTO, 2020). Além da destruição da célula invadida pelo vírus, a ocupação do sítio de ligação faz com que a angiotensina II produzida não seja inativada e ocorra uma sinalização exacerbada desta, via receptor AT2R1. Assim é iniciada a ativação de células do sistema imunológico e a produção de citocinas inflamatórias, que levam à lesão pulmonar (MARSHALL et al., 2004). Em uma análise retrospectiva, Chen et al. (2020) observaram que as concentrações séricas de interleucinas (IL-2R, IL-6 e IL-10) e do fator de necrose tumoral C (TNF- α) eram maiores nos casos graves quando comparados aos casos moderados e sugeriram que a tempestade de citocinas pode estar associada à gravidade da doença.

Em estudo prévio, Feng et al. (2020) revisaram sistematicamente os parâmetros imunoinflamatórios de pacientes com COVID-19 e observaram que nos casos graves, há redução do número total de linfócitos, aumento na contagem de glóbulos brancos e neutrófilos, na razão neutrófilos-linfócitos, na procalcitonina, na proteína C reativa, (PCR), na taxa de sedimentação de eritrócitos e nos níveis de IL-6. Outra metanálise demonstrou que os pacientes que progrediram ao óbito por COVID-19 apresentaram aumento na contagem de leucócitos, bilirrubina total, creatina quinase, ferritina sérica e IL-6, além de redução na contagem de linfócitos e plaquetas, comparados aos pacientes que sobreviveram (HENRY et al., 2020).

Além da linfopenia, é observada exaustão e redução da diversidade funcional de linfócitos T no sangue em pacientes com COVID-19 grave, diminuindo a imunidade antiviral do hospedeiro. Além disso, esses pacientes apresentam maior quantidade de receptor solúvel

de IL-2. É proposto que intervenções terapêuticas direcionadas à citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias podem ser benéficas para melhorar a resposta inflamatória (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017), nesse sentido, a estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) pode ser considerada, devido ao fato de reduzir os níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias e apresentar um fator protetor em relação à inflamação (ALMEIDA et al., 2018).

Além da modalidade de eletroestimulação acima citada, a estimulação elétrica neuromuscular (EENM) é utilizada, entre outros objetivos, para preservar e/ou recuperar a massa e função muscular de pacientes que permanecem internados por um período prolongado (MAFFIULETTI, 2010). Essa terapia já demonstrou atenuar os efeitos deletérios da imobilização, proteger o sistema muscular contra a atrofia, aumentar a força muscular e a capacidade funcional (FERREIRA; VANDERLEI; VALENTI, 2014; SCHARDONG; STEIN; PLENTZ, 2020). Além disso, a EENM reduz o dano ao DNA de pacientes com insuficiência renal crônica (SCHARDONG et al., 2018), sugerindo um efeito sistêmico ao agir de forma benéfica na estimulação de biomarcadores.

2 HIPÓTESES

2.1 HIPÓTESE NULA

A estimulação elétrica não melhora o perfil inflamatório e a funcionalidade de pacientes com COVID-19 em VMI.

2.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

A estimulação elétrica melhora o perfil inflamatório e a funcionalidade de pacientes com COVID-19 em VMI.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da estimulação elétrica sobre o perfil inflamatório e a funcionalidade de pacientes com COVID-19 em VMI.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da estimulação elétrica sobre a expressão da proteína α -Klotho em pacientes com COVID-19;
- Avaliar os efeitos da estimulação elétrica sobre a força muscular de pacientes com COVID-19;
- Avaliar os efeitos da estimulação elétrica sobre a arquitetura muscular de quadríceps de pacientes com COVID-19.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO

Este estudo caracteriza-se por um ensaio clínico randomizado.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população do estudo será constituída de pacientes com COVID-19. A amostra consistirá de pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 em VMI de ambos os sexos, com idade entre 18 a 85 anos, internados nas UTIs COVID-19 do Complexo Hospitalar Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), no período de novembro de 2020 a novembro de 2021.

O cálculo amostral foi realizado através do software BioEstat 5.0 e baseou-se em um ensaio clínico randomizado (FRANÇA et al., 2020) que avaliou os efeitos da estimulação elétrica sobre os níveis de IL-10 de pacientes críticos (grupo intervenção: $1,91 \pm 0,038$; grupo controle: $1,87 \pm 0,066$). Foi estimada uma amostra de 22 pacientes por grupo, considerando erro alfa de 5% e poder de 80%.

4.3 RANDOMIZAÇÃO

A randomização será realizada através do *software* online randomization.com. A geração da sequência dos números será feita por pesquisador “cego” ao estudo, após a seleção dos pacientes pelos critérios de elegibilidade. A sequência dos números será revelada apenas no início do programa de intervenção aos fisioterapeutas que realizarão o protocolo com estimulação elétrica para garantir a ocultação da alocação. Os pacientes serão alocados para um dos dois grupos: grupo controle (fisioterapia convencional); grupo intervenção (TENS+EENM e fisioterapia convencional).

4.4 LOCAL DA PESQUISA

A seleção dos pacientes assim como as avaliações físicas e as intervenções ocorrerão nas UTIs COVID-19 do Complexo Hospitalar ISCMPA.

As avaliações relacionadas aos ensaios bioquímicos ocorrerão no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

4.5 DESFECHOS

4.5.1 Desfechos Primários

Perfil inflamatório avaliado através da medida de interleucinas (IL-2, IL-6 e IL10), fator de necrose tumoral e proteína C reativa.

Funcionalidade avaliada pela *Perme Intensive Care Unit Mobility Score e ICU Mobility Scale*;

4.5.2 Desfechos Secundários

Expressão da proteína α -Klotho – Método sanduíche de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA);

Força muscular de membros inferiores avaliada *pelo Medical Research Council (MRC)*;

Força de preensão palmar avaliada por dinamometria;

Arquitetura muscular de quadríceps avaliada por ultrassonografia.

4.6 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

4.6.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com diagnóstico de COVID-19;
- Em VMI;
- Entre 18 e 80 anos de idade;

4.6.2 Critérios de Exclusão

- Intolerância ao eletroestimulador e ou/alteração de sensibilidade cutânea;
- Lesões epidérmicas no local da aplicação;

- Paciente com suspeita ou diagnóstico de tromboembolismo pulmonar e tromboflebite – fase aguda;
- Paciente portador de marcapasso;
- Paciente com arritmia cardíaca;
- Paciente com instabilidade hemodinâmica (atentar para PAM menor que 60mmHg);
- Paciente em diálise contínua;
- Paciente com cateter em veia ou artéria femoral;
- Paciente obeso;
- Estado febril;
- Pacientes com epilepsia;
- Gestantes.

4.7 AVALIAÇÕES

Os familiares dos pacientes serão contatados e se concordarem com a participação do indivíduo no estudo assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) previamente a qualquer procedimento. As avaliações serão realizadas previamente ao início do protocolo e semanalmente até a alta hospitalar ou óbito.

4.7.1 Avaliação do perfil inflamatório

Para avaliação do perfil inflamatório serão analisados os seguintes marcadores bioquímicos: IL-2, IL-6 e IL-10, TNF α e PCR. As citocinas serão dosadas por ensaio imunenzimático (ELISA) e PCR por quimioluminescência.

4.7.2 Avaliação da funcionalidade

A funcionalidade será avaliada pela *Perme Intensive Care Unit Mobility Score e ICU Mobility Scale*. Esse escore contém 15 itens, agrupados em sete categorias: estado mental, potenciais barreiras a mobilidade, força funcional, mobilidade no leito, transferências, dispositivos de auxílio para deambulação e medidas de resistência. A pontuação varia de zero a 32 pontos e uma pontuação mais alta indica maior mobilidade e menor necessidade de assistência (KAWAGUCHI et al., 2016).

4.7.3 Avaliação da expressão da proteína α -Klotho

A análise do conteúdo plasmático de α -Klotho solúvel será realizada através do método sanduíche de ELISA utilizando-se kit bioquímico específico (ALPHA KLOTHO HUMAN SOLUBLE ELISA ASSAY KIT, IBL America, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, com sensibilidade de 6.15 pg/mL e faixa de detecção de 6.15 – 6000 pg/mL. De modo resumido, as amostras de plasma dos pacientes serão incubadas em placa de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpo α -Klotho humano purificado durante o tempo de 60 minutos. Após a realização de lavagens conforme recomendação do fabricante, anticorpos secundários anti-human α -Klotho serão inseridos em cada poço e nova incubação (por 30 minutos) será realizada. Após nova lavagem da microplaca, será adicionado enzima peroxidase conjugado a substrato colorimétrico para quantificação da absorbância da proteína de interesse em microplaca EZ Reader (Biochrom, EUA). A concentração de α -Klotho solúvel (pg/mL) no plasma dos pacientes será identificada através da interpolação de uma curva de regressão linear utilizando-se uma curva padrão com concentrações previamente conhecidas do analito e a sua devida absorbância revelada (YAMAZAKI et al., 2010).

4.7.4 Avaliação da força muscular de membros inferiores

A força muscular será mensurada através do MRC, que varia de zero a cinco, onde zero indica ausência contração muscular e cinco contração muscular que vence a gravidade e resistência (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1976).

4.7.5 Avaliação da força de preensão palmar

A força de preensão palmar será mensurada por meio de dinamometria. Para esta avaliação será utilizado o dinamômetro digital da marca WCT Fitness, modelo 600170, com capacidade para 90 kgF. Os pacientes estarão em sedestação na poltrona da unidade, com o antebraço apoiado e serão orientados a realizar três contrações isométricas máximas com os músculos flexores da mão e dedos. Será padronizado repouso de dois minutos entre as medidas (MACAGNAN et al., 2019) e dado estímulo verbal ao paciente durante a avaliação. Considerar-se-á como a força máxima o maior valor entre as três tentativas realizadas.

4.7.6 Avaliação da arquitetura muscular

A avaliação da arquitetura muscular ocorrerá através da aquisição de imagens por ultrassonografia dos músculos vasto lateral, vasto medial e reto femoral por ultrassonografia de alta resolução (Vivid-i, GE, EUA). Serão avaliados especificamente a espessura do músculo quadríceps (vasto lateral, vasto medial e reto femoral) e a área da secção transversa do reto femoral. Para avaliação da espessura do vasto lateral e reto femoral será utilizado o ponto intermediário entre o trocânter maior e o côndilo lateral do fêmur como ponto de referência, enquanto as medições do vasto medial serão realizadas a 25-30% desta distância, de acordo com as características dos pacientes. Três imagens serão obtidas com o transdutor posicionado longitudinalmente sobre as fibras musculares de cada um dos músculos extensores do joelho para a avaliação da espessura muscular (BARONI et al., 2013). Para a avaliação da área da secção transversa do reto femoral serão realizadas três imagens, porém, a sonda ultrassônica será posicionada transversalmente sobre o reto femoral, sendo adotado como referência o ponto intermédio entre trocânter maior e côndilo lateral do fêmur (FRITSCH et al., 2016). Todas as imagens serão analisadas posteriormente através do software ImageJ.

4.8 PROTOCOLOS DE INTERVENÇÃO

O grupo intervenção irá receber a fisioterapia de rotina do hospital baseada em exercícios respiratórios e motores usais da prática fisioterapêutica mais a estimulação elétrica (TENS e EENM). O grupo controle receberá apenas a fisioterapia de rotina.

4.8.1 Estimulação elétrica nervosa transcutânea

A TENS será aplicada com o paciente em decúbito dorsal, a partir do 2º dia de VMI, se o paciente estiver estável hemodinamicamente ($PAM > 60\text{mmHg}$, $FiO_2 \leq 60\%$ e $FR < 30\text{rpm}$) e seguirá até o final do período de VMI. Para isto, será utilizado um estimulador elétrico devidamente calibrado (FDA 510K aprovado por Mettler, modelo 240) utilizando corrente pulsada bifásica simétrica. A aplicação da corrente elétrica ocorrerá através de quatro eletrodos autoadesivos, hipoalergênicos, de tamanho 5x9 cm (ValuTrove, modelo CF7515, São Paulo/SP, Brasil), na região anatômica dos rins (abdômen e região dorsal ao nível da 10ª vértebra torácica), conforme figura 1. A frequência selecionada será de 20 Hz, largura de pulso 1000 μs , com intensidade visando o limiar sensorial, aumentando progressivamente, desde que não atinja o

limiar motor (sem contração muscular). O tempo de aplicação será de 30 minutos, uma vez ao dia.

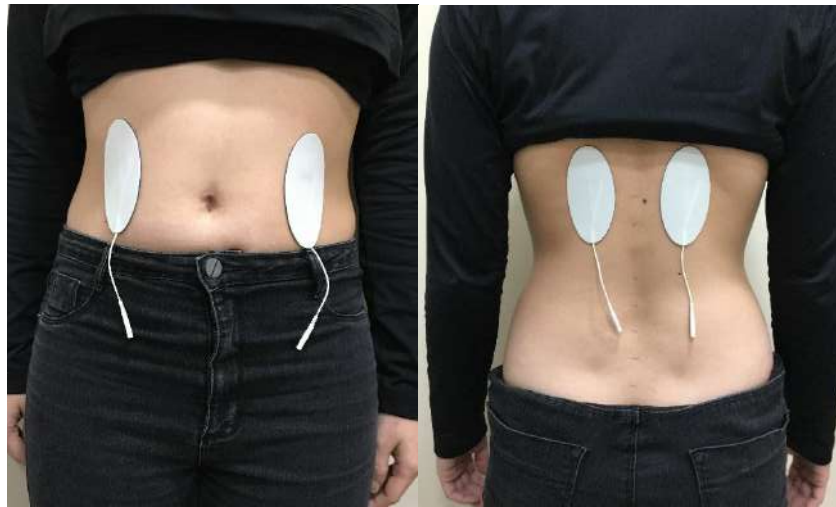


Figura 1

4.8.2 Estimulação elétrica neuromuscular

A EENM será aplicada após a suspensão do bloqueador neuromuscular pela equipe médica. Os pacientes permanecerão em decúbito dorsal, com as pernas apoiadas sobre uma cunha de espuma e os joelhos flexionados a 60° (figura 2) (HOY; ZAJAC; GORDON, 1990). Será utilizado para este protocolo um aparelho devidamente calibrado (Neurodyn II, modelo N53, IBRAMED) utilizando corrente pulsada bifásica simétrica. Uma faixa de nylon envolta com velcro será utilizada para fixar os tornozelos do paciente a fim de tornar o exercício isométrico. A aplicação da corrente elétrica ocorrerá através de quatro eletrodos autoadesivos, hipoalergênicos, de tamanho 7,5x13 cm (ValuTrove, modelo CF7515, São Paulo/SP, Brasil), sendo os eletrodos proximais posicionados sobre os pontos motores do músculo quadríceps (tronco do nervo femoral) e os eletrodos distais colocados perpendiculares ao eixo longitudinal da coxa e acima da borda superior da patela em ambas as pernas (VAZ; ARAGÃO; BOSCHI; FORTUNA et al., 2012).



Figura 2

O ponto motor do músculo quadríceps será determinado previamente a 1ª sessão de EEF utilizando um eletrodo de carbono de 2 cm², corrente pulsada bifásica simétrica e os mesmos parâmetros adotados para a intervenção, com intensidade suficiente para provocar contração tetânica. O ponto motor será determinado como o ponto onde a contração mais forte do quadríceps como um todo será obtida. Isto se confirmará pela inspeção visual da contração do ventre muscular e pelo relato do paciente de que este ponto correspondeu ao local onde a estimulação foi sentida com maior intensidade (VAZ et al., 2012).

A EEMM será aplicada a uma frequência de 80 Hz, largura de pulso 500 µs, tempo de contração de 10 segundos, tempo de repouso decrescente com o decorrer do protocolo (50-20 segundos) e tempo de sessão crescente (15 a 30 minutos). A intensidade adotada poderá variar em cada sessão de acordo a tolerância do paciente (VAZ et al., 2013). O protocolo detalhado está apresentado no quadro 1.

Quadro 1. Programa de treinamento de força muscular com EEF

Semana	Tempo total (minutos)	Contração-Repouso (segundos)	Número de contrações
1	15	10-50	15
2	20	10-40	24
3	20	10-30	30
4	25	10-30	37
5	25	10-20	50
6	30	10-20	60

4.9 RISCOS E BENEFÍCIOS

As avaliações apresentam risco mínimo para os pacientes. A coleta de sangue pode gerar hematomas. A EENM pode gerar efeitos semelhantes aos do exercício físico após a sessão, como fadiga, dor muscular, ou algum desconforto relacionado à utilização da corrente elétrica durante a aplicação. O pesquisador informará qualquer uma destas alterações à equipe médica, enfermagem e fisioterapeuta da unidade.

Os benefícios residem no fato do paciente contar com a possibilidade de reduzir a inflamação, aumentar a expressão da proteína α -Klotho, melhorar a massa e a força muscular além da sua funcionalidade.

4.10 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e registrado no sistema de protocolos de registros de ensaios clínicos randomizados ClinicalTrials.gov. Após a aprovação, será iniciada a coleta de dados.

Previamente às avaliações será apresentado o TCLE (APÊNDICE A) aos familiares dos pacientes, serão expostos os objetivos e procedimentos do estudo, mencionados os riscos, os possíveis benefícios, garantias de confidencialidade e informado que os pesquisadores ficarão à disposição para quaisquer esclarecimentos durante o decorrer do estudo. Ainda, ficará claro que o a retirada do consentimento pode ser feita a qualquer momento, sem nenhum prejuízo. O familiar assinará duas vias do TCLE e uma via permanecerá com o pesquisador.

A identificação dos participantes será mantida em sigilo. Os dados ficarão sob responsabilidade do pesquisador responsável pelo projeto durante cinco anos, sendo incinerados após este período. Os resultados da pesquisa serão apresentados em eventos acadêmicos e publicados sob a forma de artigo científico

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados será utilizado o *software* SPSS versão 22.0. A normalidade dos dados será verificada através do teste de *Shapiro-Wilk*. Dados com distribuição simétrica serão apresentados em média e desvio-padrão e dados com distribuição assimétrica em mediana e

amplitude interquartil. As características basais dos pacientes serão comparadas pela ANOVA (distribuição normal) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (distribuição assimétrica). Será utilizado o teste de ANOVA para medidas repetidas com *post hoc* de Bonferroni para comparação do efeito de interação dos grupos com o tempo. Para possíveis associações serão utilizadas as correlações de *Pearson* ou *Spearman*, de acordo com distribuição dos dados. O nível de significância adotado será de 5%.

5 ORÇAMENTO

Material de Consumo	Quantidade	Unidade (R\$)	Total (R\$)
Folha de ofício A4 (pacote c/ 500)	3	35,00	105,00
Impressão	1500	00,15	225,00
Canetas	10	2,50	25,00
Tubo de coleta EDTA K25 mL Vacuette® (caixa c/ 100)	1	60,00	60,00
Eletrodos autoadesivos	40	50,00	2.000,00
Álcool 70% (litro)	2	8,00	16,00
Algodão (rolo 500g)	5	12,00	60,00
Kit para PCR	1	40,00	40,00
Kit para IL-6	1	1.256,50	1.256,50
Kit para TNF-α	1	1.256,50	1.256,50
Kit para IL-10	1	1.177,02	1.177,02
Alpha Klotho human soluble ELISA assay kit, IBL America	-	—	—
Subtotal			6.221,02
Material Permanente	Quantidade	Unidade (R\$)	Total (R\$)
Aparelho de estimulação elétrica sensorial	1	—	—
Aparelho de eletroestimulação neuromuscular	1	—	—
Vidrarias/plásticos/pipetas	-	—	—
Subtotal			0,00
Total			6.221,02

*Os itens que não estão orçados já fazem parte do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA ou são de propriedade do pesquisador responsável.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. C. DO C. et al. Effects of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Proinflammatory Cytokines: Systematic Review and Meta-Analysis. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–13, 2018.
- BARONI, B. M. et al. Time Course of Neuromuscular Adaptations to Knee Extensor Eccentric Training. **Int J Sports Med**, v. 34, p. 904–911, 2013.
- BULUT, C.; KATO, Y. Epidemiology of covid-19. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 563–570, 2020.
- CHANNAPPANAVAR, R.; PERLMAN, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 529–539, 2017.
- CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 2020.
- FENG, X. et al. Immune-Inflammatory Parameters in COVID-19 Cases: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 1–14, 2020.
- FERREIRA, L. L.; VANDERLEI, L. C. M.; VALENTI, V. E. Neuromuscular electrical stimulation in critically ill patients in the intensive care unit: a systematic review. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 3, p. 361–365, 2014.
- FRANÇA, E. E. T. et al. Acute effect of passive cycle-ergometry and functional electrical stimulation on nitrosative stress and inflammatory cytokines in mechanically ventilated critically ill patients: A randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 4, p. 1–8, 2020.
- FRITSCH, C. G. et al. Effects of low-level laser therapy applied before or after plyometric exercise on muscle damage markers: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 9, p. 1935–1942, 2016.
- HENRY, B. M. et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 2020.
- KAWAGUCHI, Y. M. F. et al. Perme Intensive Care Unit Mobility Score e ICU Mobility Scale: tradução e adaptação cultural para a língua portuguesa falada no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 6, p. 429–434, 2016.
- LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus:

implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, v. 395, p. 565–574, 2020.

MACAGNAN, F. E. et al. Acute effect of photobiomodulation therapy on handgrip strength of chronic kidney disease patients during hemodialysis. **Lasers in Medical Science**, v. 34, p. 835–840, 2019.

MAFFIULETTI, N. A. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation. **European Journal of Applied Physiology**, v. 110, p. 223–234, 2010.

MARSHALL, R. P. et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, p. 156–164, 2004.

MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Aids to the examination of the peripheral nervous system**. [s.l: s.n.].

RIVELLESE, F.; PREDILETTO, E. ACE2 at the centre of COVID-19 from paucisymptomatic infections to severe pneumonia. **Autoimmunity Reviews journal**, v. 19, n. 102536, 2020.

SCHARDONG, J. et al. Intradialytic neuromuscular electrical stimulation reduces DNA damage in chronic kidney failure patients: a randomized controlled trial. **Biomarkers**, v. 23, n. 5, p. 495–501, 2018.

SCHARDONG, J.; STEIN, C.; PLENTZ, R. D. M. Neuromuscular Electrical Stimulation in Chronic Kidney Failure: A Systematic Review and Meta-analysis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 101, p. 700–711, 2020.

VAZ, M. A. et al. Effects of Russian current and low-frequency pulsed current on discomfort level and current amplitude at 10% maximal knee extensor torque. **Physiotherapy Theory and Practice**, v. 28, n. 8, p. 617–623, 2012.

VAZ, M. A. et al. Neuromuscular electrical stimulation (NMES) reduces structural and functional losses of quadriceps muscle and improves health status in patients with knee osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 31, n. 4, p. 511–516, 2013.

WHO. **Coronavirus Disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update Data as received by WHO from national authorities, as of 10 am CEST 30 August 2020** World Health Organization, 2020.

YAMAZAKI, Y. et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 513–518, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA SOBRE O PERFIL INFLAMATÓRIO E A FUNCIONALIDADE DE PACIENTES COM COVID-19: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Versão nº 1

A COVID-19 se espalhou mundialmente, gerando um cenário de emergência em saúde pública. Pacientes graves, internados em unidades de terapia intensiva, apresentam redução da força e da massa muscular das pernas em função da imobilidade prolongada no leito. A estimulação com corrente elétrica pode diminuir estes efeitos negativos.

Convidamos o seu (a) familiar a participar da pesquisa chamada “Efeitos da estimulação elétrica sobre o perfil inflamatório e a força muscular de pacientes com COVID-19: ensaio clínico randomizado” sob responsabilidade dos pesquisadores Dr. Rodrigo Della Múa Plentz e Dra. Jociane Schardong.

O estudo pretende descobrir os efeitos do tratamento com corrente elétrica sobre os níveis de inflamação, sobre a funcionalidade, a força muscular, a expressão da proteína α -Klotho, e sobre a massa muscular das pernas do seu familiar. Para isso, ele (a) poderá receber a estimulação com corrente elétrica além da fisioterapia ou poderá receber apenas a fisioterapia, e isto será definido por sorteio. Se o seu (a) familiar for sorteado para receber o tratamento com estimulação com corrente elétrica, este será realizado durante o período em que ele estiver respirando com ajuda de aparelhos (ventilador mecânico), por meio de um aparelho que irá produzir formigamento nas costas e na barriga além de contrações nos músculos das coxas.

Ao participar desta pesquisa o seu (a) familiar poderá ter a inflamação do seu corpo reduzida, poderá ter aumento da expressão da proteína α -Klotho, além de melhorar a força e a massa muscular das suas pernas e sua funcionalidade. As avaliações que serão realizadas além do tratamento apresentam risco mínimo para os pacientes e são elas: o perfil inflamatório e a expressão da proteína α -Klotho através de uma coleta de sangue, a funcionalidade através de duas escalas (*Perme Intensive Care Unit Mobility Score* e *ICU Mobility Scale*), a força muscular de membros inferiores pelo escore *Medical Research Council* (MRC), a força de preensão manual por dinamometria e a arquitetura muscular do quadríceps por ultrassonografia.

Você, como responsável pelo seu (a) familiar poderá desistir desta pesquisa a qualquer momento, mesmo após ter começado, e isso não vai lhe trazer nenhum prejuízo no tratamento prestado pela equipe de saúde desta instituição. Todos os resultados desta pesquisa serão guardados sob nosso sigilo e aos cuidados do professor Dr. Rodrigo Della Múa Plentz durante cinco anos. Após esse período os resultados serão queimados. Essas medidas serão tomadas para preservar a identidade do seu (a) familiar, assim como nossa ética profissional exige. Ao término do estudo os resultados serão publicados em uma revista científica, preservando a identidade do paciente

Não haverá despesas pessoais (custos) para o senhor (a) nesta pesquisa. Também não haverá compensação financeira (pagamento) para sua participação no estudo. No entanto, qualquer consequência indesejada ocasionada pela pesquisa (quando comprovada) será de responsabilidade dos pesquisadores, que deverão providenciar assistência médica ao paciente na instituição para sanar o incômodo assim como indenizações quando elas forem legamente estabelecidas.

Caso tenha dúvidas ou queira receber mais informações sobre seus direitos, entrar em contato com o pesquisador responsável: professor Dr. Rodrigo Della Múa Plentz (51) 985955153 ou com a pesquisadora e fisioterapeuta Jociane Schardong (55) 981348114 ou ainda com o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - sob Coordenação do Dr. Claudio Stadnik, telefone (51) 3214.8571, Endereço: Av. Independência, 155, 6º andar - Hospital Dom Vicente Scherer - POA/RS ou Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pelo telefone (51) 3303.8804.

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações que estão neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos (o que será feito), que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações dadas e que decidiu voluntariamente pela participação do seu (a) familiar neste estudo. Uma via deste termo será entregue a você e outra será guardada pelo investigador principal.

Eu _____ recebi todas as informações sobre os objetivos da pesquisa de forma clara e concordo com a participação de meu familiar no estudo.

Data ____/____/____

Assinatura do familiar do paciente

Nome do pesquisador responsável

Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador responsável

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (**Resolução 466/12**).

Dúvidas: Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - sob Coordenação do Dr. Claudio Stadnik, telefone (51) 3214.8571, Endereço: Av. Independência, 155, 6º andar - Hospital Dom Vicente Scherer - POA/RS

ANEXOS

ANEXO A - MEDICAL RESEARCH COUNCIL

0	No contraction
1	Flicker or trace contraction
2	Active movement, with gravity eliminated
3	Active movement against gravity
4	Active movement against gravity and resistance
5	Normal power

Fonte: MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Aids to the examination of the peripheral nervous system**. 1976.

ANEXO B - PERME INTENSIVE CARE UNIT MOBILITY SCORE

Nome do avaliador: Página 1	Nome do paciente ou número:	Data: Horário:
ESTADO MENTAL Pontuação máxima = 3	Estado de alerta no começo da avaliação Não responsivo = 0 Letárgico = 1 Acordado e alerta = 2 O paciente consegue seguir 2 entre 3 comandos? Não = 0 Sim = 1	
POTENCIAIS BARREIRAS A MOBILIDADE Pontuação máxima = 4	O paciente está em Ventilação Mecânica OU Ventilação Não-Invasiva? * Sim = 0 Não = 1 Dor * Incapaz de determinar dor ou o paciente indica sentir dor = 0 Sem dor = 1 O paciente apresenta 2 ou mais dos seguintes: * (circule) Dispositivos de oxigenoterapia, Cateter de Foley, TOT, Traqueostomia, cateter central, cateter periférico, pressão arterial invasiva, cateter de diálise, CCIP, SGP, SJP, sonda nasogástrica, dreno de tórax, marcapasso temporário, cateter de artéria pulmonar, cateter epidural (PCA), BIA, DAVE, TSRC, ventriculostomia, dreno lombar, curativo a vácuo para feridas (VAC), ou outros. Sim = 0 Não = 1 O paciente está em infusão endovenosa? (infusão endovenosa continua: vasopressores, inotrópicos, insulina, antiarrítmicos, sedação, antibióticos, fluidos, reposição de eletrólitos, transfusão de sangue, etc) Sim = 0 Não = 1	
FORÇA FUNCIONAL Pontuação máxima = 4	Pernas - O paciente é capaz de erguer a perna contra a gravidade por aproximadamente 20 graus, com o joelho estendido? Não = 0 Sim = 1 Braços - O paciente é capaz de elevar o braço contra a gravidade por aproximadamente 45 graus, com o cotovelo estendido? Não = 0 Sim = 1	Esquerdo Direito Esquerdo Direito
Página 2		
MOBILIDADE NO LEITO Pontuação máxima = 6	Supino para sentado Não avaliado OU Assistência total (<25%) = 0 Máxima assistência (25 a 50%) = 1 Moderada assistência (50 a 75%) = 2 Mínima assistência (>75%) OU Supervisão = 3 Equilíbrio estático uma vez estabelecida a posição sentado à beira do leito Não avaliado OU Assistência total (<25%) = 0 Máxima assistência (25 a 50%) = 1 Moderada assistência (50 a 75%) = 2 Mínima assistência (>75%) OU Supervisão = 3	
TRANSFERÊNCIAS Pontuação máxima = 9	Sentado para em pé Não avaliado OU Assistência total (<25%) = 0 Máxima assistência (25 a 50%) = 1 Moderada assistência (50 a 75%) = 2 Mínima assistência (>75%) OU Supervisão = 3 Equilíbrio estático uma vez estabelecida a posição em pé Não avaliado OU Assistência total (<25%) = 0 Máxima assistência (25 a 50%) = 1 Moderada assistência (50 a 75%) = 2 Mínima assistência (>75%) OU Supervisão = 3 Transferência do leito para a cadeira OU da cadeira para o leito Não avaliado OU Assistência total (<25%) = 0 Máxima assistência (25 a 50%) = 1 Moderada assistência (50 a 75%) = 2 Mínima assistência (>75%) OU Supervisão = 3	
MARCHA Pontuação máxima = 3	Marcha Não avaliado OU Assistência total (<25%) = 0 Máxima assistência (25 a 50%) = 1 Moderada assistência (50 a 75%) = 2 Mínima assistência (>75%) OU Supervisão = 3	
ENDURANCE Pontuação máxima = 3	Endurance (Distância percorrida em 2 minutos, independentemente do nível de assistência exigido, incluindo períodos de descanso (em pé ou sentado), com ou sem uso de dispositivo de auxílio Incapaz de deambular OU Não avaliado = 0 Distância percorrida entre 1 - 15 metros = 1 Distância percorrida entre 15 - 30 metros = 2 Distância percorrida ≥ 30 metros = 3	
PONTUAÇÃO MÁXIMA 32	PONTUAÇÃO TOTAL	
COMENTÁRIOS:		

*Traduzido com a permissão de Perme et al.^(1,2) e Methodist Hospital. Tubo Oro-traqueal (TOT), cateter central inserido periféricamente (CCIP), Sonda de Gastrostomia Percutânea (SGP), Sonda de Jejunostomia Percutânea (SJP), Cateter Epidural (Patient Controlled Analgesia - PCA), Balão intra aórtico (BIA), dispositivo de assistência ventricular esquerda (DAVE), Terapia de substituição renal contínua (TSRC), Curativo a vácuo para feridas (VAC).

Fonte: KAWAGUCHI, Y. M. F. et al. Perme Intensive Care Unit Mobility Score e ICU Mobility Scale: tradução e adaptação cultural para a língua portuguesa falada no Brasil. **J Bras Pneumol**, v. 42, n. 6, p. 1-4, 2016.