

Projeto de Pesquisa Científica

1.1 IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO: **Efeito de diferentes intensidades de exercício físico no sistema imunológico, na funcionalidade do assoalho pélvico e na qualidade de vida de atletas**

PALAVRAS-CHAVE: Atletas, assoalho pélvico, sistema imune, exercício físico.

RESUMO

O objetivo deste projeto é avaliar o impacto de diferentes intensidades do exercício físico em marcadores inflamatórios, funcionalidade do assoalho pélvico e qualidade de vida de atletas. Será feita apresentação do projeto pelos pesquisadores, e os atletas maiores de 18 anos, assíduos aos treinamentos e que aceitem fazer parte do estudo, deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Para a realização do projeto será realizada a coleta da saliva para avaliação de marcadores hormonais e concentração de citocinas. Será aplicado um questionário sobre qualidade de vida antes e após o treinamento. Este projeto apresenta grande potencial na geração de estudos científicos que possam contribuir de forma significativa para a compreensão do potencial imunorregulador em atletas que possa influenciar no acompanhamento de alterações inflamatórias induzidas pelo exercício. Desta forma, auxiliando na aplicação de estratégias não farmacológicas para a manutenção da qualidade de vida destes indivíduos.

1.2 Dados do proponente e equipe

Local de realização do Projeto: Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

1. Recrutamento de participantes e coleta de dados:

a) Após divulgação nas redes sociais e grupos de corrida será agendado um horário com cada participante para esclarecimentos sobre a pesquisa, assinatura do TCLE e preenchimento dos questionários

2. Análise dos dados e amostras biológicas:

a) As análises bioquímicas serão realizadas no Laboratório de Pesquisa em Imunologia Celular e Molecular, 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: Coordenadora.

Equipe envolvida:

Nome: Me. Joane Severo Ribeiro

Vínculo: Aluna de doutorado PPG Ciências da Reabilitação - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisadora

Nome: Bruna Moraes Isidoro

Vínculo: Aluna de mestrado profissional PPG Ciências da Nutrição - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisadora

Nome: Igor Martins

Vínculo: Aluno de graduação do curso de Fisioterapia - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisador

Nome: Dr. Gilson Pires Dorneles

Vínculo: Aluno de Pós-doutorado do PPG Ciências da Saúde - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisador

Nome: Dra. Viviane Elsner

Vínculo: Aluna de Pós-doutorado (bolsista PDJ/CNPq) do Laboratório de Imunologia - UFCSPA

Atuação no projeto: Pesquisadora

1.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

A prática de exercício físico apresenta muitas variações, visto que depende do tipo, da quantidade, da intensidade e o volume de treino, assim como depende das características individuais de seus praticantes tais com: sexo, idade bem como estado geral de saúde. O exercício físico é capaz de apresentar efeitos agudos e crônicos, sobre os sistemas corporais, inclusive o 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 podem estimular determinados 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 (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2011).

A crescente exponencial na prática de exercício físico, nos remete também à crescente busca da prática de corrida de rua, não só no Brasil, como no mundo ganhando cada vez mais adeptos (SHIPWAY e HOLLOWAY, 2016; GOTAAS, 2013). No que se refere à corrida, isso se deve também pela facilidade de sua prática, visto que não são necessários materiais caros e específicos, além de proporcionar sociabilidade, melhora da saúde e redução da ansiedade e do 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, estimula a busca por desafios pessoais a serem alcançados, aumentam-se as distâncias, mudam-se os tipos de solo, diferentes cidades, e também novas modalidades esportivas. E nessa procura pelo novo, muitos se deparam com o triathlon, que envolve natação, ciclismo e corrida, que são praticadas de forma contínua e ininterrupta, demandando 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 3,8 Km 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 grandes intensidades podem levar a falhas no sistema imune, predispondo o indivíduo ao risco de episódios infecciosos. Nesse caso, doses moderadas poderiam ser benéficas para a resposta imunológica quando praticadas à longo prazo. Assim como, no sistema musculoesquelético do sistema genitourinário, exercícios intensos têm 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).

Com relação a prática de atividade física já está bem estabelecido os benefícios da prática constante, entretanto não sabemos qual o efeito de volumes mais intensos de treinos a nível sistêmico e no sistema imunológico dos atletas amadores. 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. 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.

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. Considerando a pandemia da COVID-19, pretendemos verificar um possível impacto da COVID-19 no sistema imunológico dos atletas. Desse modo, considerando os fatores descritos e a existência de poucos estudos sobre o tema, encontra-se a relevância desse estudo.

1.4 OBJETIVOS

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.

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;
- Verificar 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;
- Verificar a relação entre dosagens de vitamina D e disfunções de assoalho pélvico;

- Verificar se há relação do perfil alimentar e de suplementação, bem como da intensidade do exercício com os índices inflamatórios dos atletas amadores.

1.5 METODOLOGIA

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 às populações de estudo.

A intervenção consistirá na aplicação de questionários de forma online, através do google docs, e na colheita salivar, 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 salivette, pré identificado para o momento específico da coleta.

Os participantes serão recrutados através de contato com assessorias esportivas, cartaz digital e redes sociais. Será feita apresentação do projeto pelos pesquisadores, e os atletas maiores de 18 anos, assíduos aos treinamentos e que aceitem 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 cálculo 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 mínimo de 86 participantes. Os participantes serão divididos em 6 grupos de 15 atletas cada.

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 Kolgomorov-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.

Etapas 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.

Etapas II: Reunião de forma online afim de esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e os protocolos de tratamento, e leitura completa do TCLE.

A assinatura do TCLE será feita de forma digital, antes do preenchimento dos questionários, utilizando o formulário google docs. Após concordar com os termos do TCLE, o formulário irá direcionar para as perguntas da ficha de anamnese e dos questionários. Essa etapa terá duração aproximada de, no máximo, 40 minutos. As orientações quanto ao preenchimento dos hábitos alimentares, 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.

Etapa III: 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. A coleta de saliva ocorrerá em três momentos distintos (pré prova ao acordar, pós prova às 17h e pós prova no dia seguinte ao acordar) pelo próprio voluntário em sua residência, a qual terá uma duração em torno de 10 minutos.

Os materiais para a coleta serão entregues na residência do voluntário, em dia e hora combinados previamente, contendo uma via do termo de orientações ao voluntário. Os materiais serão preparados considerando todos os protocolos de segurança, com utilização de face shield, máscara de proteção e álcool em gel.

Todos os procedimentos serão realizados obedecendo às normas de biossegurança para material biológico.

1.6 ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PROJETO

	MESES											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Etapa 1- recrutamento, aplicação dos questionários e colheita	X	X	X	X	X	X						
Etapa 2 – análise e tabulação dos questionários	X	X	X	X	X	X	X	X				
Etapa 3 – análise de hormônios e citocinas			X	X	X	X	X	X				
Análise dos dados							X	X			X	X
Escrita de artigos								X				X

1.7 PRODUTOS ESPERADOS

A partir da execução do projeto pretende-se: a) Gerar conhecimento científico relacionados a biomarcadores inflamatórios e exercício físico; b) Formação de recursos humanos permitindo a realização de Tese de doutorado, iniciação científica e trabalho de conclusão de curso; c) Produção de artigo

científico em revistas indexadas internacionais; d) envio de resumos para congressos científicos da área.

1.8 PONTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS

Os resultados desta pesquisa irão trazer conhecimento aos atletas sobre seu sistema imunológico, funcionalidade do assoalho pélvico 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. Desta forma pretende-se contribuir para o entendimento da resposta do sistema imune e na qualidade de vida dos atletas para a prevenção, manutenção e recuperação durante o treinamento, proporcionando um benefício pleno na realização do exercício.

REFERÊNCIAS

ABBAS A. K. Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ALMEIDA, M. B. et al. Urinary incontinence and other pelvic floor dysfunctions in female athletes in Brazil: A cross-sectional study. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, v. 26, n.9, p. 1109-1116, 2015.

AROUCA, M. A. F. et al. Validation and cultural translation for Brazilian Portuguese version of the Pelvic Floor Impact Questionnaire (PFIQ-7) and Pelvic Floor Distress Inventory (PFDI-20). *The International Urogynecological Association*, [s.l.], v. 27, p. 1097–1106, 2016.

AUGE, A. P. F. et al. Sintomas do trato urinário inferior e sexualidade: uma revisão. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, [s.l.], v. 55, p. 76-81, 2010.

BARRETO, A. P. P., et al. O Impacto da Disfunção Sexual na Qualidade de Vida Feminina: um estudo observacional. *Revista Pesquisa em Fisioterapia*, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 511- 517, 2018.

BAYTUR, Y. B. et al. Mode of delivery and pelvic floor muscle strength and sexual function after childbirth. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 88 (3), 276-280, 2005.

BELLOTO M. F. Efeito do exercício físico sobre o estado inflamatório de diabéticos. *EFDsports*, v. 159, n.16, 2011.

BO K. Urinary incontinence, pelvic floor dysfunction, exercise and sport. *Sports Medicine*, 34(7):451-64, 2004.

BO, K. et al. An International Urogynecological Association (IUGA)/ International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for the conservative and nonpharmacological management of female pelvic floor dysfunction. *Neurourology and Urodynamics*, [s.l.], v. 9999, p. 1–24, 2016.

BRUNELLI D. T. et al. Immune responses to an upper body tri-set resistance training session. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 34(1):64-71, 2014.

CAMARGO, A. S. S. et al. A influência da força muscular do assoalho pélvico no grau de satisfação sexual feminina. *Revista Amazônia Science & Health*, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 2-8, abr./jun. 2016.

CORREIA, L. S. et al. Função Sexual e Qualidade de Vida de Mulheres: um estudo observacional. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, [s.l.], v. 32, p. 405-409, 2016.

CAETANO A. S, TAVARES M. C. G. C. F, LOPES M. H. B. M. Incontinência urinária e a prática de atividades físicas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 13(4):270-74, 2007.

CARVALHO, D.S; KOWACZ, P.A. Avaliação da intensidade de dor. Migranêas cefaléias Vol.9 no.4. Curitiba, Out/Nov/Dez, 2006.

CAYLET N. et al. Prevalence and occurrence of stress urinary incontinence in elite women athletes. *The Canadian Journal of Urology*, 13(4):3174-9, 2006.

COUTO M, SILVA D, DELGADO L, MOREIRA A. Exercise and airway injury in athletes. *Acta Medica Portuguesa*, 26(1):56-60, 2013.

DAVIDSON SR, BURNETT M, HOFFMAN-GOETZ L. Training effects in mice after long- term voluntary exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 38(2):250-52006.

DEL PRETE G. The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets. *Parasitologia*, 50:9-16, 2008.

DIMENT, B. C. et al. Exercise intensity and duration effects on in vivo immunity. *Medicine and Science in Sports Exercise*. Vol. 47. Num. 7, p. 1390-139, 2015.

ELIASSON K, EDNER A, MATTSSON E. Urinary incontinence in very young and mostly nulliparous women with a history of organized high-impact trampoline training: occurrence and risk factors. *International Urogynecology Journal*, 19(5):687-96, 2008.

FERREIRA, C.C. et al. Frequência de disfunção sexual em mulheres com doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.53, n.1, p.35-46, 2013

FLECK Marcelo PA, Sérgio Louzada, Marta Xavier, Eduardo Chachamovich, Guilherme Vieira, Lyssandra Santos e Vanessa Pinzon Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida "WHOQOL-bref". Revista Saúde Pública, 34 (2): 178-83, 2000 www.fsp.usp.br/rsp

FONSECA, B; DEFÁVERI, B.O; ZENI, P. Comparação entre os métodos subjetivo e objetivo para a avaliação da dor em idosos. FisiSenectus, Ano 5, n. 1 – Jan/Jun, p. 13-20, 2017.

GLEESON, M.; "Immune Function in Sport and Exercise" (1st Edition) Churchill Livingstone, 2006

GLEESON, M. e PYNE, D.B. Exercise effects on mucosal immunity. Immunology and Cell Biology, 78:536-544, 2000.

GOTAAS T. Correr: a história de uma das atividades físicas mais praticadas no mundo. São Paulo: Matriz, 2013.

HENSCHER, U. Fisioterapia em Ginecologia. Ed. Santos 2007.

HINO AAF, REIS RS, CIRO RODRIGUEZ-AÑEZ R, FERMINO RC. Prevalência de lesões em corredores de rua e fatores associados. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 15(1):36-39, 2009.

LEANDRO C. G. et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 13:343-48, 2007.

LUCKHEERAM RV, et. al. CD4(+)T cells: differentiation and functions. Clinical and Developmental Immunology, v. 2012:925135 , 2012.

MARINHO A. R. et al. Incontinência urinária feminina e fatores de risco. Fisioterapia Brasil, 7:4, 2006.

MARKWELL SJ, SAPSFORD RR. Physiotherapy management obstructed defecation. Australian Journal of Physiotherapy, 41(4):279-83, 1995.

MCDOWELL, S.L. et al. The Effect of Exercise Training on Salivary Immunoglobulin A and Cortisol Responses to Maximal Exercise. International Journal of Sports Medicine, 13: 577-580, 1992.

MCARDLE WD, KATCH FI, KATCH VL. Fisiologia do Exercício: nutrição, energia e desempenho humano. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

MEMON H, HANDA V. Vaginal Childbirth and Pelvic Floor Disorders: Risk Factors for PFDs. Women's Health, 9 (3):265- 277, 2013..

MERCER, K.W.; DENSMORE, J. J. "Haematological disorders in the athlete" *Clinical Sports Medicine*, 24: 599-621, 2005.

MIRANDA, R.; SCHOOR, E.; GRÃO, M. J. B. C. Avaliação Postural em mulheres com dor pélvica crônica. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, v. 31, n. 7, p. 353-360, 2009.

NYGAARD IE, THOMPSON FL, SVENGALIS SL, ALBRIGHT JP. Urinary incontinence in elite nulliparous athletes. *Obstetrics & Gynecology*, 84(2):183-7, 1994.

NOGUEIRA, A. A.; REIS, F. J. C.; POLI NETO, O. B. Abordagem da dor pélvica crônica em mulheres. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, v. 28, n. 12, p. 733-740, 2006.

PADILHA, J. F. et al. Investigação da Qualidade de Vida de Mulheres com Incontinência Urinária. *Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR*, Umuarama-PR, v. 22, n. 1, p. 43-48, jan./abr. 2018.

PECHORRO, P. et al. Validação portuguesa do índice de Funcionamento Sexual Feminino (FSFI). *Laboratório de Psicologia*, v.7, n.1, p. 33-44, 2009.

PEDERSEN BK, HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews*, 80(3):1055-81, 2000.

REIS AB, BARROTE D, BARACHO ELS, NETO JM. *Anatomia Feminina* vol 1. Rio de Janeiro: Medsi. 3 ed., 2002.

ROSENBAUM, T. Y. Pelvic floor involvement in male and female sexual dysfunction and the role of pelvic floor rehabilitation in treatment: a literature review. *Journal of Sexual Medicine*, v 4, n. 1, p. 4-13, 2007.

SAPSFORD R. Rehabilitation of pelvic floor muscles utilizing trunk stabilization. *Manual Therapy*, 9(1):3-12. 21, 2004.

SILVA, J. C. P.; SOLER, Z. A. S. G.; WYSOCKI, A. D. Fatores associados à incontinência urinária em mulheres submetidas ao exame urodinâmico. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, [s.l.], v. 51, p. 1-9, 2017.

SHIPWAY R, HOLLOWAY I. Health and the running body: notes from na ethnography. *International Review for the Sociology of Sports*, Norwich. 51(1): 78-96, 2016.

SUZUKI, K.; SHIGEYUKI, N.; et al "Systemic inflammation response to exhaustive exercise: cytokine kinetics". *Exercise Immunology Review*, 2002; 8:6-48

THIEL, R. do R. C. et al. Tradução para português, adaptação cultural e validação do Female Sexual Function Index. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 30, n. 10, p. 504-10, 2008.

TONETTO, L. da S. et al. Função sexual de idosas com incontinência urinária. Revista Kairós Gerontologia, v. 19, n. 4, p. 305-318, 2016.

VITTON V, BAUMSTARCK-BARRAU K, BRARDJANIAN S, CABALLE I, BOUVIER M, GRIMAUD JC. Impact of High-Level Sport Practice on Anal Incontinence in a Healthy Young Female Population. Journals of Women's Health, 20(5):757-63, 2011.

PROJETO DE PESQUISA

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?

EQUIPE

Coordenadora:

Prof^ª Dr^ª Alethéa Gatto Barschak - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Colaboradores:

Prof^ª Dr^ª Marcia Giovenardi - UFCSPA

Luiza Ferracini da Cunha - aluna de doutorado - PPG Ciências da Saúde-UFCSPA

Amanda Maciel – discente Curso de Biomedicina integral – UFCSPA

Local de origem/realização: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Resumo

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. A longo prazo, consumir quantidades excessivas de alimentos ricos gordura saturada afeta a homeostase de todo o organismo, 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 e, mais importante, aumenta a vulnerabilidade à depressão e ansiedade. O alto consumo de carboidratos também já foi associado a diminuições cognitivas, principalmente quando falamos de açúcar simples. Dietas ricas em proteína são amplamente utilizadas como estratégia para perda de peso, em função do aumento de saciedade. Apesar de normalmente efetivo, esse tipo de dieta também traz riscos para a saúde, que são pouco divulgados. Quando feita sem a devida orientação, esse tipo de dieta pode levar a danos renais e metabólicos. Os probióticos apresentam efeitos benéficos no tratamento e prevenção de diversas doenças, desde distúrbios gastrointestinais até alergias, 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 formação de produtos tóxicos e melhora a função hepática. 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. O objetivo do estudo é comparar, em um modelo animal experimental, os rastros metabólicos deixados pela dieta rica em cada um dos macronutrientes, associada ou não ao uso de probióticos e ao retorno a uma dieta equilibrada.

PALAVRAS-CHAVE: dieta hiperglicídica, dieta hiperproteica, dieta hiperlipídica, metabolismo energético, estado redox, probióticos, comportamento.

Caracterização do Problema - INTRODUÇÃO

Cada vez mais temos a 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. 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).

Sabemos 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 a diminuições cognitivas, principalmente quando falamos de açúcares simples (Roberts et al., 2012).

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 & 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.

As dietas ricas em proteína são indicadas para pacientes 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).

Os carboidratos na dieta são fornecidos por amidos e açúcares adicionados e podem ser ingeridos em alimentos sólidos ou em bebidas. 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 à insulina, o que pode levar 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 (Astrup et al., 2000). Assim, reduzir a gordura 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 à insulina, aumento de gordura corporal e esteatose hepática, tanto em animais quanto em seres humanos (Buettner, Schölmerich & Bollheimer, 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. 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 a devida orientação, 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).

Os probióticos apresentam efeitos benéficos no tratamento e prevenção de diversas doenças, desde distúrbios gastrointestinais até alergias, 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 formação de produtos tóxicos e melhora a função hepática (Neag et al., 2020). O efeito benéfico dos probióticos pode ocorrer 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).

Os probióticos apresentam diversos benefícios metabólicos, como a regulação da 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 (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).

O consumo de diferentes dietas não só proporciona substratos específicos para o metabolismo, 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). 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). Apesar desses benefícios, não há literatura sobre comportamento comparado a esse tipo de dieta.

POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS

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, hiperpalatáveis, 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.

Nesse contexto, pouco se sabe sobre as alterações metabólicas relacionadas a associação entre as diferentes dietas e o uso de probióticos, bem como se o restabelecimento de uma dieta equilibrada, por si só, é suficiente para reverter as consequências metabólicas do desequilíbrio dietético.

Considerando que as DCNT, hoje responsáveis por um número elevado de mortes no mundo, estão na sua maioria relacionadas a dietas desequilibradas, a investigação do papel das diferentes dietas (dietas hiperlipídica, hiperproteica ou hiperglicídica) associadas ou não ao uso de probióticos sobre as vias metabólicas e o entendimento do seu papel nas complicações da obesidade e outras doenças metabólicas são essenciais na busca por novas estratégias de tratamento e/ou prevenção. Esse entendimento pode contribuir futuramente para reduzir o impacto destas doenças na população, reduzindo complicações e custos para o sistema de saúde.

HIPÓTESE

Acreditamos que as dietas hiperlipídica, hiperproteica ou hiperglicídica alteram o metabolismo, causando modificações no equilíbrio redox e energético de tecidos como cérebro, adiposo, hepático e muscular e que o uso de probióticos e/ou o retorno ao consumo de uma dieta equilibrada podem prevenir ou reverter parte dessas alterações trazendo benefícios ao organismo.

OBJETIVOS E METAS

Geral

Estudar e comparar as implicações metabólicas e comportamentais do consumo das dietas hiperproteica, hiperglicídica e hiperlipídica associadas ao uso de probióticos e/ou ao retorno ao consumo de uma dieta equilibrada em ratos Wistar.

Específicos

Objetivo 1: Modelo experimental

Meta: - Induzir alterações metabólicas por meio do fornecimento de três dietas diferentes (hiperlipídica, hiperproteica ou hiperglicídica).

- Administrar probióticos aos grupos específicos.
- Fornecer uma dieta equilibrada (dieta padrão) após um período de consumo de uma das três dietas diferentes (hiperlipídica, hiperproteica ou hiperglicídica).

Objetivo 2: Analisar o comportamento nos grupos estudados

Meta: Realizar os testes comportamentais de ansiedade/medo, locomoção, memória e depressão.

Objetivo 3: Determinar o perfil bioquímico dos animais estudados

Metas: - Analisar a glicemia, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL, ureia, creatinina, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e lactato desidrogenase (LDH).

- Determinar os níveis de ácidos graxos livres circulantes.
- Determinar o ganho de peso e índice de Lee

Objetivo 4: Analisar o perfil energético em diferentes tecidos dos animais estudados

Metas: - Determinar a atividade dos complexos da Cadeia transportadora de elétrons

- Determinar a atividade de enzimas do ciclo de Krebs

Objetivo 5: Determinar o perfil redox em diferentes tecidos dos animais estudados

Metas: - Analisar a presença de espécies reativas de oxigênio e de dano oxidativo a proteínas e lipídeos.

- Analisar as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase)

Objetivo 6: Analisar a via de sinalização da insulina no fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e estruturas cerebrais dos animais estudados e níveis sistêmicos hormonais

Meta: -Analisar via de sinalização envolvendo a insulina (via AKT/PI3K)

- Analisar os níveis plasmáticos de leptina, grelina e insulina.

Objetivo 7: Analisar a histologia do tecido adiposo e do tecido hepático

Meta: -Determinar e avaliar a presença de esteatose hepática e inflamação.

- Verificar possíveis diferenças na morfologia do tecido adiposo nos diferentes grupos estudados.

- Analisar a presença de UCP-1 no tecido adiposo dos diferentes grupos.

METODOLOGIAS E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

Animais

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.

Delineamento experimental

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 10 animais por grupo. Tendo em vista que o experimento será realizado com 7 grupos, que serão subdivididos na segunda etapa, totalizando 140 animais.

O estudo será realizado em 2 tempos (T1 – 8 semanas e T2-16 semanas).

No T1, os animais serão divididos em 7 grupos (20 animais por grupo):

Grupo 1 – Controle (Dieta Padrão) 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.

Ao final de T1 (8 semanas) dez animais de cada grupo serão submetidos a testes comportamentais e eutanasiados para obtenção dos tecidos.

Na segunda parte do experimento os animais (não eutanasiados ao final de T1, 10 animais por grupo) dos grupos 1, 2, 4 e 6 receberão ração padrão e água e os animais dos grupos 3, 5 e 7 receberão ração padrão e próbioticos, por 8 semanas. Esses tratamentos buscam verificar a reversão dos danos causados pelas dietas hipercalóricas e comparar com os animais

suplementados com probióticos. Ao final da segunda parte do experimento serão realizados testes comportamentais e todos os animais serão eutanasiados para obtenção dos tecidos.

Composição das dietas

Os animais serão alimentados conforme os grupos do estudo com dieta padrão (controle), hiperglicídica, hiperlipídica e hiperproteica, conforme a tabela 1, 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 (%)	22	21,09	16,67	52,73
Carboidratos (%)	67	69,56	38,23	37,92
Amidos (%)		32,16	29,2	26,49
Sacarose (%)		36,36	8,21	10,39
Gordura (%)	4	9,35	45,09	9,35
Óleo de soja (%)		9,35	7,39	9,35
Banha (%)		0	37,7	0
Mix de vitaminas (%)	1	1,04	0,82	1,04
L cisteína (%)		0,31	0,25	0,78

Administração dos probióticos

As cepas de probióticos escolhidas foram *Lactobacillus acidophilus* (~1010 CFU/g) e *Bifidobacterium lactis* (~1010 CFU/g). 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, os animais restantes de cada grupo receberão água ou a mesma dose de probióticos por mais 8 semanas (para verificar a reversão dos danos).

Local de realização

Este projeto será realizado nas dependências da UFCSPA, a qual possui os recursos necessários para a execução do projeto. Será utilizado o Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica.

Aspectos éticos

Todos os procedimentos realizados neste trabalho 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 trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFCSPA (parecer 283/21).

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, para preservação do tecido cerebral. Serão coletadas amostras de sangue total, 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.

Avaliação do peso corporal total

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).

Testes comportamentais

Ao final do período da dieta os animais serão avaliados o comportamento do tipo ansioso através do teste do labirinto em cruz elevado durante o ciclo claro, por 5 minutos, conforme previamente descrito por (Pellow *et al.*, 1985). Após a realização do teste do labirinto em cruz elevado, a locomoção dos animais será avaliada no teste do campo aberto durante o ciclo claro, por 5 minutos, conforme previamente descrito por (Blanchard *et al.*, 1990). Depois da realização do teste no campo aberto, a memória de curto e longo prazo será avaliada no teste do reconhecimento de objetos durante o ciclo claro, por 5 minutos, conforme previamente descrito por (Ennaceur e Delacour, 1988). Também será realizado o Teste de Borrifada da Sacarose (TBS), ou *Splash test* (Frisbee *et al.*, 2015), para avaliação do comportamento do tipo depressivo nos animais. 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).

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.

Análises em plasma

Avaliação do perfil bioquímico

Os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis, ureia, creatinina, AST, ALT, LDH, glicose, serão determinados utilizando kits comerciais seguindo as recomendações do fabricante.

Avaliação hormonal

Os níveis plasmáticos de leptina, grelina 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 *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 *et al.*, 2012) e a enzima Isocitrato desidrogenase será determinada de acordo com (Plaut, 1969).

Proteínas

As proteínas nas amostras de tecido serão determinadas de acordo com (Lowry *et al.*, 1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Avaliação do perfil redox

- **Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico:** será realizada pelo método de (Ohkawa *et al.*, 1979). A curva de calibração será realizada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados serão calculados em nmol de MDA/mg proteína.

- **Carbonilas:** será determinado espectrofotometricamente de acordo com (Reznick e Packer, 1994). Os resultados serão calculados como nmol de grupos carbonila/mg de proteína.

- **Sulfidrilas:** Esse método é baseado na redução do DTNB por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) cuja absorção é mensurada espectrofotometricamente a 412 nm (Aksenov e Markesbery, 2001). Resultados serão reportados como nmol TNB/mg de proteína.

- **Ensaio de oxidação 2', 7'dihidrodiclorofluoresceína (DCF):** a produção de espécies reativas será avaliada de acordo com (Lebel e Bondy, 1992).

- **Catalase:** será determinada de acordo com o método descrito por (Aebi, 1984). Os resultados serão expressos em unidades de atividade para a catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μ mol de H₂O₂/min/mg de proteína).

- **Superóxido dismutase (SOD):** atividade enzimática da SOD será determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometrica (480nm), expressa em U de SOD/mg de proteína, de acordo com o método descrito por (Misra e Fridovich, 1972).

Vias de sinalização da insulina

Nos tecidos também serão analisados a via de sinalização da insulina, (IRS-1 e AKT) pelo método de Western Blot conforme a técnica de (Park *et al.*, 2015).

Análises Morfológicas do Tecido Adiposo e Tecido Hepático

Parte do tecido adiposo e do fígado dos animais será fixado em solução de formalina 10%. O tecido será processado e incorporado em parafina, cortes de 4 μ m serão preparados e corados com hematoxilina-eosina; as áreas coradas são analisadas ao microscópio ótico com aumento de x200.

Para a imuno-histoquímica em tecido adiposo serão utilizados anticorpos primários anti UCP-1 e anticorpos secundários. As áreas positivas para UCP-1 serão analisadas ao microscópio ótico com aumento de x200.

CRONOGRAMA, RISCOS E DIFICULDADES

O desenvolvimento deste projeto na sua totalidade compreende 48 meses. Na presente proposta será apresentado um cronograma parcial de 12 meses a que se refere o edital e as atividades que serão realizadas.

A presente proposta visa obter recursos para a realização de parte deste projeto de pesquisa, atividades identificadas no cronograma abaixo, compreendendo os objetivos específicos 1, 2, 6 (parcialmente) e 7.

Atividades	Outubro/2022- Abril/2023	Abril/2023 Outubro/2023	—
Revisão bibliográfica			
Desenvolvimento do experimento (dietas)			
Testes comportamentais			
Avaliação histológica			
Avaliação hormonal			

Análises dos resultados		
Redação do trabalho para congressos e artigos		
Divulgação dos resultados à comunidade científica		

Parte dos riscos está associada a questões relacionadas a disponibilidade dos ratos (animais de biotério podem adoecer, ou por alguma razão, diminuir o acasalamento ou o número de crias). Nas atuais circunstâncias, caso ocorra um agravamento das condições sanitárias relacionadas a pandemia, a execução do projeto pode ser dificultada e seu cronograma prejudicado.

ORÇAMENTO E FONTE FINANCIADORA

A UFCSPA já conta com equipamentos e infra-estrutura necessários para o desenvolvimento das atividades propostas. Este projeto será submetido às agências de fomento para obtenção de recursos adicionais necessários à sua execução.

Assim como o cronograma, o orçamento está dividido em etapas de acordo com a necessidade de materiais/reagentes dos experimentos estabelecidos para cada uma das etapas.

A presente proposta visa buscar recursos para a realização das atividades descritas no cronograma apresentado. As dietas hiperlipídica, hiperproteica e hiperglicídica (PRAGSOLUÇÕES Biociências®) serão custeadas pelos próprios pesquisadores.

O orçamento está detalhado abaixo e no anexo 7A.

Descrição do Objeto	Quant.	Valor Orçado (R\$)	Valor Total do item (R\$)
KIT ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE LEPTINA EM SORO DE RATO - RAB0335	1	2.688,00	2.688,00
KIT ELISA INSULINA DE RATO - RAB0904	1	2.688,00	2.688,00
KIT EIA GRELINA - RAB0207	1	2.519,00	2.519,00
ANTICORPO Policlonal ANTI-UCP-1 (UCP1 POLYCLONAL ANTIBODY) - PA124894	1	2.483,80	2.483,80
TOTAL			10.338,80

RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

É esperado que as dietas aumentem o peso dos animais e causem diferentes danos metabólicos. Sendo assim, acreditamos que as cepas de probióticos escolhidas e/ou o retorno ao consumo de uma dieta equilibrada possam trazer benefícios frente às alterações. É importante obter resultados que comprovem cientificamente os benefícios dos probióticos, tanto a nível metabólico quanto a nível comportamental, independente do tipo de dieta realizada. É muito comum na prática clínica a prescrição de probióticos visando melhoras metabólicas.

A execução deste projeto, incluindo suas etapas experimentais, possibilitará a formação e qualificação de recursos humanos envolvendo alunos de iniciação científica e de pós-graduação (mestrandos e doutorandos). A atuação da equipe de pesquisadores (coordenador e colaboradores) como gerenciadores dos recursos e da execução da proposta também constitui um meio de qualificar os profissionais envolvidos.

Além disso, os resultados obtidos a partir deste estudo serão organizados para publicações em periódicos científicos de circulação internacional, preferencialmente com classificação Qualis A. Os resultados preliminares serão apresentados em congressos regionais, nacionais e internacionais dentro da área de conhecimento do estudo.

Ao longo da execução do projeto serão utilizados indicadores para avaliação e acompanhamento, tais como, execução apropriada do cronograma proposto; utilização dos recursos financeiros de acordo com o originalmente planejado; divulgação dos resultados obtidos em eventos científicos e periódicos da área de conhecimento.

INTERAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DAS PARCERIAS

O desenvolvimento deste projeto permitirá a consolidação de parcerias já estabelecidas no desenvolvimento de outros projetos de pesquisa e de orientação de alunos de pós-graduação. Os professores envolvidos nesta proposta, por meio das suas formações/experiências prévias, irão colaborar nas suas áreas específicas permitindo o pleno desenvolvimento dos objetivos propostos, visto que essas experiências se complementam no sentido de alcançar o pleno desenvolvimento do projeto. Todos os professores envolvidos possuem experiência na execução de projetos aprovados por agências de fomento e na orientação de alunos de pós-graduação.

EQUIPE

Profa. Dra. Alethéa Gatto Barschak (Coordenadora do Projeto) – Professora Associada do Departamento de Ciências Básicas da Saúde/UFCSPA. A professora apresenta experiência na área de Bioquímica, principalmente nos temas: erros inatos do metabolismo, estresse oxidativo, metabolismo energético, alterações metabólicas.

Profa. Dra. Marcia Giovenardi: Bióloga, Doutora em Fisiologia, Professora Associada do Departamento de Ciências Básicas da Saúde/UFCSPA e orientadora do PPG Biociências/UFCSPA e PPG Ciências da Saúde/UFCSPA. Auxiliará principalmente na avaliação comportamental.

Luiza Ferracini da Cunha: Nutricionista, Mestre em Ciências da Saúde-UFCSPA. Doutoranda em ciências da Saúde-UFCSPA será responsável por grande parte do desenvolvimento do projeto (tratamento dos animais e análises das amostras).

Amanda Maciel: discente do curso de Biomedicina Integral-UFCSPA, aluna de iniciação científica. Auxiliará no desenvolvimento do projeto (tratamento dos animais e análises das amostras).

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>
- 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)
- 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., Schölmerich, J. & Bollheimer, L.C. (2007). *High-fat Diets : Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents*. 15(4).
- 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>
- Cocchetto, D. M., & Bjornsson, T. D. (1983). *LITERATURE SURVEY Methods for Vascular Access and Collection of Body Fluids from the Laboratory Rat*.
- Dias, V. J., 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)
- Frisbee, J.C., Brooks, S.D., Stanley, S.C. & d'Audiffret, A.C. (2015) An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 106, e53109,1-8. <https://doi.org/10.3791/53109>
- H. Aebi. (1984). Catalase invitro. *Methods Enzymol.*, 6, 105–121.
- 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>
- 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)
- 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.
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Zapata Posada, Á. P. (2020). *Dietas hiperproteicas y la función renal en deportistas*. <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/153320>

Edital PROPPG nº 10/2022

Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA

Projeto de pesquisa

i. Identificação do projeto de pesquisa

Título: Análise da expressão de genes de virulência de *Streptococcus pneumoniae* pertencentes a sorotipos não-vacinais isolados de portadores e de doença pneumocócica invasiva e comparação do perfil de virulência *in vivo*.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, sorotipos não-vacinais, virulência, portadores, doença invasiva.

Resumo: Infecções por *Streptococcus pneumoniae* constituem um problema de saúde pública de preocupação global. Foi introduzido no calendário de vacinação infantil brasileiro em 2010, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente, porém, foi verificada a ocorrência de pressão seletiva sobre a distribuição dos sorotipos circulantes e associados à doença. Desta forma, é necessário o monitoramento das mudanças ocorridas tanto em termos de colonização, quanto de infecção em relação à severidade e desfecho da doença invasiva. *S. pneumoniae* é um importante comensal da nasofaringe humana e a colonização da mucosa do trato respiratório superior é o passo inicial para infecção, sendo que até o momento, pouco se sabe sobre os fatores que condicionam a transição para a infecção e os determinantes da virulência bacteriana *in vivo*. A pesquisa da expressão de genes relacionados à virulência, assim como, a avaliação da infecção pneumocócica *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* podem colaborar com a elucidação destes fatores desconhecidos em diferentes isolados pneumocócicos. Comparar a expressão de genes e o perfil de virulência *in vivo* de sorotipos não-vacinais de *S. pneumoniae* isolados de portadores e de doença pneumocócica invasiva. Para que este objetivo seja cumprido, serão realizadas a análise da expressão genes de virulência e a determinação do perfil de virulência por modelo *in vivo* de larvas *G. mellonella*, utilizando isolados de portadores e de doença pneumocócica invasiva de sorotipos não-vacinais. Os dados gerados pela execução deste projeto terão importante valia para o controle das doenças causadas por *S. pneumoniae* e futuro desenvolvimento de novas vacinas.

ii. Dados do proponente e equipe

Proponente:

- Cícero Armídio Gomes Dias: Doutor em Ciências - Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professor adjunto da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Função: Coordenador.

Demais componentes:

- Danielle da Silva Trentin: Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professora adjunta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Função: Coordenadora substituta;
- Muriel Primon de Barros: Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pós-doutoranda em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Função: Execução das técnicas experimentais;
- Clara Mendonça de Carvalho: Graduanda do curso de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e aluna de iniciação científica. Função: Execução das técnicas experimentais;
- Laura Cavalheiro Brizola: Graduanda do curso de Medicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e aluna de iniciação científica. Função: Execução das técnicas experimentais;
- Carolina Bibiano Villar: Graduanda do curso de Biomedicina da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e aluna de iniciação científica. Função: Execução das técnicas experimentais.

iii. Caracterização da proposta

Infecções causadas por *S. pneumoniae* constituem um problema de saúde pública de preocupação global, devido ao grande número de mortes e outros desfechos desfavoráveis, principalmente em crianças até 5 anos, idosos e pacientes em algum estado de imunocomprometimento (Yanagihara et al., 2021; Andrade et al., 2010; Brandileone et al., 2003). Dados da Organização Mundial da Saúde estimaram que das 8,8 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos em todo o mundo no ano de 2008, aproximadamente 541.000 (6%) destas estejam relacionadas a infecções pneumocócicas, em que a pneumonia ainda é a maior causa de morte nesses indivíduos, representando cerca de 485.000 casos (89,6%), seguida de meningites com 38.800 (7,2%) e outras infecções causando 17.400 (3,2%) mortes nessa faixa etária (WHO, 2012).

Foi introduzido no calendário de vacinação infantil brasileiro em 2010, a vacina pneumocócica conjugada 10-valente (PCV-10). Estudos demonstram a efetividade dessa medida na redução de infecções pneumocócicas invasivas (Verani 2015; Domingues et al., 2014) e nas internações por pneumonias no sistema público de saúde (Scotta et al., 2014). A introdução das vacinas pneumocócicas, principalmente as conjugadas, demonstrou efetividade na prevenção da doença pneumocócica invasiva (DPI), com diminuição drástica dos casos de DPI, pelo efeito conhecido como imunidade de rebanho. Contudo, foi verificada a ocorrência de pressão seletiva sobre a distribuição dos sorotipos circulantes e associados a doença (maior incidência de sorotipos não-vacinais), levando à necessidade de um monitoramento das mudanças ocorridas tanto na

colonização, quanto na severidade e desfecho das infecções (Neves et al., 2013; Yoshioka et al., 2011; Tyrell et al., 2009; Tsai et al., 2008; Alanee et al., 2007; Isaacman et al., 2007). Particularmente no Brasil, dados sugerem um aumento relativo de DPI pelo sorotipo não-vacinal 19A, em adultos, após introdução da vacina (Christophe et al., 2018).

Streptococcus pneumoniae é um importante comensal da nasofaringe humana (Simel et al. 2012). O estado de portador é mais frequente nos primeiros 2 anos de vida, quando aproximadamente 60% das crianças são colonizadas (Garcia-Rodriguez; Fresnadillo, 2002). Em idosos a colonização tem taxas reduzidas e relação com o contato com crianças colonizadas, todavia, a incidência de pneumonia nestes indivíduos pelos sorotipos não-vacinais é alta (Weycker et al., 2010). A passagem pela nasofaringe constitui o primeiro passo em direção à doença invasiva, quando fatores bacterianos e do hospedeiro permitem que invadam locais essencialmente estéreis, como os espaços do ouvido médio, pulmões, corrente sanguínea e meninges (Weiser et al., 2018). Porém, pouco se sabe sobre os fatores que condicionam a transição para a infecção e os determinantes da virulência bacteriana *in vivo* (Blumental et al., 2015). Fatores individuais, tais como nível socioeconômico, presença de crianças na residência, tabagismo, e consumo de álcool, já foram citados como fatores de risco para ocorrência de infecções por *S. pneumoniae* (Adriani et al., 2015; Cruickshank et al., 2014; Bogaert, et al., 2004). Já em relação ao pneumococo, os principais fatores de virulência responsáveis por predispor infecção incluem, cápsula polissacarídica, pili e proteínas (Mitchell & Mitchell, 2010).

A virulência de diferentes isolados pneumocócicos pode ser avaliada no modelo de infecção *in vivo* de *Galleria mellonella*, especialmente através da determinação da carga bacteriana durante a infecção e da curva de sobrevivência das larvas infectadas (Evans et al., 2012). Em um estudo prévio, utilizando *G. mellonella* como modelo *in vivo*, realizado em 2021 por nosso grupo de pesquisa, comparou vinte e dois isolados de *S. pneumoniae* sorotipo 19A, verificando maior virulência dos isolados oriundos de doença pneumocócica invasiva, em relação aos oriundos de nasofaringe de portadores saudáveis (dados ainda não publicados apresentados no relatório parcial - anexo 2). Contudo, não foi realizada a análise da expressão dos genes de virulência presentes. Estes resultados prévios motivam a continuação desta pesquisa, aprofundando a investigação do papel do perfil de virulência de diferentes sorotipos não-vacinais de *S. pneumoniae* no desfecho da doença pneumocócica invasiva em comparação ao estado de portador deste micro-organismo, conforme a proposta do presente projeto.

iv. Objetivos geral e específicos

Objetivo geral:

- Comparar a expressão de genes e o perfil de virulência *in vivo* de sorotipos não-vacinais de *S. pneumoniae* isolados de portadores e de doença pneumocócica invasiva.

Objetivos específicos

- Analisar a expressão de genes de virulência de *S. pneumoniae* pertencentes a sorotipos não-vacinais isolados de portadores (P) e de doença pneumocócica invasiva (DPI);
- Determinar a virulência dos pneumococos (P e DPI) *in vivo* no modelo alternativo de larvas de *G. mellonella*;
- Realizar painel comparativo da expressão de genes de virulência entre os pneumococos (P e DPI) e do perfil de virulência *in vivo*.

v. Metodologia

- **Seleção dos isolados de *S. pneumoniae*:** Serão selecionados isolados de *S. pneumoniae* dos sorotipos não-vacinais pertencentes ao banco de *S. pneumoniae* do professor proponente deste projeto, oriundos dos projetos anteriores:

- 12 isolados de portadores: Obtidos pelo projeto contemplado no edital 03/2017 Chamada FAPERGS/MS/CNPq/SESRS PPSUS 2017 “*Streptococcus pneumoniae* isolados de portadores: fatores de risco para colonização, virulência dos sorotipos e efeito vacina conjugada 10-valente” (CEP UFCSPA: 2.176.785, em anexo 1 e nota de esclarecimento que o professor Dr. Cícero Armídio Gomes Dias é proponente do projeto do CEP UFCSPA: 2.176.785 - anexo 1, CEP HCPA: 2.106.235 - anexo 2 e Nota de esclarecimento - anexo 3);
- 12 isolados de doença pneumocócica invasiva: Obtidos através do estudo de Christophe e colaboradores (2018), projeto “Prevalência de resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* isolados de doença invasiva” (CEP UFCSPA 2.025.673 - anexo 4).

- **Análise da expressão dos genes de virulência presentes:** A investigação da expressão de 13 genes envolvidos com fatores de virulência de *S. pneumoniae* com papel principal em colonização e infecção (*lytA*, *nanA*, *nanB*, *pavA*, *pcpA*, *phtA*, *phtB*, *phtD*, *phtE*, *rrgA*, *sipA*, *pspA*, *pspC*) será realizada por qRT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (adquiridos projeto aprovado no Edital nº 04/2021/PROPPG) (Blumental et al., 2015). A extração do RNA será realizada a partir de culturas dos isolados criopreservados (utilizando o kit SV Total RNA Isolation System - Promega) conforme as instruções do fabricante. A concentração e integridade do RNA será avaliada através do equipamento NanoDrop™. O cDNA transcrito será obtido a partir do RNA total extraído (500 pg) (utilizando o kit GoTaq 2-Step RT-qPCR System - Promega), como descrito por Sakai e colaboradores (2013), com adaptações. Para a qRT-PCR será utilizado o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e o equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, utilizando como controle as linhagens R6 e Tigr4.

- **Determinação de virulência de *S. pneumoniae* em modelo *in vivo* de *G. mellonella*:** Para o estudo da virulência dos diferentes isolados de *S. pneumoniae*, será utilizado o modelo de infecção alternativo de larvas *G. mellonella* (Evans et al., 2012). Todo o ciclo de vida deste animal é mantido no nosso laboratório (302 do prédio 3) a temperatura ambiente e com alimentação artificial (Silva, 2017). Grupos de 10 larvas no último estágio de desenvolvimento, pesando entre 0,23-0,27 g, serão tratados com diferentes concentrações inóculo (10^4 - 10^7 UFC/mL) ou com PBS (controle). Os grupos serão incubados a 37 °C por 5 dias e a cada 24 h as larvas serão avaliadas quanto à sobrevivência mediante movimento após estímulo de toque. A análise de sobrevivência será realizada utilizando curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier com significância estatística determinada por *Log-Rank Test* e a dose letal média (DL₅₀) será determinado utilizando o *software* Graphpad.

vi. Etapas de execução do projeto

As atividades planejadas para os 12 meses de desenvolvimento deste projeto seguirão o cronograma a seguir:

ATIVIDADE	MÊS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Extração de RNA das culturas pneumocócicas (P, DPI e controles) e síntese de cDNA	X												
Padronização da técnica de qRT-PCR, utilizando as cepas controle de <i>S. pneumoniae</i>		X											
Quantificação da expressão dos genes de virulência presentes por qRT-PCR dos isolados selecionados (P, DPI e controles)		X	X	X	X								
Padronização dos ensaios <i>in vivo</i> em <i>G. mellonella</i> , utilizando as cepas controle de <i>S. pneumoniae</i>							X						
Determinação de virulência dos isolados de <i>S. pneumoniae</i> (P, DPI e controles) em modelo <i>in vivo</i> de <i>G. mellonella</i>							X	X	X	X	X		
Análise comparativa dos dados obtidos e tabulação dos resultados											X	X	
Produção científica												X	X
Prestação de contas financeira e relatório técnico-científico													X

vii. Produtos esperados como resultado a execução do projeto

Almeja-se a publicação de um artigo científico, em periódico indexado de impacto internacional na área da microbiologia (Qualis Capes A2), como principal produto da execução deste projeto. É prevista também: a) a participação em eventos científicos de relevância microbiológica, epidemiológica e em saúde pública, com apresentações orais e de pôsteres, e; b) a divulgação científica das publicações deste projeto, através de plataformas de redes sociais, como veículo de comunicação social universidade/comunidade.

A execução deste projeto também contribuirá com a formação de recursos humanos, de estudantes de graduação e pós-graduação, qualificando a atuação destes na área de estudo e diversos segmentos da área da saúde, aprimorando a assistência e atendimento à sociedade.

viii. Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

Os dados gerados por este estudo comparativo, entre *S. pneumoniae* isolados de portadores e de indivíduos com doença pneumocócica invasiva dos sorotipos não-vacinais contribuirão para o controle das doenças pneumocócicas e futuro desenvolvimento de novas vacinas, visto que nos últimos 15 anos o principal progresso na prevenção de infecções por *S. pneumoniae* tem sido a imunização com vacinas proteína-polissacarídeo conjugadas. Porém, novas estratégias de desenvolvimento de vacina sorotipo-independente, com formulações baseadas em proteínas, promoveriam cobertura contra todos os sorotipos pneumocócicos circulantes.

É de grande valia aprofundar os conhecimentos sobre fatores relacionados à virulência de *S. pneumoniae*, propostos neste projeto, visto que essa é uma área de intensa investigação científica, com promissor potencial para inovação e originalidade considerando que o mecanismo para desenvolvimento de infecção pneumocócica invasiva é ainda desconhecido. Além disso, este projeto inclui uma abordagem inovadora, com um modelo animal alternativo ainda pouco explorado na pesquisa de virulência e infecção de *S. pneumoniae*.

Serão utilizados como indicadores de avaliação do andamento da pesquisa a otimização das técnicas moleculares para análise da expressão de genes *S. pneumoniae* sorotipo-não-vacinais e o sucesso nos testes *in vivo* utilizando o modelo de *G. mellonella*. Quaisquer dos resultados obtidos após estas etapas terão importância para a comunidade científica e para os órgãos públicos que fazem a gestão da saúde nacional e internacionalmente.

Referências bibliográficas

Adriani KS, Brouwer MC, van de Beek D. Risk factors for community-acquired bacterial meningitis in adults. *Neth J Med*, 73:53-60, 2015.

- Alanee SRJ, McGee L, Jackson D, Chiou CC, Feldman C, Morris AJ, et al. Association of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with disease severity and outcome in adults: an international study. CID, 45:46-51, 2007.
- Andrade ALSS, Franco CM, Lamaro-Cardoso J, André MCDPB, Oliveira LLG, Kipnis A, et al. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. J Infect, 61:314-322, 2010.
- Blumental S, Granger-Farbos A, Moïsi JC, Soullié B, Leroy P, Njanpop-Lafourcade BM, et al. Virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. Comparison between African and French invasive isolates and implication for future vaccines. PlosOne, 10:e0133885, 2015.
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. The Lancet Infectious Diseases, 4:144-154, 2004.
- Brandileone MC, Andrade ALSS, Di Fabio JL, Guerra MLL. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. JID, 187:1206-1212, 2003.
- Christophe BL, Mott M, da Cunha G, Caierão J, D Azevedo P, Dias C. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* isolates from invasive disease in adults following the introduction of PCV10 in Brazil. J Med Microbiol, 67(5):687-694, 2018.
- Cruikshank HC, Jefferies JM, Clarke SC. Life style risk factors for invasive pneumococcal disease: a systematic review. BMJ Open, 4: e005224, 2014.
- Domingues CM, Verani JR, Montenegro Renoier EI, de Cunto Brandileone MC, Flannery B, de Oliveira LH, Santos JB, de Moraes JC; Brazilian Pneumococcal Conjugate Vaccine Effectiveness Study Group. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. Lancet Respir Med, 2:464-471, 2014.
- Evans BA, Rozen DE. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31:2653- 60; 2012.
- Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo MJM. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50: 59-73, 2002.
- Isaacman DJ, Fletcher MA, Fritzell B, Ciuryla V, Schranz J. Indirect effects associated with heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7; Prevnar). Vaccine, 25: 2420-2427, 2007.
- Mitchell A M, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. Clinical Microbiology Infection, 16:411-408, 2010.
- Neves FPG, Pinto TCA, Corrêa MA, Barreto RA, Moreira LSG, Rodrigues HG, et al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. BMC Infect Dis, 13:218, 2013.

- Sakai F, Talekar SJ, Klugman KP, Vidal JE*, for the Investigators Group. Expression of *Streptococcus pneumoniae* Virulence Related Genes in the Nasopharynx of Healthy Children. *PlosOne*, 8(6):e67147, 2013.
- Scotta MC, Veras TN, Klein PC, Tronco V, Polack FP, Mattiello R, Pitrez PM, Jones MH, Stein RT, Pinto LA. Impact of 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) on childhood pneumonia hospitalizations in Brazil two years after introduction. *Vaccine*, 32:4495-3399, 2014.
- Silva LN, Da Hora GCA, Soares TA, Bojer MS, Ingmer H, Macedo AJ, Trentin DS. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. *Scientific reports*, 7:2823, 2017.
- Simel B, Auranen K, Kaythy H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien K. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines*, 11:841-855, 2012.
- Tsai CJ, Griffin MR, Nuorti JP, Grijalva CG. Changing epidemiology of pneumococcal meningitis after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the United States. *Clin Infect Dis*, 46(11): 1664-72, 2008.
- Tyrell GJ, Lovgren M, Chui N, Minion J, Garg S, Kellner JD, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* pre- and post-seven valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000-2006. *Vaccine*, 27(27):3553-3560, 2009.
- Verani JR, Domingues CM, de Moraes JC; Brazilian Pneumococcal Conjugate Vaccine Effectiveness Study Group. Indirect cohort analysis of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine effectiveness against vaccine-type and vaccine-related invasive pneumococcal disease. *Vaccine*, 33:6145-6148, 2015.
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 16(6):355-367, 2018.
- Weycker D, Strutton D, Edelsberg J. Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. *Vaccine*, 28(31): 4955-4960, 2010.
- World Health Organization (WHO). New and Under-utilized Vaccines Implementation (NUVI). *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus). WHO 2012. Disponível em: <http://www.who.int/nuvi/pneumococcus/en/> (acessado em 15/05/2020).
- Yanagihara K, Kosai K, Mikamo H, Mukae H, Takesue Y, Abe M, Taniguchi K, Petigara T, Kaku M. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* associated with invasive pneumococcal disease among adults in Japan. *Int J Infect Dis*, 102: 260-268, 2021.
- Yoshioka CR, Martinez MB, Brandileone MC, Ragazzi SB, Guerra ML, Santos SR, et al. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr*, 87(1):70-75, 2011.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Título: Responsividade de monócitos de pacientes com COVID-19 a diferentes estímulos *in vitro* e avaliação do perfil inflamatório

Proponente: Claudia Elizabeth Thompson

Palavras-chave: SARS-CoV-2, marcadores celulares, linfócitos, monócitos

Resumo: Dentre os principais mecanismos de agravamento da COVID-19, destacam-se a resposta hiper-inflamatória aguda em conjunto a um estado de exaustão imunológica. Recentemente, nosso grupo também demonstrou aumento de translocação bacteriana em pacientes com a forma grave da doença e nossos dados sugerem a ocorrência de tolerância a lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Desta forma, acredita-se que a infecção aguda pelo SARS-CoV-2 possa comprometer a resposta imune do hospedeiro contra infecções secundárias em casos graves da doença. Este projeto tem como objetivo analisar em pacientes com diferentes graus de COVID-19, a resposta de monócitos a diferentes ligantes de Toll like receptors (TLRs). Para isso, células mononucleares de pacientes COVID-19 e controles saudáveis serão estimuladas com: controle solução salina, lipopolissacarídeo (ligante de TLR-4, 10 ng/mL), CpG ODN 2395 (ligante de TLR-9 classe C, 2,5 µM), R848 (ligante de TLR-7/8, 1 µg/mL) e Poly (I:C) (ligante TLR-3, 10 µg/mL; provável indução via dano mitocondrial) por 12 h (5% CO₂, 37°C). Avaliações de ativação celular, receptores de quimiocinas, expressão de subunidades de TLR e ativação do fator de transcrição nuclear-KappaB (NF-κB) serão realizadas em monócitos através de citometria de fluxo. Produção de citocinas serão avaliadas por meio da quantificação da concentração dos analitos em sobrenadante de cultura celular. Os resultados alcançados poderão auxiliar na compreensão da imunopatogênese, como também de alterações moleculares relacionadas a imunossupressão e/ou susceptibilidade a infecções secundárias no período pós-covid.

Dados do proponente e equipe

Instituições participantes: UFCSPA, Hospital São Camilo, Prefeitura de Esteio - RS.

Coordenadora: Dra. Claudia Elizabeth Thompson

Colaborações ou parcerias nacionais e internacionais já estabelecidas para a execução do projeto

Dr. Pedro R T Romão - UFCSPA

Dr. Liane Rotta - UFCSPA

Pós-Graduandos

Dr. Gilson Dorneles

Paula Coelho Teixeira (Mestranda do PPGCS da UFCSPA – bolsa edital COVID-19 CAPES)

Lucas de Lima Schipper (Mestrando do PPGCS da UFCSPA)

Carla Lucia Andretta Moreira Neves (PPGCS-UFCSPA) (Mestranda Projeto COVID-19)

Caracterização da proposta

1 INTRODUÇÃO

No mundo o número de casos de COVID-19 já se aproxima dos 500 milhões, com mais 6 milhões de óbitos em decorrência da pandemia e complicações associadas (<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>). Enquanto a maioria dos pacientes com COVID-19 (cerca de 80%) podem ser assintomáticos ou casos leves e não hospitalizados, cerca de 20% dos casos podem requerer atendimento hospitalar por apresentarem dificuldade respiratória, com dispnéia, hiperpnéia, saturação de O₂ de em torno de 93% e/ou infiltrado pulmonar, caracterizando a síndrome da angústia respiratória. Desses casos, aproximadamente 5% podem necessitar de suporte para o tratamento de insuficiência respiratória (suporte ventilatório), evoluindo para um estado crítico, com falência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos. Nos casos mais graves, os pacientes apresentam dificuldade de respirar, seguindo-se de pneumonia viral nos casos mais severos. A mortalidade geral tem sido de 2,3%, crescendo com a idade e chegando à 14,8% em indivíduos acima de 80 anos (WU; MCGOOGAN, 2020a).

Trata-se de uma doença complexa e que ainda necessita de estudos sobre a patogênese, espectro clínicos e novos biomarcadores para melhor compreensão tanto da doença aguda como da doença na fase crônica, chamada COVID longa. As principais anormalidades laboratoriais encontradas foram predominantemente, hipoalbuminemia, uma resposta hiperinflamatória conhecida como “tempestade de citocinas, e também elevação nos valores de proteína C reativa, LDH e VHS entre outros (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020). Também se demonstrou que a infecção aguda pelo SARS-CoV-2 impacta diretamente no fenótipo e na resposta inflamatória de monócitos e macrófagos, importantes células da imunidade inata, por meio da alteração em receptores de quimiocinas, ativação de fatores de transcrição intracelulares, capacidade de apresentação de antígeno, e atividade proliferativa (ANAEIGOUDARI et al., 2021). Além disso, monócitos periféricos apresentam uma elevação na taxa de geração de espécies reativas de oxigênio como resposta ao reconhecimento da proteína S do SARS-CoV-2 e são reconhecidamente responsáveis pela produção elevada de diversas citocinas pró-inflamatórias, de modo a contribuir de modo evidente para a condição hiper-inflamatória da COVID-19 (LAGE et al., 2022). Um dos primeiros aspectos imunológicos caracterizados na infecção pelo SARS-CoV-2 foi a importância da imunidade inata para ação antiviral (CARVALHO et al., 2021) com destaque para o papel do IFN-tipo I. No entanto, a condição imune durante a COVID-19 grave permanece de certo modo incerta, com destaque para uma resposta imune

exagerada mediada por hipercitocinemia que induz lesão pulmonar, dano multiórgão e um estado de pró-coagulação sistêmico (TAY et al., 2020). Por outro lado, uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias pode induzir um estado de imunocolapso e resposta imune ineficaz que predispõe o hospedeiro a infecções secundárias (HOTCHKISS et al., 2013). Este estado de imunoparalisia pode reduzir a capacidade de reconhecimento de patógenos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLR), em células inatas como monócitos, a apresentação de antígeno, e outras atividades funcionais contra bactérias e fungos (HOTCHKISS et al., 2013; COLANTUONI et al., 2020). De fato, dados recentes apontam para uma elevada taxa de coinfeções durante a hospitalização de casos graves de COVID-19 (GARCIA-VIDAL et al., 2021; MUSSUZA et al., 2021). Nosso grupo recentemente demonstrou que pacientes COVID-19 graves não-sobreviventes apresentaram aumento significativos nos marcadores de translocação microbiana (CD14 solúvel e lipopolissacarídeo bacteriano), associada a uma forte ativação monocítica (TEIXEIRA et al., 2021). A translocação microbiana também está associada a sintomas gastrointestinais como a diarreia e alteração nos níveis sistêmicos de nucleotídeos baseados em adenina (DORNELES et al., 2021). Nesse sentido, pretendemos aprofundar nossos achados, avaliando a resposta *in vitro* de monócitos de pacientes com COVID-19 a diferentes agonistas de TLR (um dos objetivos dessa proposta), bem como a capacidade antifúngica e antibacteriana de monócitos de indivíduos controles na presença de plasma de pacientes com COVID grave (estudo em andamento), uma vez que é crucial investigar a possível imunossupressão no período pós-COVID e a gravidade dessas doenças subsequentes a infecção por SARS-CoV-2.

2 JUSTIFICATIVA

A motivação para a realização da pesquisa no município de Esteio-RS, provém da atuação da mestranda do PPGCS da UFCSPA como Enfermeira no Hospital Municipal de Esteio-RS e seu envolvimento em atividades junto à Secretaria de Saúde para o enfrentamento da pandemia da COVID-19. O Hospital foi um parceiro importante da Vigilância em Saúde no acolhimento dos sintomáticos respiratórios, na avaliação e diagnóstico da COVID-19. Além disso, observações anedóticas em prontuários de pacientes internados com COVID-19 demonstraram um aumento na taxa de coinfeções bacterianas ou fúngicas, sugerindo um estado de imunossupressão. Nesse sentido procuraremos investigar possíveis marcadores de tolerância, exaustão e outras disfunções em células coletadas e armazenadas desses pacientes conforme já foi anteriormente previsto no TCLE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar em monócitos de pacientes com COVID-19 moderada, grave e crítica alterações na expressão de receptores de reconhecimento de padrões, expressão de checkpoints imunológicos e perfil inflamatório em resposta a agonistas de *Toll like receptors in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a expressão de NF-kB 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 após estimulação *in vitro* com diferentes ligantes de receptores do tipo Toll.
- II. Avaliar a expressão de TLR-3, TLR-4, TLR-9 em monócitos de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados após estimulação *in vitro* com diferentes ligantes de receptores do tipo Toll.
- III. Avaliar o potencial de membrana mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose em monócitos de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados após estimulação *in vitro* com diferentes ligantes de receptores do tipo Toll.
- IV. Avaliar a expressão de PD-1, PD-L2 e CTLA-4 em monócitos de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados após estimulação *in vitro* com diferentes ligantes de receptores do tipo Toll.
- V. Avaliar a produção de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- α no sobrenadante de cultivo de células mononucleares periféricas de pacientes com COVID-19 e indivíduos controles não infectados após estimulação *in vitro* com diferentes ligantes de receptores do tipo Toll.
- VI. 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 por meio de estudos de correlação e regressão multivariada.

4. METODOLOGIA

Metodologia

Considerações éticas: Este projeto de pesquisa atenderá a Resolução 466/12 e já teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (CAAE 38886220.0.0000.5345) conforme parecer em anexo. Para esta etapa houve readequação do título de acordo com os objetivos anteriormente aprovados no projeto original.

Biossegurança: Os estudos dos biomarcadores da infecção pelo coronavírus serão realizados no laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFCSPA, observando-se todas as recomendações de biossegurança. Todos os procedimentos experimentais serão realizados por profissionais com treinamento e as manipulações serão feitas em cabine de segurança biológica classe II, utilizando máscaras, touca, jaleco 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 responsável pela coleta e incineração de resíduos dos laboratórios da UFCSPA.

População em estudo: Em etapa anterior foram selecionados pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 e indivíduos controles do município de Esteio-RS. O recrutamento e as coletas sanguíneas (para

este estudo) ocorreram de março a setembro de 2021. Trata-se de um projeto de pesquisa do tipo caso-controle onde amostras de sangue periférico foram obtidas de indivíduos diagnosticados com infecção pelo SARS-CoV-2 e um grupo controle não infectado pareado por idade e sexo. A amostra foi composta de 25 pacientes com doença moderada, 11 casos graves e 9 casos classificados como críticos. O grupo controle é formado por 15 participantes não infectados por SARS-CoV-2.

Crítérios 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 clínicos e de exames complementares de pacientes com COVID-19: Os seguintes dados já foram obtidos da ficha clínica de pacientes internados com COVID-19 do Hospital São Camilo ESTEIO/RS: a) Informações gerais: idade, sexo, peso, altura, presença de comorbidades, resultados do RT-PCR SARS-CoV-2, dias de internação; b) Sinais e sintomas; c) Exames complementares: Rx Tórax: consolidações, Rx Tórax: infiltrado interst., TC Tórax vidro fosco mult., Hemograma: Eritrócitos, Anemia: Hb < 9, Hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW, Leucopenia < 4.000, Leucocitose > 10.000, Linfopenia < 1000, Plaquetopenia < 100.000, Neutrófilos bastões e segmentados, Eosinófilos, Basófilos, Monócitos, Uréia, LDH, CKNAC, CKMB, LACTATO, Proteína C Reativa, LDH e Glicemia na triagem; d) Medicamentos utilizados; e) falência múltipla de órgãos/Sepse; f) Desfecho: cura ou óbito.

Para indivíduos do grupo controle, logo após a leitura e assinatura do TCLE, os voluntários preencheram uma ficha de dados cadastrais para o projeto onde constam perguntas pessoais, doenças anteriores e uso de medicamentos, entre outros.

Obtenção de células mononucleares do sangue periférico: De todos os pacientes e voluntários controles foram coletados 8 mL de sangue venoso através de punção da veia antecubital em tubos contendo EDTA. O sangue foi utilizado para separação de células mononucleares periféricas utilizando-se Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, EUA) conforme descrito por Bicalho et al (1980). e após separação, as células mononucleares periféricas foram criopreservadas em nitrogênio líquido e serão utilizadas para as análises aqui propostas após descongelamento e verificação da viabilidade.

Estimulação *in vitro* de PBMCs com agonistas de TLRs: As alterações imunológicas no período de infecção aguda do SARS-CoV-2 pode induzir alterações na resposta imune contra outros patógenos, alterando o tipo e magnitude da produção de diversas citocinas após estimulação de receptores da imunidade inata. Para verificar esta hipótese, PBMC dos pacientes com COVID e controles saudáveis serão plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL, em meio RPMI 1640 suplementadas com 10% de soro fetal bovino, em placas de 12 poços para um volume final de 1mL/poço. As células serão estimuladas com diversos ligantes de diferentes receptores do tipo Toll: controle solução salina, lipopolissacarídeo (ligante de TLR-4, 10 ng/mL), CpG ODN 2395 (ligante de TLR-9 classe C, 2,5 μ M), R848 (ligante de TLR-7/8, 1 μ g/mL) e Poly (I:C) (ligante TLR-3, 10 μ g/mL; provável indução via dano mitocondrial) por 12 h (5% CO₂, 37°C).

Ao final da incubação, as amostras serão centrifugadas, e o sobrenadante será armazenado em microtubos em freezer -80°C. A figura 1 sumariza o desenho experimental proposto no presente projeto.

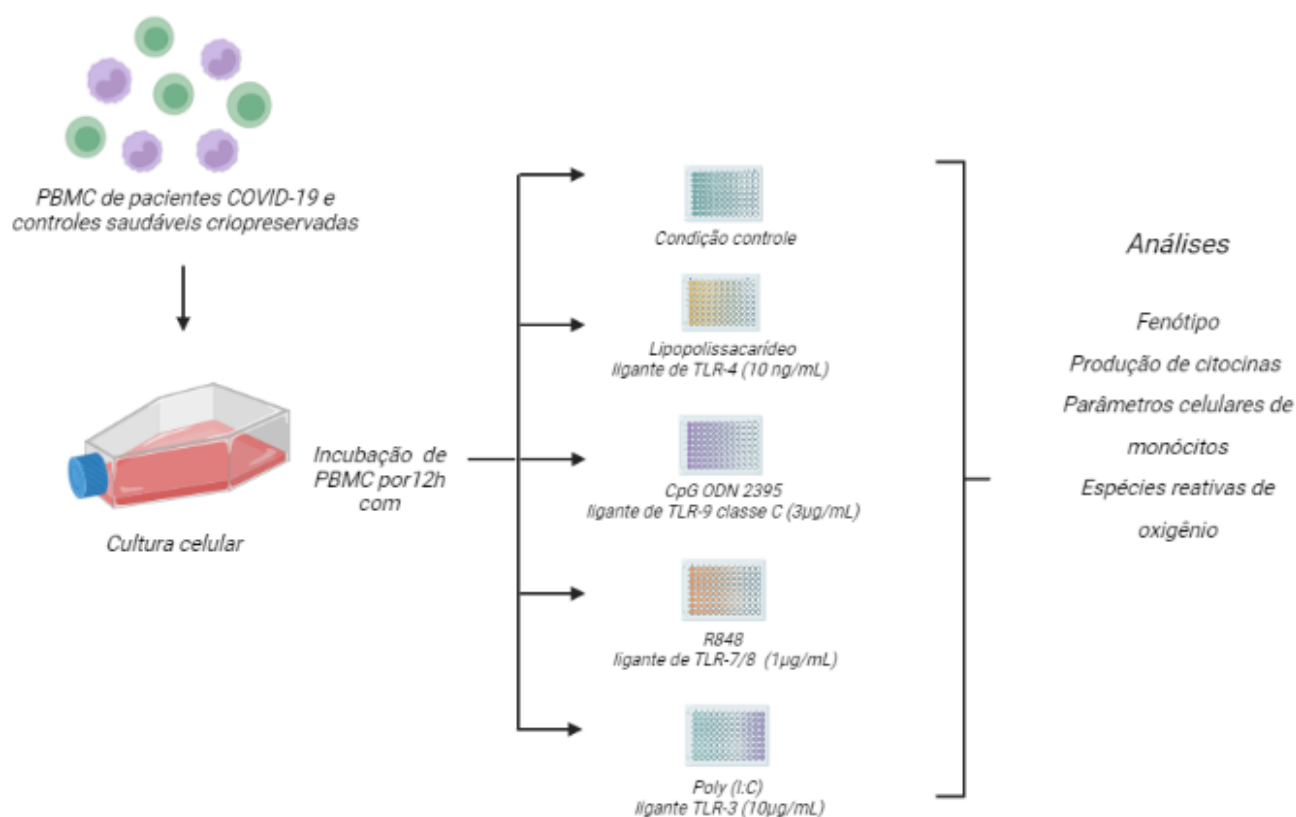


Figura 1. Desenho experimental da estimulação de células mononucleares periféricas (PBMC) com diferentes ligantes de receptores do tipo Toll. PBMCs de pacientes com COVID moderada, grave e críticos e controles saudáveis serão estimuladas com diferentes ligantes de TLR durante 12 horas. Ao final da incubação, as amostras serão centrifugadas, e o sobrenadante será armazenado em freezer -80°C e as células avaliados por imunofenotipagem.

Imunofenotipagem e ativação celular

Células mononucleares do sangue periférico (4×10^5 células/mL) serão marcadas com anticorpos monoclonais contra diferentes marcadores de superfície: anti-CD14, anti-CD16, anti-CD69, anti-HLA-DR, anti-TLR3, anti-TLR4, anti-TLR-9, anti-CD197, anti-CD194, anti-CD192 em um procedimento de marcação de três cores associados a fluorocromos específicos. A combinação de anticorpos monoclonais será utilizada para a detecção dos seguintes subtipos celulares (Tabela 1):

Tabela 1. Estratégia de combinação de anticorpos e respectivos fluocromos para análise de citometria.

Subpopulações de monócitos e ativação celular	
CD14+	APC
CD16+	Fitc
CD69+	Pe
HLA-DR+	Percp-Cy5.5
Receptores de quimiocinas	
CD14+	APC
CCR2+	BB515
CCR4+	PE-Cy7
CCR7+	PE
Receptores do tipo Toll	
CD14+	APC
CD16+	FITC
TLR-4	Percp
TLR-9	Pe
Expressão de <i>checkpoints</i> imunológicos	
CD14+	PACIFIC AZUL
PD-1	APC
PD-L2	BV421
CTLA-4	Pe
Marcação intracelular	
CD14+	PACIFIC AZUL

CD16+	FITC
NF-κB	PE-CY7

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 por meio 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 ressuspensas em solução tampão específico. A marcação será realizada com anti-phospho-p65 (NF-κB) – PERCP-Cy5.5. Os dados de imunofenotipagem serão adquiridos utilizando o software BD FACSDiva em FACSCanto II (BD Bioscience, EUA). Para isso, Forward-Scatter (FSC) versus Side-Scatter (SSC) será utilizado para identificação da região de monócitos baseado em seu tamanho e granulosidade, sendo adquiridos 50.000 eventos por análise. Em seguida, gráficos de distribuição pontual para combinação dos fluorocromos serão utilizados para quantificar a frequência das células.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio por monócitos estimulados: A análise do potencial de membrana mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio em 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 citocinas: Serão dosadas as citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IFN-α serão analisadas por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) seguindo as recomendações do fabricante (ThermoFisher, EUA) no sobrenadante da cultura celular.

Análise estatística: A normalidade dos dados será testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e os dados serão apresentados através de média ± 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.

Cronograma para 12 meses

Atividades	Meses (1-12)
Recrutamento de pacientes e coleta de material biológico	Já realizada
Coleta de dados clínicos e de exames complementares de pacientes com COVID-19 da ficha	Já

clínica COVID e dados eletrônicos do sistema, prontuários	realizada
Imunofenotipagem de células periféricas de pacientes e controles não infectados	1-8
Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio, potencial de membrana mitocondrial em monócitos e frequência de células em apoptose, produção de citocinas	1-8
Avaliar as principais alterações laboratoriais através dos exames complementares de pacientes e correlacionar com gravidade e biomarcadores imunológicos e de inflamação	6-10
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	6-10
Análise estatística – resultados	1-10
Redação de artigos/envio para publicação	10-12
Preparo de relatório	12
Orientação de alunos (Pós-graduação)	1-12

Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Os principais resultados esperados são:

- Geração de novos conhecimentos que auxiliarão na elucidação dos mecanismos moleculares de possível supressão/tolerância antigênica da resposta de monócitos de pacientes com COVID grave (hipótese em estudo pelo nosso grupo, complementada por outras análises aqui não relatadas por questões temporais/financeiras).
- Formação de recursos humanos: Profissionais da área da Saúde (Hospital São Camilo) e de Pós-Graduação estarão envolvidos no desenvolvimento, discussão dos resultados desta pesquisa, fortalecendo a relação Universidade e com o SUS (Hospital São Camilo).
- Produção de artigo científico a ser publicado em revista indexada e internacional de alto impacto.
- Impacto social: geração de conhecimentos que irão auxiliar no entendimento da patogênia.

Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão.

De modo geral este estudo irá contribuir para:

- Geração de novos conhecimentos que auxiliarão na elucidação dos mecanismos moleculares de possível supressão/tolerância antigênica da resposta de monócitos de pacientes com COVID grave (hipótese em estudo pelo nosso grupo, complementada por outras análises aqui não relatadas por questões temporais/financeiras).
- 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**

	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
CUSTEIO			
Anticorpo monoclonal cd16 fitc humano	1	1.484,19	1.484,19
Reag imunol tlr9 pe hu 100tst eb72-1665	1	2.079,00	2.079,00
Anticorpo nf-kpab p65 (ps529) pe-cy7 50t	1	527,18	527,18
Hu cd14 pacific azul mab 0.1mg m5e2 ftm	1	801,93	801,93
TLRL-PIC - POLY (I:C) 10mg - Invivogen	1	2470,40	2470,40
Tlr1-2395- ODN 2395 - TRL- 9 - 200ug Invivogen	1	2.454,66	2.454,66
Anticorpo cd273 hu bv421 mih18 100t	1	1.891,16	1.891,16
Rodamina 123	1	209,00	209,00
TOTAL			R\$ 11.978,52

*Todos os demais itens de custeio necessários para a execução da proposta (aqui não descritos) já foram adquiridos com verba PROAP e recursos FAPERGS dos pesquisadores colaboradores.

REFERÊNCIAS

ANAEIGOUDARI, Akbar, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Role of the Main Components of the Innate Immune System. **Inflammation**, v.44, p.2151-2169, 2021.

BICALHO, Helena M.s.; GONTIJO, Cristiano M.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A.. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 115-116, jan. 1981. Elsevier BV.

CARVALHO, T., Krammer, F. & Iwasaki, A. The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights. **Nat Rev Immunol** 21, 245–256 (2021).

COLANTUONI A, et al. COVID-19 Sepsis and Microcirculation Dysfunction. **Front Physiol**;11, 2020.

DORNELES, Gilson P, et al. Alterations in CD39/CD73 Axis of T cells associated with COVID-19 severity. **MedRxiv**, 2021. DOI: 10.1101/2021.09.18.21263782.

GARCIA-VIDAL C, et al. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. **Clin Microbiol Infect**; v.27, p.83-88, 2021.

HOTCHKISS RS, et al. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nat Rev Immunol**;13(12):862, 2013.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

LAGE SL, et al. Persistent Oxidative Stress and Inflammasome Activation in CD14 high CD16 - Monocytes From COVID-19 Patients. **Front Immunol**; v. 14, p.799558, 2022.

LI, Qun et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. **New England Journal of Medicine**, 2020.

MUSSUZA JS, et al. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 26, 2021.

RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J. et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 101623, 2020b.

TAY MZ, et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**;20(6):363-374, 2020.

TEIXEIRA Paula C, et al. Increased LPS levels coexist with systemic inflammation and result in monocyte activation in severe COVID-19 patients. **Int Immunopharmacol**, v.100, p.108125, 2021.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **Jama**, 2020a.

UNIVERSIDADE FEDERAL DAS CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
EDITAL nº 10/2022/PROPPG
PROGRAMA DE FOMENTO A REALIZAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA NA
UFCSPA

**Investigação do papel das ubiquitina-ligases MARCH-1 e MARCH-8 na
contribuição da progressão tumoral no modelo de câncer de mama**

Pesquisador responsável: Dr^a Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

RESUMO

MARCH ligases são enzimas da família das E3 ligases, responsáveis por ubiquitinar proteínas e direcioná-las para a degradação pelo proteassoma. A família MARCH é composta por 11 membros, que compartilham uma estrutura com um domínio RING-CH e domínios transmembrana. Dois desses membros, MARCH1 e MARCH8, possuem expressão elevada durante os processos de progressão, migração e invasão tumoral, em diferentes modelos experimentais e biópsias de pacientes. Ambas as proteínas possuem a capacidade de ubiquitinar as moléculas MHC-II e CD86, que constituem, respectivamente, o primeiro e o segundo sinais fornecidos às células T virgens pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). Tanto MARCH1 quanto MARCH8 realizam a ubiquitinação de moléculas MHC-II, que desempenham um papel importante na indução de células T reguladoras (Treg), que modulam negativamente a função das células T. As células Treg são decisivas para o estabelecimento de um microambiente favorável ao crescimento tumoral. Juntos, esses achados sugerem que MARCH1 e MARCH8 promovem o crescimento de tumores por meio de um mecanismo imunológico. Este trabalho tem como objetivo investigar se MARCH1 e MARCH8 possuem um papel durante o crescimento tumoral no modelo de câncer de mama ao induzir Treg no microambiente.

Palavra-chaves: ubiquitinação, células T regulatórias, câncer de mama, microambiente tumoral, modelos *in vivo*

EQUIPE E COLABORADORES

O projeto é coordenado pela Dra. Cristina Bonorino, do departamento de Ciências Básica da Saúde, junto com as alunas de doutorado Júlia Crispim da Fontoura, Karina Rodrigues Lima e os pós-doutores Dra. Ane Wichine Acosta Garcia e Dr. Thiago Fazolo. Para este projeto temos uma parceria estabelecida com o Dr. Thiago Borges, atualmente no Massachusetts General Hospital (MGH - Boston, EUA).

CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

Modificações pós-traducionais são muito importantes para um bom funcionamento de células. Mais especificamente, a adição de ubiquitinas em uma proteína pode induzir mudanças na localização celular, estabilidade e atividade biológica de proteínas transmembranas, logo, podendo ter implicações no controle de respostas imunológicas (1). Em geral, essas mudanças levam a degradação da proteína-alvo (2,3), ou a sinalização celular (4,5). Dentre diversas famílias que realizam esse processo, uma com grande importância é a família das MARCH (Membrane-Associated RING-CH) E3 ligases de ubiquitina. Essas proteínas apresentam como um de seus principais papéis a regulação de respostas imunológicas, na qual atuam catalisando a poliubiquitinação de vários receptores imunes (6).

As proteínas MARCH1 e MARCH8, dois componentes da família MARCH, possuem tamanho e estrutura similares, sendo agrupadas juntas filogeneticamente, apresentando uma similaridade de 71% em nível protéico (7). Ambas possuem a capacidade de ubiquitinar moléculas-alvo semelhantes (8), como o receptor de transferrina (TfR) (9) e o receptor de morte TRAIL-R1 (10). Em um contexto de câncer, já foi observado que MARCH1 e MARCH8 podem apresentar ações tanto pró (11) quanto anti-tumorais (12), dependendo do tipo tumoral abordado. Considerando-se tumores de mama, alguns trabalhos mostram que a ubiquitinação de CD44 (13) e TRAIL-R1 (14) por MARCH8 pode ter associação com progressão tumoral. Pouco se sabe, todavia, sobre quais mecanismos pelos quais essas MARCHs levam a tais

alterações levando a progressão tumoral. Dessa forma, há uma necessidade de mais estudos para elucidar o papel de MARCH1 e MARCH8 nesse contexto.

Um possível mecanismo é através da ubiquitinação do Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (15,16) e do CD86 (17), em que tanto MARCH1 quanto MARCH8 possuem um papel crucial. Essa modulação de MHC de classe II em células apresentadoras de antígenos influencia diretamente a ativação de células T (18). Mais especificamente, já foi observada uma relação da expressão de MARCH ligases no desenvolvimento e proliferação de células Treg. Oh e colaboradores, observaram que uma deficiência na expressão de MARCH1 resultou em redução no número de células Treg tímicas, e ao analisar células dendríticas knockout para MARCH1 ou sem a capacidade de ubiquinar MHC-II, essas DCs falharam em gerar células Treg antígeno específico tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sugerindo então que a ubiquitinação de MHC-II mediada por MARCH1 é necessária para a produção de células Treg (19). Outro estudo observou que a falta de ubiquitinação na molécula de MHC-II não possui impactos no desenvolvimento de células T CD4+, no entanto é importante para o desenvolvimento de Treg (20). Esses estudos sugerem um papel importante da MARCH1 e a ubiquitinação da molécula de MHC-II no desenvolvimento das células Treg. No entanto, em nenhum trabalho foi analisada a importância da MARCH1 ou MARCH8, no microambiente tumoral, em ubiquitar as moléculas de MHC-II e CD86 dessa forma estimulando o desenvolvimento de Tregs e consequentemente a progressão tumoral.

OBJETIVO GERAL

Investigar o papel biológico de MARCH1 e MARCH8 em células tumorais no modelo de câncer de mama, murino e humano, buscando conhecimento na progressão tumoral e na interação câncer-sistema imune.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a cinética de expressão de MARCH1 e MARCH8 no modelo de câncer de mama triplo negativo murino 4T1;
2. Avaliar crescimento tumoral *in vitro* de células knock-out para MARCH1 e MARCH8 em células de câncer de mama murino (4T1) e humano (MCF-7 e MDA-MB-231);
3. Investigar *in vivo* a progressão tumoral, no modelo de mama 4T1 MARCH1^{-/-} e 4T1 MARCH8^{-/-};

METODOLOGIA

Resultados preliminares no modelo de melanoma metastático, utilizando as células B16F10-OVA (edital nº 04/2021/PROPPG), nos mostraram que de acordo com o crescimento do tumor há o aumento da expressão proteica das ubiquitina-ligases MARCH1 e MARCH8. Ao analisarmos as populações imunológicas do microambiente tumoral, há um aumento da população de células T regulatórias (Treg - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), diminuição de células dendríticas (DCs - CD11c⁺) e diminuição do marcador de ativação CD86 nas DCs durante esse crescimento. Em adição, ao separarmos populações de origem hematopoiéticas (CD45⁺) das células tumorais (CD45⁻), observamos a expressão de RNA mensageiro (mRNA) e proteica na porção das células CD45⁺, sugerindo que no microambiente tumoral a expressão de MARCH1 e MARCH8 se encontram principalmente nas células imunológicas, por mais que nas condições *in vitro* a linhagem B16F10 OVA expresse ambas as proteínas.

No entanto, devido à heterogeneidade dos diferentes tipos de tumores, decidimos analisar se esses resultados observados em melanoma também ocorrem em outros modelos. Em artigo por Chen *et al.*, foi visto que MARCH8 está associado com câncer de mama (13). Dessa forma, decidimos avaliar a importância do sistema imune e da expressão dessas ubiquitina-ligases em modelo tumoral de mama. Em adição, como forma de aumentar a translação desses experimentos, pretendemos

utilizar também linhagens de câncer de mama humano, comprovando que os resultados obtidos em modelo murino também podem ser observados em modelo humano.

Com o intuito de avaliar a expressão de MARCH ligases em células do microambiente tumoral realizaremos um estudo cinético, no modelo murino de câncer de mama triplo negativo com a linhagem 4T1. Os camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas serão injetados com 1×10^6 de células na terceira mama do lado esquerdo, pela via subcutânea. Os animais serão eutanasiados em intervalos de 10, 15, 20 e 25 dias após a injeção tumoral, seguido da retirada do tumor. Avaliaremos a expressão de MARCH1 e MARCH8 no tumor por qPCR e western blot. O volume tumoral será medido todos os dias com auxílio de paquímetro, utilizando a fórmula $V \text{ (mm}^3\text{)} = d^2 \times D \times 0.5$ em que d = diâmetro menor, D = diâmetro maior. Os primers utilizados serão March1 forward (AACCTCACTATGAGCAACATGAC), March1 reverse (GAGCTGTCCCTGTCGTTGG), March8 forward (TTCTCAGGATGCCATTTCTGC) e March8 reverse (GTTGCTTGGATGACTCATGGAA). Para análise de proteínas, por western blot, serão utilizados anticorpos anti-MARCH1 mouse (PA5-103815 - Invitrogen) e anti-MARCH8 (PA5-20632 - Invitrogen). Como controles serão utilizados primers para o gene murino Gapdh e anticorpo para proteína murina anti-actina.

Similar ao ensaio realizado no modelo de melanoma metastático, queremos analisar em qual porção celular há a expressão de MARCH1 e MARCH8 no microambiente tumoral. Para determinar quais células do microambiente tumoral expressam MARCH1 e MARCH8, camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas serão injetados com 1×10^6 de células 4T1, na terceira mama do lado esquerdo pela via subcutânea. Após 15 dias de injeção das células, os animais serão eutanasiados seguido da retirada do tumor. Para analisar a expressão de MARCH1 e MARCH8, realizaremos separação de uma suspensão unicelular das células do microambiente tumoral, separando as CD45⁺ (origem hematopoiética) das CD45⁻ (células tumorais), por coluna magnética por seleção positiva utilizando beads CD45 (Miltenyi - EUA). Analisaremos a expressão proteica de MARCH1 e MARCH8 nas populações isoladas,

por western blot. Em adição, a expressão de CD86 e MHC-II nas células dendríticas e a proporção de Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) do infiltrado tumoral será analisada por citometria de fluxo.

Com a finalidade de investigar o papel da de MARCH1 e MARCH8 em células tumorais na progressão e na composição do infiltrado tumoral, analisaremos o efeito da injeção das células 4T1 que não possuem a expressão das proteínas mencionadas. Utilizaremos a técnica de CRISPR-Cas para realizar o *knockout* gênico para MARCH1 e MARCH8. As linhagens 4T1 MARCH1^{-/-} e 4T1 MARCH8^{-/-} serão geradas utilizando o reagente Lipofectamine 3000 (ThermoFisher - EUA) em combinação com os plasmídeos March1 double nickase e March8 double nickase (Santa Cruz - EUA). Como controle utilizaremos um plasmídeo sem alvo específico (*Scramble*, Santa Cruz - EUA). Esses plasmídeos possuem o gene da *green-fluorescent protein* (GFP), facilitando a confirmação, e o gene de resistência ao antibiótico puromicina, que auxiliará na seleção apenas de células transfectadas. Como forma de confirmar a presença proteica de MARCH1 e MARCH8, realizaremos a técnica de western blot. Após o desenvolvimento das linhagens celulares, os animais BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas serão inoculados com 1x10⁶ células de 4T1 MARCH1^{-/-} ou 4T1 MARCH8^{-/-} ou 4T1 Scramble na terceira mama do lado esquerdo pela via subcutânea. Durante o crescimento tumoral iremos analisar o peso dos animais e o volume tumoral, por até 20 dias. Como análises iremos avaliar o peso do tumor, o perfil imunológico por citometria de fluxo, focando na proporção de Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) e expressão de CD86 e MHC-II nas células dendríticas do infiltrado tumoral, por citometria de fluxo. Em adição, a expressão proteica de MARCH1 e MARCH8 e ubiquitinação por western blot também será analisada.

De forma a melhorar a translação dos dados obtidos nesse projeto para a clínica, serão realizados experimentos em linhagem de câncer de mama humano. Assim, poderemos confirmar que os alvos de ubiquitinação de MARCH1 e MARCH8 vistos em modelo murino também são encontrados em humanos. Para isso, faremos *knockout* de MARCH1 e MARCH8 nas linhagens tumorais de mama MCF-7 (ER/PR^{+/+} e

Her2⁺) e MDA-MB-231 (triplo negativo), utilizando Lipofectamine 3000 (ThermoFisher - EUA) em combinação com os plasmídeos de MARCH1 e MARCH8 double nickase (Santa Cruz - EUA). A confirmação do sucesso da transfecção ocorrerá por análise de expressão de mRNA por qPCR utilizando-se os primers para MARCH1 forward (CTAACTTGTTTCTCCAGGCAAG), MARCH1 reverse (CTCTCTTCATCCCCTTCGCA), MARCH8 forward (TGCTCTGACGAGATGGGAGA), MARCH8 reverse (AGATCCTGCAGACATCCCCT), enquanto expressão proteica se confirmará por western blot utilizando anticorpos anti-MARCH1 (PA5-103815 - Invitrogen) e anti-MARCH8 (PA520632 - Invitrogen). Após o desenvolvimento dessas linhagens, serão realizados experimentos caracterizando essas células em relação a crescimento tumoral por contagem por azul de tripano (LGC - Brasil) e Ki-67 (BD Biosciences), e viabilidade por capacidade metabólica utilizando o ensaio de resazurina (Invitrogen - EUA). Com esses parâmetros estabelecidos faremos a avaliação de capacidade de ubiquitinação por essas células por western blot e imunoprecipitação.

Com esses experimentos no modelo de mama esperamos complementar os resultados observados no modelo de melanoma, quanto ao papel das ubiquitin-ligases MARCH1 e MARCH8 na progressão tumoral e entender o envolvimento dessas proteínas no desenvolvimento de Treg no microambiente. Em adição, ao utilizar linhagens de tumor de mama humano poderemos analisar os dados de forma translacional.

O uso de animais neste projeto está aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 275/20 e parecer 721/20. E os principais reagentes para transfecção, plasmídeos CRISPR-Cas9 murino, anticorpos e primers já se encontram disponíveis e padronizados no nosso laboratório.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividade (Cronograma para 12 meses (2021/2022))	Outubro (2022) - Abril (2023)	Mai (2023) - Outubro (2023)
<i>Knockout</i> de MARCH1 e MARCH8 em 4T1, MCF-7 e MDA-MB-231	X	X
Caracterização de linhagens knock-out para MARCH1 e MARCH8	X	
Cinética 4T1 <i>in vivo</i>	X	
Cinética 4T1 MARCH1 ^{-/-} e 4T1 MARCH8 ^{-/-} e análise de células T regulatórias		X
Redação de artigo e relatórios		X

PRODUTOS ESPERADOS

1. Determinação da contribuição de diferentes E3 ubiquitina-ligases da família MARCH para a progressão tumoral em tumor de mama;
2. Evidência de que o mecanismo é imunológico e se dá por via de células Treg;
3. Evidência que o perfil observado no modelo murino se conversa com o modelo humano;
4. Publicação de ao menos um artigo em revista científica de impacto Qualis A1;

POTENCIAL IMPACTO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos neste projeto irão fornecer instrumentos importantes no conhecimento do papel das E3 ubiquitina-ligase MARCH1 e MARCH8 na modulação de células T regulatórias no infiltrado tumoral, em um modelo murino, e inicial análises em modelo humano. Em adição, no futuro, poderá auxiliar na geração de conhecimento para o desenvolvimento de possíveis novos candidatos a fármacos para uso em oncologia, através de desenvolvimento de ligantes para bloquear a ação das mesmas.

REFERÊNCIAS

1. Ishido S, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M. An E3 ubiquitin ligase family for MHC molecules. *Curr Opin Immunol*. 2010;82(8):702–9.
2. Farrawell NE, McAlary L, Lum JS, Chisholm CG, Warraich ST, Blair IP, et al. Ubiquitin Homeostasis Is Disrupted in TDP-43 and FUS Cell Models of ALS. *iScience*. 2020 Nov 20;23(11). DOI: 10.1016/j.isci.
3. Song X, Liu S, Wang W, Ma Z, Cao X, Jiang M. E3 ubiquitin ligase RNF170 inhibits innate immune responses by targeting and degrading TLR3 in murine cells. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(8):865–74. DOI: 10.1038/s41423-019-0236-y
4. Huye LE, Ning S, Kelliher M, Pagano JS. Interferon Regulatory Factor 7 Is Activated by a Viral Oncoprotein through RIP-Dependent Ubiquitination. *Mol Cell Biol*. 2007;27(8):2910–8.
5. Zhang X, Min X, Wang S, Sun N, Kim KM. Mdm2-mediated ubiquitination of β -arrestin2 in the nucleus occurs in a G β γ - and clathrin-dependent manner. *Biochem Pharmacol*. 2020 Aug 1;178. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114049
6. Samji T, Hong S, Means RE. The Membrane Associated RING-CH Proteins: A Family of E3 Ligases with Diverse Roles through the Cell. *Int Sch Res Not*. 2014;2014:1–23. DOI: 10.1155/2014/637295
7. Lin H, Li S, Shu HB. The Membrane-Associated MARCH E3 Ligase Family: Emerging Roles in Immune Regulation. Vol. 10, *Frontiers in immunology*. NLM; 2019. p. 1751.
8. Bauer J, Bakke O, Morth JP. Overview of the membrane-associated RING-CH (MARCH) E3 ligase family. *N Biotechnol*. 2017;38:7–15. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.12.002
9. Fujita H, Iwabu Y, Tokunaga K, Tanaka Y. Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J Cell Sci*. 2013;126(13):2798–809.
10. Van De Kooij B, Verbrugge I, De Vries E, Gijzen M, Montserrat V, Maas C, et al. Ubiquitination by the membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) ligase controls steady-state cell surface expression of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptor 1. *J Biol Chem*. 2013;288(9):6617–28.
11. Xie L, Dai H, Li M, Yang W, Yu G, Wang X, et al. MARCH1 encourages tumour progression of hepatocellular carcinoma via regulation of PI3K-AKT- β -catenin pathways. *J Cell Mol Med*. 2019;23(5):3386–401.
12. Su Y, Feng W, Zhong G, Ya Y, Du Z, Shi J, et al. ciRs-6 upregulates March1 to suppress bladder cancer growth by sponging miR-653. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(23):11202–23.
13. Chen W, Patel D, Jia Y, Yu Z, Liu X, Shi H, et al. MARCH8 Suppresses Tumor Metastasis and Mediates Degradation of STAT3 and CD44 in Breast Cancer Cells. *Cancers*. 2021 May 22;13(11):2550.
14. Zhang S, Chen Z, Shi P, Fan S, He Y, Wang Q, et al. Downregulation of death receptor 4 is tightly associated with positive response of EGFR mutant lung cancer to EGFR-targeted therapy and improved prognosis. *Theranostics*.

2021;11(8):3964–80.

15. Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Aoki M, Goto E, Mito M, Uematsu M, et al. Inhibition of MHC Class II Expression and Immune Responses by c-MIR. *J Immunol.* 2006;177(1):341–54.
16. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, et al. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol.* 2008;9(11):1244–52.
17. Goto E, Ishido S, Sato Y, Ohgimoto S, Ohgimoto K, Nagano-Fujii M, et al. c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14657–68.
18. Zhu B, Zhu L, Xia L, Xiong Y, Yin Q, Rui K. Roles of Ubiquitination and Deubiquitination in Regulating Dendritic Cell Maturation and Function. Vol. 11, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2020.
19. Oh J, Wu N, Baravalle G, Cohn B, Ma J, Lo B, et al. MARCH1-mediated MHCI ubiquitination promotes dendritic cell selection of natural regulatory T cells. *J Exp Med.* 2013;210(6):1069–77.
20. Liu H, Wilson KR, Schriek P, Macri C, Blum AB, Francis L, et al. Ubiquitination of MHC Class II Is Required for Development of Regulatory but Not Conventional CD4 + T Cells. *J Immunol.* 2020;ji1901328.
21. Hargadon KM. Murine and Human Model Systems for the Study of Dendritic Cell Immunobiology. *Int Rev Immunol.* 2016;35(2):85–115.
22. Tze LE, Horikawa K, Domaschensch H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10 - Driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med.* 2011;208(1):149–65.

Edital nº 10/2022/PROPPG

Programa de fomento para a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA

1) IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título:

Fatores clínico-patológicos e moleculares do Carcinoma Diferenciado de Tireoide

Palavras-chave: carcinoma de tireoide; tumorigênese; fatores moleculares; prognóstico

Resumo:

Os carcinomas da tireoide são as neoplasias malignas mais frequentes do sistema endócrino, sendo mais comuns as formas diferenciadas do epitélio folicular: o carcinoma papilar de tireoide (CPT), responsável por quase 90% dos casos, e o carcinoma folicular de tireoide (CFT). Um aumento na frequência dessa neoplasia vem ocorrendo nas últimas décadas, em especial pelo diagnóstico de tumores menores e sem repercussão na mortalidade. O comportamento biológico quanto à agressividade tumoral é variável, desde tumores indolentes limitados à glândula tireoide até tumores com extensão extratireoidiana e metástases à distância. Vários fatores clínico-patológicos e moleculares vêm sendo estudados para avaliar de forma mais precisa a chance de persistência/recorrência tumoral, nortando aspectos do tratamento e acompanhamento dos pacientes com carcinoma de tireoide. Nos últimos anos, mutações e rearranjos em genes envolvidos na tumorigênese foram identificados no carcinoma diferenciado da tireoide (CDT), sendo as mais frequentes nos genes *BRAF*, *RAS* e *TERT*, com impactos significativos nos desfechos clínicos prognósticos. Mais recentemente, a análise do perfil molecular tumoral demonstra um papel importante no tratamento dos pacientes com doença metastática iodo-refratária progressiva, que conforme o perfil podem se beneficiar de terapia-alvo. O presente estudo visa determinar o padrão de alterações genéticas em amostras tumorais de pacientes portadores de CDT em nosso meio e sua relação com fatores clínico-patológicos, bem como, padronizar um painel inicial de avaliação molecular nos pacientes com ou sem doença metastática.

2) DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

Erika Laurini de Souza Meyer (proponente), Médica Endocrinologista, professora associada do Departamento de Clínica Médica da UFCSPA. Preceptora dos Ambulatórios de Câncer de Tireoide e Doenças da Tireoide do Serviço de Endocrinologia da ISCMPA - Programa de Residência Médica em Endocrinologia – UFCSPA/ISCMPA.

Vanessa Suñé Mattevi, Farmacêutica Bioquímica, professora associada do Departamento de Ciências Básicas da UFCSPA. Coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, professora dos Programas de Pós-Graduação em Patologia e Biociências da UFCSPA.

Lenara Golbert, Médica Endocrinologista, professora adjunta do Departamento de Clínica Médica da UFCSPA. Preceptora dos Ambulatórios de Câncer de Tireoide e Doenças da Tireoide do Serviço de Endocrinologia da ISCMPA - Programa de Residência Médica em Endocrinologia – UFCSPA/ISCMPA.

Virgílio Zanella, Médico Cirurgião de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Preceptor do Programa de Residência Médica em Cirurgia de Cabeça e Pescoço da ISCMPA.

Geise Lilian Menezes Solera, acadêmica do curso de Biomedicina Noturno da UFCSPA

3) CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

3.1. Carcinoma Diferenciado da Tireoide

Os carcinomas da tireoide são as neoplasias malignas mais frequentes do sistema endócrino, representando aproximadamente 2-3% de todos os cânceres humanos (1,2). A incidência deste câncer vem aumentando desde 1980, com uma acentuada aceleração de 2,4% ao ano entre 1980-1997 para 6,5% ao ano no período de 1997-2006 (3). No Brasil, a incidência é de 13.780 mil casos novos/ano (4,5). O câncer de tireoide é três vezes mais comum no sexo feminino e corresponde ao 5º tipo de câncer mais frequente nas mulheres (4, 5).

Os carcinomas diferenciados da tireoide (CDT), papilar e folicular, representam mais do que 85-90% de todos os tipos histológicos. Dentre as formas diferenciadas do epitélio folicular, o carcinoma papilar (CPT) é o mais frequente (90%) e o de melhor prognóstico. Pode apresentar um comportamento biológico variável, desde microcarcinomas indolentes até formas invasivas que determinam metástases à distância. Já o carcinoma folicular (CFT) geralmente possui um comportamento mais agressivo do que o CPT, com tendência à disseminação hematogênica à distância.

Aproximadamente 80% dos pacientes são curados com o tratamento inicial (tireoidectomia com ou sem radioiodoterapia), 15% apresentarão recorrência local e 5 a 15% desenvolverão metástases à distância (6-8). A chance de recorrência é maior nos primeiros 5 a 8 anos após o diagnóstico, mas pode ocorrer várias décadas após o tratamento inicial, necessitando um seguimento à longo prazo (2,6-8). A taxa de sobrevida em 10 anos para o carcinoma papilar é de aproximadamente 90% e para o carcinoma folicular, em torno de 75% (2).

Os fatores prognósticos associados a persistência/recorrência tumoral podem ser divididos em fatores relacionados ao paciente (idade ao diagnóstico, sexo, história familiar), ao tumor (tipo histológico, tamanho, extensão extratireoidiana, presença de metástases ao diagnóstico)

e fatores do tratamento inicial (extensão do tratamento cirúrgico, uso da radioiodoterapia) (6). Baseados nesses fatores vários sistemas de estadiamento inicial são propostos no CDT, sendo que os mais comumente utilizados, o sistema TNM/AJCC e a estratificação de risco inicial de recorrência tumoral proposta pela *American Thyroid Association* (7). Na prática clínica, os fatores clínico-patológicos nem sempre são precisos na avaliação individual dos pacientes. Tumores semelhantes quanto à histologia, tamanho, idade de acometimento do indivíduo podem ter comportamentos diversos em relação à agressividade. Outra limitação é a falha na predição de desfechos para pacientes em estágios iniciais e considerados de baixo risco, que compreendem a maioria dos pacientes. Além disso, a utilização somente das informações dos primeiros meses de seguimento (sem considerar a resposta ao tratamento) e a não validação em várias populações também limitam o seu uso para a definição de prognóstico e orientação terapêutica (8-9). A determinação do perfil molecular dos tumores mais agressivos que não respondem ao tratamento com radioiodoterapia tem auxiliado na escolha de terapia-alvo.

3.2. Eventos moleculares associados à tumorigênese da tireoide

Devido a sua grande importância biológica na regulação de diversos processos celulares, alterações genéticas em efetores da via de sinalização da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Figura 1) são as mais bem relacionadas com o desenvolvimento e agressividade do CDT (10, 11). Esta é uma via de sinalização intracelular que, quando ativada, desempenha um papel central no crescimento, divisão, proliferação, diferenciação e apoptose das células (11). Dados do Cancer Genome Atlas Research (TCGA) demonstraram que os principais genes envolvidos na patogênese do CDT, em ordem decrescente, foram o *BRAF*, *RAS*, *RET/PTC* e *NTRK* (12). Outros eventos moleculares como mutações no gene *TERT* e *p53* são fortemente associados à perda de diferenciação e progressão tumoral.

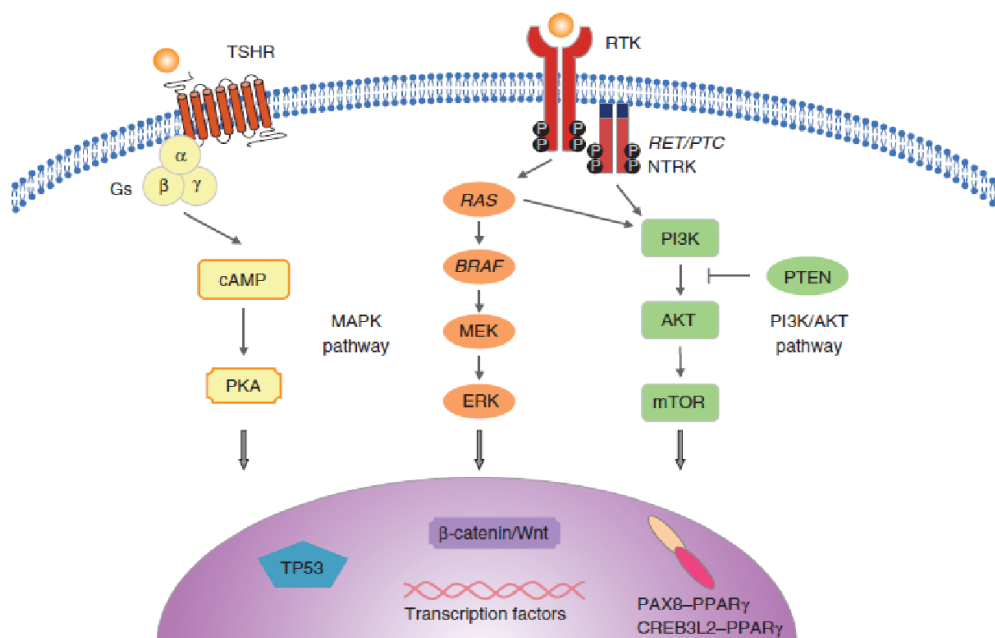


Figura 1. A via da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) – (ref 11)

3.2.1. *BRAF*

Os dados mais consistentes estão relacionados à mutação no *BRAF* (fig. 1), um gene com um papel crítico na via de sinalização MAPK, uma vez que ativa a transcrição de genes que estão envolvidos na proliferação, diferenciação e morte celular. Mais de 40 mutações no gene *BRAF* já foram identificadas no CPT (13). No entanto, a mutação V600E do gene *BRAF* é o evento genético mais frequente nesse tumor, ocorrendo numa frequência variável de 36 a 83% dos casos, dependendo da população estudada (10,14). Em nosso meio observamos em estudo prévio que 56% dos CPT apresentavam essa mutação (22). Esta mutação é do tipo *missense*, devido a uma transversão somática de uma timina por uma adenina na posição 1799 no éxon 15 (T1799A), o que resulta em uma substituição de um aminoácido valina por um ácido glutâmico na posição 600 (*BRAFV600E*) (15,16). Essa alteração raramente coexiste com outros eventos genéticos prevalentes, como os rearranjos *RET-PTC* ou mutações no *RAS* (16).

Apesar de existirem vários estudos, a relação entre a mutação *BRAFV600E* e agressividade tumoral ainda é controversa. Vários estudos têm associado a essa mutação com indicadores clínicos de pior prognóstico, tais como idade avançada, sexo masculino, tamanho tumoral, extensão extratireoidiana, recorrência local e metástases a distância (13, 17-19). Em contraste, outros estudos não observaram tais associações clínicas (20,21). Um estudo de autor do Projeto (ELSM) observou que a diminuição dos níveis de RNA mensageiro dos genes de reparo do DNA *MHL1* e *XPD* se correlacionaram com a presença da mutação *BRAFV600E*, e com a presença de linfonodos metastáticos e com risco inicial intermediário de recorrência em amostras frescas de CPT (22). No entanto, é necessário um maior entendimento dos fatores prognósticos moleculares em desfechos mais a longo prazo no seguimento desses pacientes.

3.2.2. *RAS*

Os genes *RAS* codificam proteínas G altamente relacionadas, que desempenham um papel central na transdução de sinal intracelular pela ativação da MAPK e outras vias de sinalização, como PIK3/AKT (15) (Fig 1). As mutações pontuais de *RAS* geralmente ocorrem nos códons 12, 13 ou 61 das proteínas H-RAS, K-RAS ou N-RAS (15). Mutações nos 3 genes *RAS* (H, K e N-RAS) ocorrem em tumores benignos e malignos da tireoide, sendo frequentes no CFT (36%), no carcinoma pouco diferenciado da tireoide (55%) e no carcinoma anaplásico (52%). No CPT forma clássica, a mutação em *RAS* é rara, no entanto pode estar presente em 25% dos casos da variante folicular dessa neoplasia (23).

Em função da presença da mutação *RAS* num espectro de lesões benignas e malignas, o papel do *RAS* no prognóstico do CDT ainda não está bem estabelecido. Estudos têm demonstrado que a presença do *RAS* mutado, em especial no CFT e no carcinoma pouco diferenciado, predispõe a metástase à distância e diminuição da sobrevida (24, 25).

3.2.3. *TERT*

Mutações na região promotora do gene da telomerase (*TERT*) são descritas nos tumores diferenciados da tireoide com comportamento mais agressivo, incluindo as formas pouco diferenciadas e indiferenciadas(anaplásico) (26,27). Nenhuma mutação no *TERT* foi evidenciada na tireoide normal, em lesões benignas ou no carcinoma medular da tireoide. Assim como ocorre com as mutações RAS, as mutações no *TERT* são infrequentes nos tumores oncocíticos da tireoide, evidenciando que eventos genéticos distintos dão origem a esse tipo de tumor (14). Importante salientar que, no carcinoma papilar da tireoide (CPT), as mutações no *TERT* ocorrem mais frequentemente nos tumores com mutação *BRAFV600E* (27, 28) e essa associação confere um comportamento tumoral mais agressivo. De forma interessante, mutações no *TERT* não foram identificadas em amostras de microcarcinomas, tumores menores do que 1 cm e com curso indolente, que apresentaram progressão na vigilância ativa (29). O papel das mutações no *TERT* e sua associação com a mutação no *BRAFV600E* é pouco estudada em nossa população.

JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

A tumorigênese da glândula tireoide envolve um processo complexo de interação gênica. O conhecimento do perfil molecular do CDT determina informações prognósticas e terapêuticas e permite identificar os tumores de alto risco que necessitam um seguimento intensivo. A prevalência das principais alterações moleculares do CDT sofre variação nos diferentes estudos conforme a população estudada. Ainda existem dúvidas sobre o papel prognóstico dos principais marcadores moleculares tais como BRAF, RAS e TERT. A individualização do risco de morte e/ou recorrência tumoral no acompanhamento de pacientes com neoplasias malignas é uma tendência em praticamente todos os tipos de neoplasias. Do ponto de vista clínico, novas estratégias para individualização do risco de recidiva e resposta dinâmica ao tratamento são propostas para manejo e seguimento dos pacientes com CDT, mas apesar dessas melhorias, alguns pacientes têm pior prognóstico. Desta forma, a compreensão do perfil de molecular do CDT em nosso meio, bem como sua correlação com aspectos clínicos e histopatológicos, pode determinar um maior entendimento sobre o papel desses mecanismos na tumorigênese tireoidiana, inclusive, identificando marcadores diagnósticos e prognósticos aplicáveis a prática clínica que permitam o melhor tratamento e seguimento dessa neoplasia. Do ponto de vista da prática clínica diária dos pacientes com CDT atendidos na ISCMPA, com a padronização das técnicas moleculares em nosso meio, essas poderão ser estendidas na avaliação de pacientes com doença metastática para verificar indicação de terapia-alvo.

4) OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Determinar o padrão de mutação dos principais genes envolvidos na tumorigênese em amostras tumorais de pacientes portadores de carcinoma diferenciado da tireoide (CDT) e sua relação com fatores clínico-patológicos associados à agressividade tumoral.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar técnicas moleculares para avaliação dos principais genes *BRAF*, *RAS* e *TERT* nos tecidos tumorais.
- Determinar a prevalência das principais mutações isoladas ou associadas nos genes *BRAF*, *RAS* e *TERT* em nossa população;
- Correlacionar os achados moleculares com dados clínicos e histopatológicos;
- Estabelecer um painel básico de avaliação molecular em nosso meio em amostras de pacientes com doença metastática iodo-refratários com intuito de avaliar potencial tratamento com terapia-alvo;
- Permitir a introdução futura de outros marcadores moleculares tais como as fusões N-TRK e RET-PTC

5) METODOLOGIA PROPOSTA

5.1. Delineamento do estudo

Estudo observacional, prospectivo com amostragem consecutiva não-probabilística.

5.2. Local do Estudo

Serviço de Endocrinologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). O Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA possui toda a infraestrutura necessária para o trabalho proposto, tais como termociclador para PCR em tempo real e sequenciador. Demais recursos para outras técnicas de Biologia Molecular, serão realizadas nas dependências da Universidade.

5.3. Obtenção das amostras

Tecido tumoral e normal adjacente será coletado no momento da tireoidectomia (retirada cirúrgica da glândula tireoide), em pacientes com diagnóstico pré-operatório de câncer de tireoide (CPT ou CFT).

5.4. Amostragem e Tamanho da Amostra

Será utilizada uma amostra de conveniência. Estima-se em torno de 300 a 400 tireoidectomias ao ano na ISCMPA, sendo 10-15% por diagnóstico de câncer de tireoide. Todos os pacientes

com exame confirmatório de CDT e que estejam em acompanhamento ambulatorial, poderão ser incluídos caso aceitem participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.4.1 Critérios de Inclusão

Pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, submetidos à tireoidectomia conforme indicação clínica, independente da pesquisa. O diagnóstico anatomopatológico definitivo de carcinoma de tireoide será realizado através da técnica da hematoxilina-eosina por patologista experiente em neoplasias da tireoide que desconhecerá os objetivos do presente estudo.

5.4.2 Critérios de Exclusão

Serão excluídos os pacientes em que o diagnóstico anatomopatológico definitivo de tireoidite linfocítica crônica, bócio colóide nodular e/ou com dados clínicos incompletos.

5.5. Variáveis Clínicas

Serão coletados os seguintes dados: sexo, idade, tipo e subtipo histológico, tamanho tumoral, multifocalidade e bilateralidade tumoral, invasão vascular, invasão extratireoidiana mínima, invasão perineural, margens cirúrgicas, invasão de tecidos peritireoidianos, linfonodos cervicais comprometidos. Os dados clínico-patológicos são avaliados na rotina de atendimento dos pacientes e coletados por pesquisa no prontuário eletrônico. A resposta ao tratamento e dados de acompanhamento são coletados no seguimento dos pacientes.

5.6. Metodologias Laboratoriais

Extração de ácidos nucleicos de tecido fresco

As amostras de tecido fresco serão imersas em preservante no momento da coleta e encaminhadas ao Laboratório, onde ficarão armazenadas a -20°C até o momento da extração. O DNA genômico será extraído das amostras de tecido de acordo com o protocolo descrito por Kizys e cols. (2012). O produto da extração será quantificado por espectrofotometria pelo BioSpec-Nano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

PCR

Os fragmentos de interesse serão amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) através da utilização de *primers* específicos para os genes *BRAF* e *RAS*, e os produtos das reações serão submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%

Sequenciamento

Os produtos da PCR serão purificados com a utilização do ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher, EUA), conforme especificado pelo fabricante. A reação de sequenciamento de Sanger será realizada com o BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing

Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) em um analisador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

PCR em tempo real

As mutações no gene *TERT* serão detectadas através da reação em cadeia da polimerase em tempo real com detecção através de sondas de hidrólise (*TaqMan*). As reações serão realizadas em um termociclador *QuantStudio* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Análise estatística

Será construído um banco de dados no programa RedCap para armazenamento de todos os dados clínicos e moleculares. As análises estatísticas serão realizadas no *Statistical Package for Social Sciences*. As variáveis categóricas serão descritas através de frequências e as variáveis contínuas através de médias e desvios-padrão ou medianas. Variáveis categóricas serão comparadas entre grupos através do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Variáveis contínuas serão comparadas através de testes paramétricos ou não-paramétricos, de acordo com sua distribuição. Todos os testes serão bicaudais e o valor de P será considerado significativo quando $<0,05$.

Aspectos éticos

Este projeto está aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa de ambas as instituições: ISCMPA (parecer n. 4.634.929 de 07/04/2021) e UFCSPA (parecer n. 4.770.009 de 11/06/2021).

Orçamento

Alguns materiais que não constam no Anexo 7-A, tais como *primers* específicos dentre outros, já estão disponíveis no laboratório.

6) ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PROJETO (CRONOGRAMA)

Atividades	2022/1	2022/2	2023/1	2023/2
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X
Coleta das amostras	X	X		
Confecção do Banco de Dados Clínicos		X	X	
Análises Moleculares		X	X	
Análises Estatísticas			X	X
Apresentação dos dados da pesquisa				X
Redação de artigo				X

7) PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DA EXECUÇÃO DO PROJETO

Os produtos esperados como resultado do presente projeto, conforme previsto no Cronograma, são:

- Estabelecer e padronizar em nosso meio a análise molecular das principais mutações (*BRAF*, *RAS* e *TERT*) do carcinoma diferenciado da tireoide, na forma de painel molecular, uma vez que não existe painel molecular específico para esse tipo de tumor em nosso meio;
- Correlação dos dados clínicos e moleculares no CDT com entendimento do papel prognóstico e terapêutico.
- Divulgação dos resultados em eventos científicos e a publicação de um artigo científico.

8) POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO E/OU DIFUSÃO

O presente projeto objetiva buscar avanços no conhecimento do comportamento tumoral do carcinoma de tireoide. A nossa proposta é aprofundar os estudos do papel dos genes envolvidos na tumorigênese tireoidiana na população local. O exercício da medicina translacional proposto neste projeto, traz maior aplicabilidade à realidade prognóstica e terapêutica do câncer de tireoide.

Destacam-se, ainda as seguintes contribuições científicas:

- Avanços no entendimento da tumorigênese do carcinoma diferenciado de tireoide;
- Permitir a padronização de marcadores moleculares conhecidos passíveis de realização por técnicas laboratoriais de rotina, com potencial de uso na prática diária, em especial nos pacientes com doença metastática;
- Formação de recursos humanos qualificados cientificamente na área molecular dos carcinomas da tireoide,
- Divulgação de material científico resumos em congressos e publicações científicas em jornais especializados de níveis A1 a B1, apresentações em congressos nacionais e internacionais da área;
- Contribuição ao desenvolvimento científico, tecnológico e econômico regional, visando à difusão do conhecimento, através de novas pesquisas sobre a descoberta de novos marcadores moleculares prognósticos aplicáveis a prática clínica;
- Fortalecer a integração acadêmica entre a UFCSPA e a ISCMPA, a fim de gerar trabalhos que integrem dados clínicos e experimentais e ofereçam aplicabilidade no contexto local e nacional.

REFERÊNCIAS

1. Filetti S, Tuttle RM, Leboulleux S and Alexander EK: Nontoxic diffuse goiter, nodular thyroid disorders, and thyroid malignancies. In: Melmed S, Auchus RJ, Goldfine AB, Koenig RJ,

- Rosen C, eds. Williams Textbook of Endocrinology. 14th ed. Philadelphia: Elsevier, 2019; 445-479.
2. Schlumberger M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1998; 338: 297-306.
 3. Ward, E; Jemal, A; Chen, A. Increasing incidence of thyroid cancer: is diagnostic scrutiny the sole explanation? *Future Oncol.* 6(2):185-8, 2010.
 4. GLOBOCAN 2019
 5. INCA 2020
 6. Mazzaferri EL, Kloos RT. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Endocrinol Metab* 2001; 86: 1447-1463.
 7. Cooper, D.S. et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* 2015; 19, 1167-214.
 8. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418-428.
 9. Hannequin P, Liehn JC, Delisle MJ. Multifactorial analysis of survival in thyroid cancer. Pitfalls of applying the results of published studies to another population. *Cancer* 1986;58(8):1749-55
 10. Fagin JA and Wells Jr SA. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. *N England J Medicine* 2016;15(11): 1054-67
 11. Hsiao SJ and Nikiforov Y. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21(5):T301-13.
 12. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014; 159:676–90.
 13. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28(7):742-62.
 14. Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simões. Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *European J of Endocrinol* 2016, 174: R117-R126
 15. Romitti M, Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, Wajner SM, Maia AL. Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas. *Int J Oncol* 2013; 42(1):19-28
 16. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:1454-7.
 17. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol and Metab* 2003; 88: 5399–5404.
 18. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E, et al. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(9):4197-205.

19. Elisei R, Viola D, Torregrossa L, Giannini R, Romei C, Ugolini C, et al. The BRAF(V600E) mutation is an independent poor prognostic factor for the outcome of patients with low-risk intrathyroidal papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(10):3943-9.
20. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavalieri A, et al. Correlation between B-RAF600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *End Related Cancer* 2006; 13:455-464
21. Abrosimov A, Saenko V, Rogounovitch T, Namba H, Lushnikov E, Mitsutake N and Yamashita S. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. *Int J Cancer* 2007; 120:196-200
22. Lutz, B.S.; et al. Imbalance in DNA repair machinery is associated with BRAFV600E mutation and tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017; 472:140-148
23. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist* 2013; 18(8):926-32.
24. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J et al. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3226-35.
25. Jang EK, Song DE, Sim SY, Kwon H, Choi YM, Jeon MJ et al. NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 2014; 24:1275-81.
26. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, Ghossein RA, Fagin JA. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1562-6.
27. Liu X, Bishop J, Shan Y, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20:603-10.
28. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, Pai S, Bishop J. BRAFV600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with high recurrence. *J Clin Oncol* 2014; 32:2718-27.
29. Yabuta T, Matsuse M, Hirokawa M, Yamashita S, Mitsutake N, Miyauchi A. TERT promoter mutations were not found in papillary thyroid microcarcinomas that showed disease progression on active surveillance. *Thyroid* 2017; 27:1206-08.

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 Resposta morfológica aguda ao uso de decanoato de nandrolona associado ao treinamento de força e treinamento aeróbico em ratos wistar com DHGNA
Palavras-chave:	EHNA, DHGNA, decanoato de nandrolona, treinamento, dieta.
Resumo:	A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHNA) 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:	Profª. Dra. Fernanda Bordignon Nunes Dep. de Ciências Básicas da Saúde e PPG em Patologia UFCSPA fernandabn@ufcspa.edu.br
Colaborador:	Profª. 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% (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 esteroide 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 musculo 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 estrutural e de 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, IGF-1, CXCL10) 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 15 g 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, originando bolachas de aproximadamente 15 g, complementada com 15 g de dieta padrão e 15 g de açúcar refinado administrado na hidratação diária, similar à dieta de indução de EHNA apresentada no estudo de Henkel et al. (2019). A composição sólida total da dieta de indução da EHNA compreende em seus 15 g de ração padrão, 15 g de wafer e 3 mL de óleo de soja: 17,4 g de carboidrato, 3,9 g de proteína, 7,42 g de gorduras totais, 2,86 g de gordura saturada, 0,75 g de fibra alimentar, 53,25 mg de sódio e 159,47 Kcal por porção ofertada. O açúcar refinado ofertado de modo livre na água disponibilizada compreende um acréscimo de 14,93 g de carboidrato e 59,7 Kcal. 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 25 g ração *Nuvilab CR-1*; e a **dieta hiperproteica**, composta por 15 g de ração diária da marca *Nuvilab CR-1*, acrescidos 5 g de suplementação hiperproteica (100% Whey Protein 1 kg - Wedy Nutrition no sabor chocolate), contendo: carboidratos 0,37 g; proteínas 3,62 g; gorduras totais 0,27 g; gorduras saturadas 0,12 g; fibra alimentar 0,26 g; sódio 10,37 mg; cálcio 17,37 mg; fósforo 16,62 mg; magnésio 3 mg; ferro 0,042 mg; potássio 23,25 mg; L-ácido gaspártico 0,35 g; L-ácido glutâmico 0,53 g; L-alanina 0,16 g; L-arginina 0,07 g; L-cistina 0,06 g; L-fenilalanina 0,1 g; L-glicina 0,06 g; L-isoleucina 0,22 g; L-leucina 0,33 g; L-lisina 0,3 g; L-metionina 0,06 g; L-prolina 0,2125 g; L-serina 0,13 g; L-tirosina 0,08 g; L-treonina 0,25 g; L-triptofano 0,06 g; L-valina 0,21 g. 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, 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 mg/kg⁻¹ 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	1 ^a à 6 ^a semana da Fase II	Dieta de indução de EHNA + 15g de açúcar na hidratação diária	x	Não	8
G2	1 ^a à 6 ^a semana da Fase II	Hiperproteica	x	Sim, treino de força	8
G3	1 ^a à 6 ^a semana da Fase II	Hiperproteica	x	Sim, treino aeróbico	8
G4	1 ^a à 6 ^a semana da Fase II	Hiperproteica	Decanoato de Nandrolona 5 mg/ kg ⁻¹ semana ⁻¹ /x2 semana	Sim, treino de força	8
G5	1 ^a à 6 ^a semana da Fase II	Hiperproteica	Decanoato de Nandrolona 5 mg/ kg ⁻¹ semana ⁻¹ /x2 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 10 V 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.

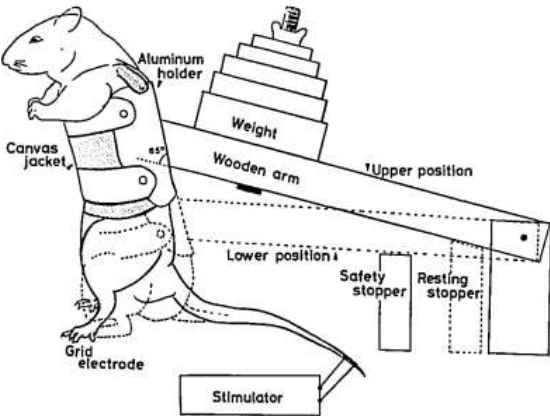


Figura 1. Protocolo de equipamento de treino de força. Tamaki, Uchiyama, e Nakano, 1992, p882

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 = 40 m min ⁻¹	Sem. 1 = 40 m/ min ⁻¹
Sem. 6 = 80 m min ⁻¹	Sem. 6 = 80 m/ 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 **Lactato**, **AST** e **ALT** será feita com kits comerciais da Labtest®, conforme manual do fabricante. Os níveis **de IL-6, IL-10, TNF alfa, TGF Beta, IGF-1 e CXCL10** serão medidos por citometria de fluxo, com uso de Rat

Inflammation Kit (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando para a automação o citômetro de fluxo BD FACSCanto™. 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)

Etapas 01: Revisão de literatura e solicitação de animais junto ao Biotério UFCSPA;

Etapas 02: Fase I - Indução da EHNA em todos os animais do estudo;

Etapas 03: Divisão dos grupos (conforme os grupos apresentados no Quadro 1);

Etapas 04: Fase 2 - Oferta de treinamento, dietas e inóculo de DECA;

Etapas 05: Eutanásia, coleta de material biológico e análise de dados;

Etapas 06: Redação de artigos sobre o estudo executado.

2022							J U L	A G O	S E T	O U T	N O V	D E Z
Revisão de Literatura							X	X	X	X		
Solicitação de animais							X					
Fase I									X	X		
Fase II											X	X
2023	J A N	F E V	M A R	A B R	M A I	J U N						
Revisão de Literatura			X	X	X							
Eutanásia	X											
Coleta de dados e material biológico	X											
Avaliações morfológicas, histológicas e bioquímicas		X										
Análise e interpretação de dados			X									
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 de tratamento 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 esteroide 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

- 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/actascibiols.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., Irrázaval, 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.

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., Fruhbeck, 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*.

Silva, D. G. da, Brito, J. da S., Rodrigues, B. F. B., Afonso, D. M., & Amato, A. A. (2015). Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica: Atualização Sobre a Fisiopatologia. *Brasília Médica*, 52(3–4), 108–115. <https://doi.org/10.5935/2236-5117.2015v52n3/4a04>

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

Edital PROPPG nº 10/2022/PROPPG – Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA

Proposta de Pesquisa Científica - Faixa B

i) Identificação do projeto:

Título do Projeto: **Avaliação do papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia**

Palavras-chave: pré-eclâmpsia, canais de potássio, placenta, fatores hiperpolarizantes, eletrofisiologia

RESUMO

A gravidez representa naturalmente um período de estresse fisiológico ao corpo humano e certas desordens podem levar a má perfusão sanguínea. A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbimortalidade materna e perinatal, parto pré-maturo e restrição do crescimento intrauterino. Apesar da etiologia não estar bem definida, ela está primariamente associada à presença da placenta e a diminuição da perfusão desta, devido à má formação das artérias espiraladas maternas e ao aumento da resistência vascular. O atraso no diagnóstico da síndrome favorece a evolução para a eclâmpsia (caracterizada por convulsões) além de predispor essas mulheres a um risco elevado de problemas cardiovasculares. Como o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é a retirada da placenta, as terapias atuais visam evitar a morbimortalidade materna e perinatal tratando a sintomatologia, sem existir um medicamento anti-hipertensivo para tratamento das gestantes pré-eclâmpticas. Este projeto consiste em avaliar o papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e grave, comparada à gravidez normotensa. Uma parte dos métodos propostos já foi executada, tendo sido coletadas amostras de soro e do tecido placentário de mulheres maiores de 18 anos, em atendimento no Serviço de Obstetrícia do Hospital Santa Clara do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, que concordarem em assinar o TCLE. A análise da expressão gênica e proteica de canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (Kir) nos tecidos placentários já foi realizada, bem como a mensuração dos níveis de potássio sérico das pacientes. Nesta etapa do projeto, serão avaliados os níveis dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (ácido 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico e ácido 11,12,15-trihidroxeicosatrienóico) no soro e no tecido placentário.

ii) Dados do proponente e equipe

Proponente: *Dra. Gisele Branchini* – Prof^a Associada do Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Patologia – UFCSPA

Equipe de Pesquisa:

Dra. Fernanda Bordignon Nunes – Prof^a Adjunta do Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Patologia – UFCSPA

Érika Santana Leotério – Biomédica, Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia – UFCSPA

Thais Duarte Borges de Moura – Acadêmica do curso de Medicina da UFCSPA e aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Patologia

Thales Canabarro Araújo – Acadêmico do curso de Medicina da UFCSPA

Eduarda Hanauer - Acadêmica do curso de Biomedicina da UFCSPA

Bianca Crestani - Acadêmica do curso de Biomedicina da UFCSPA

Alunos de iniciação científica a serem recrutados

Parcerias e colaborações: Parte deste projeto contará com a parceria do professor Tiago Franco de Oliveira, para desenvolvimento de metodologia de síntese e quantificação dos metabólitos derivados do ácido araquidônico, a ser feita na Central Analítica da UFCSPA.

iii) Caracterização Da Proposta

Introdução

Durante a gestação, o corpo feminino passa por diversas mudanças, tanto físicas como hormonais, para abrigar o feto que se desenvolverá e formará um novo ser. Dentre essas mudanças que ocorrem com o corpo feminino estão alterações no sistema cardiovascular. Durante a gravidez ocorre um aumento de cerca de 30 a 50 % no fluido extracelular e aumento de 30 a 40% no volume plasmático, permitindo que os órgãos maternos - e o feto - sejam bem perfundidos (1).

A gravidez, em seu estado normal, já representa um período de estresse fisiológico ao corpo humano, e quando estas mudanças fisiológicas não ocorrem como deveriam algumas gestantes acabam apresentando certas desordens que levam a uma má perfusão sanguínea, como o exemplo da pré-eclâmpsia. A Pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbimortalidade materna e perinatal, parto pré-maturo e restrição do crescimento intrauterino (1). 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 múltipara ou já passaram previamente por uma pré-eclâmpsia (2-4).

A condição clínica da pré-eclâmpsia predispõe a gestante à uma situação bem delicada uma vez que, apesar das pesquisas, permanece enigmática e sem um tratamento específico. Caracterizada por um comprometimento clínico generalizado heterogêneo, a pré-eclâmpsia é classificada em leve ou grave (como descrito abaixo) se manifestando clinicamente como edema, hipertensão arterial, proteinúria e outros distúrbios sistêmicos principalmente a partir da vigésima semana gestacional (5,6).

- **Pré-eclâmpsia Leve:** apresenta níveis pressóricos entre $\geq 140 \times 90$ mmHg até 159×109 mmHg após 20 semanas de gestação em mulher previamente normotensa; proteinúria (≥ 300 mg/24h); sintomas cerebrais, visuais ou digestivos como cefaleia, tonturas, visão borrada, náuseas e vômitos.
- **Pré-eclâmpsia Grave:** mesma manifestação clínica da pré-eclâmpsia leve acrescida de pelo menos um dos seguintes fatores: hipertensão arterial $\geq 160 \times 110$ mmHg, proteinúria ≥ 500 mg/24h, oligúria < 500 ml/24h, sintomas cerebrais, visuais ou digestivos de forma persistente, síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixas plaquetas), insuficiência renal ou hepática (creatinina sérica $\geq 1,2$ mg/dl, transaminases > 70 UI/L), trombocitopenia (plaquetas < 100.00 /uL).
- **Eclâmpsia:** surgimento de convulsões em mulheres com pré-eclâmpsia ou com hipertensão gestacional, tanto em período anterior ao parto ou até 14 dias após o mesmo (7).

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 (1,8).

A placenta é um órgão que começa a se desenvolver juntamente com o feto e é expulsa do útero logo após o parto. Definida como um órgão chave para a sobrevivência fetal, ela é formada pela fusão das membranas fetais (córion viloso) com o tecido materno (decídua basal). Desta forma um ambiente de suporte que contém o sangue materno (espaço intervilo) é criado, permitindo a troca de nutrientes, gases, água e metabólitos para suprir as necessidades fisiológicas do feto (10). Para a correta formação estrutural da placenta é necessário que os vasos sanguíneos maternos sejam remodelados. As artérias espiraladas - inicialmente pequenas - são invadidas por células trofoblásticas e começam a ter suas porções distais dilatadas, perdendo as células endoteliais e as células musculares lisas, restando apenas uma estrutura flácida que está ligada no espaço intervilo (10). Na gestação normal, as porções arteriais que sofrem essas modificações se tornam incapazes de responder aos estímulos para vasoconstrição, entretanto essas mudanças não ocorrem adequadamente na pré-eclâmpsia, causando um aumento da resistência vascular e consequente hipertensão arterial (9).

Ainda que a maioria das gestantes consiga um bom desfecho clínico após a placenta ser retirada e o equilíbrio fisiológico ser restaurado, o atraso no diagnóstico da síndrome pode favorecer a evolução para a eclâmpsia (caracterizada por convulsões) além de predispor essas mulheres a um risco extremamente elevado de desenvolver outros problemas cardiovasculares durante a vida (2,5,8). A evolução da pré-eclâmpsia é bastante variável, enquanto algumas pacientes podem não progredir para a forma mais grave da doença, outras apresentam essa evolução em questão de dias ou até mesmo de horas, sendo extremamente importante a monitorização continua dessas pacientes (9).

Como o único tratamento definitivo para a pré-eclâmpsia é a retirada do feto - ou mais precisamente da placenta - muitas vezes de forma precoce e prematura (5,8), as terapias atuais visam evitar a morbimortalidade materna e perinatal tratando a sintomatologia apresentada, sem a existência de um medicamento anti-hipertensivo de escolha para tratamento das gestantes pré-eclâmpicas (3). Um fármaco com grande potencial de ser utilizado para controle hipertensivo na gestação é a nifedipina. Podendo ser utilizado como hipotensor, vasodilatador e tocolítico, atua bloqueando canais de cálcio e reduzindo a concentração de cálcio intracelular, resultando em um relaxamento da musculatura vascular (11). Já para o tratamento e prevenção da eclâmpsia, um dos medicamentos mais difundidos e utilizados desde 1925 é o sulfato de magnésio. Apresentando grande eficácia no controle das crises convulsivas, ele também inibe o trabalho de parto prematuro. Devido à grande variabilidade de reações fisiológicas em que o magnésio está inserido, seu mecanismo de ação completo ainda não está elucidado, mas sendo considerado um antagonista fisiológico natural do cálcio, ele é capaz de reduzir a resistência vascular periférica (12).

Toda esta resistência e alteração cardiovascular que caracteriza a gestação e principalmente a pré-eclâmpsia nos leva a observar mais cuidadosamente os fatores fisiológicos que regulam a pressão arterial neste seletivo grupo como por exemplo a presença de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, a ação e regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, e a manutenção do tônus vascular (17).

- Fatores angiogênicos e anti-angiogênicos: alguns estudos relacionados a estes fatores apresentam achados clínicos que permitem realizar um diagnóstico precoce da pré-eclâmpsia, porém, visto que não existe tratamento preventivo, a utilidade deste diagnóstico acaba sendo limitada a uma predição da síndrome para tratamentos sintomáticos (13).
- Sistema renina-angiotensina-aldosterona: apesar de apresentar níveis plasmáticos mais elevados de renina e aldosterona, o sistema como um todo é apresentado em alguns estudos como suprimido na condição pré-eclâmpica (14, 15).
- Tônus vascular: regulado em sua maioria através de mediadores secretados pelas células endoteliais, como o óxido nítrico, prostaglandinas e **fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs)** (16,17). Como a pré-eclâmpsia

está associada com aumento do tônus vascular e defeitos na função dos canais de potássio podem levar a vasoconstrição, torna-se necessário a realização de mais estudos para esclarecer a relação deste fenômeno com a patogênese da síndrome.

Em relação à regulação do tônus vascular os fatores derivados do endotélio merecem destaque. Eles são um grupo de diferentes fatores que, de modo geral, promovem o aumento na concentração intracelular de cálcio, abertura dos canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) e dos canais de potássio corretores do fluxo de internalização (K_{if}), hiperpolarização celular e relaxamento da musculatura vascular (18). Os principais EDHF's já descritos são o óxido nítrico, o íon potássio, o peróxido de hidrogênio, o peptídeo C natriurético e alguns metabólitos derivados do ácido araquidônico, como o ácido epoxieicosatrienóico (EET) e os ácidos 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico (15-H-11,12-EETA) e o 11,12,15-trihidroieicosatrienóico (11,12,15-THETA) (17). Atualmente sabe-se que certos EDHF's são expressos de maneira constitutiva nas células vasculares endoteliais, porém alguns outros podem agir de maneira induzida (como os metabólitos 15-H-11,12-EETA e 11,12,15-THETA), contribuindo quando necessário para o relaxamento vascular e muscular (17, 18).

Justificativa

Apesar de presente em gestantes, esta regulação por meio dos EDHF's aparenta estar ausente na pré-eclâmpsia (19). Devido à grande prevalência dessa condição clínica e a carência de informações sobre suas causas (9), torna-se imprescindível a realização de estudos que possam esclarecer e identificar os mecanismos envolvidos neste processo etiológico.

Sendo assim, este projeto tem por finalidade analisar a expressão dos canais de potássio envolvidos na rota de ação dos EDHF's induzíveis em pacientes pré-eclâmpicas para elucidar a relação destes com a patogênese da doença. Parte das avaliações previstas no projeto original já foram executadas (avaliação da expressão gênica e proteica dos canais de potássio), mas ainda há uma importante avaliação que não foi realizada devido à indisponibilidade de insumos (dosagem dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio). Nesse sentido, a continuidade da execução do projeto é fundamental para a elucidação da contribuição destes fatores na condição clínica estudada.

Os conhecimentos gerados a partir deste projeto terão potencial para aprimorar o manejo de gestantes com pré-eclâmpsia e de diferentes alvos terapêuticos que poderão ser futuramente explorados para contribuir na redução da morbimortalidade materna e perinatal.

iv) Objetivos

Objetivo Geral:

Avaliar o papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia leve e de pré-eclâmpsia grave, comparada à gravidez normotensa.

Objetivos Específicos:

- Mensurar os níveis dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF): ácido 15-hidroxi-11,12-epoxieicosatrienóico (15-H-11,12-EETA) e ácido 11,12,15-trihidroieicosatrienóico (11,12,15-THETA) no soro e no tecido placentário das pacientes;
- Associar os dados de expressão dos canais de potássio, previamente avaliados, com os diferentes graus de pré-eclâmpsia e com os níveis séricos de potássio (já mensurados) e dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio.

v) Metodologia proposta

A presente proposta configura parte de um projeto em andamento, do qual parte dos objetivos específicos já foi executada. Neste sentido, apresentamos abaixo um resumo dos métodos já realizados, de modo a contextualizar o andamento da execução do projeto.

Delineamento da Pesquisa

Esta pesquisa envolve um estudo transversal comparativo.

Amostra e sujeitos de pesquisa

A amostra foi configurada por mulheres com idade superior a 18 anos, em atendimento obstétrico para parto no Serviço de Obstetrícia do Hospital Santa Clara, parte do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), dispostas a consentir sua participação na pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I). Para recrutamento da amostra, foi adotada a seguinte estratégia: convite para participar da pesquisa, de forma voluntária. As participantes, na sequência da sua internação para realização de parto, foram convidadas a participar do estudo e lhes foram informados os procedimentos metodológicos da pesquisa. As mulheres que se enquadraram nos critérios de inclusão para cada um dos grupos experimentais (descritos abaixo) e aceitaram participar da pesquisa assinaram e dataram o TCLE.

Em relação à via de parto, foi incluída somente a via alta, incluindo tanto cesáreas eletivas quanto de urgência. Os Critérios de Inclusão no grupo Pré-Eclâmpsia foram: idade maior ou igual a 18 anos e apresentar diagnóstico prévio de pré-eclâmpsia leve ou pré-eclâmpsia grave, sem história clínica de hipertensão em período anterior a gestação; no grupo controle foram: idade maior ou igual a 18 anos e apresentar pressão normotensa durante o período gestacional, sem história clínica de hipertensão em período anterior a gestação. Foram excluídas do estudo gestantes com diagnóstico prévio de nefropatia, hepatopatia, tireoidopatias, infecções ativas (como infecção do trato urinário) ou que apresentaram gestações múltiplas. Gestantes normotensas com $\geq 1+$ de proteinúria no exame qualitativo de urina também foram excluídas, bem como as que fizeram uso de qualquer tipo de medicamento que pudessem interferir nas concentrações de potássio sérico ou comprovadamente na expressão dos canais iônicos.

Coleta das Amostras

Após a assinatura do TCLE, as participantes foram submetidas a uma colheita de sangue venoso, antes de qualquer punção venosa para infusão sorológica, de modo a evitar hemodiluição. As amostras foram transportadas em recipiente refrigerado até o Laboratório de Fisiologia Translacional da UFCSPA, onde foram processadas para separação do soro, que foi alíquotado e congelado para as análises previstas.

Após o parto e a retirada da placenta, foram coletados fragmentos da placenta da superfície materna, selecionando áreas que englobassem as artérias espiraladas. As amostras de tecido destinadas às análises de biologia molecular foram acondicionadas em criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Estas amostras, devidamente identificadas com os dados da participante foram encaminhadas pela pesquisadora responsável para a UFCSPA, onde foram armazenadas a -80°C para as análises previstas.

Avaliação da expressão dos canais de potássio

A expressão gênica foi avaliada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (RT-qPCR). O RNA total foi 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 foi 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). A reação foi normalizada pela expressão do gene normalizador *YWHAZ* (previamente testado em um painel de 9 genes).

A expressão gênica dos alvos do estudo (canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) e canais de potássio corretores do fluxo de internalização (K_{ir})) foi avaliada com o uso de *primers sense* e *antisense* nas reações de qPCR para a amplificação

de fragmentos dos genes, desenhados com o auxílio da ferramenta IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc.) e sintetizados pela IDT. As sequências dos *primers* são: Kir2.1 – Forward 5-GAA GAG TAA AGT CCA CAC CCG-3; Kir2.1 - Reverse 5-GTG AAG ATG TCT GCG AGG TAC-3; Kir3.4 – Forward 5-TCC TGC ATA CAA ACC ACT CAG-3; Kir3.4 – Reverse 5-TGA CCC CAT CTT AAA CCA CG-3; Kir6.1 – Forward 5-AGT TCA TTC GCT TTG TCT GT-3; Kir6.1 - Reverse 5-AGA AGT GAG ATG CTG AAG GA-3; Kca3.1 – Forward 5-ACC TCC AGC TCT CAG TTA CA-3; Kca3.1 – Reverse 5-ATG GTG TCC TCT TTG TTG TC-3.

Para avaliação da expressão proteica e localização celular dos canais em estudo, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica. Os tecidos provenientes das amostras foram 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 desparanização dos cortes, foi feita a recuperação antigênica e o bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas e incubação com o anticorpo primário (KCNMA1 Antibody (PA5-33871) e Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 3 (KCNJ3) antibody). Após incubação com o anticorpo secundário, as lâminas foram incubadas com anticorpo terciário do mesmo kit e em seguida foi feita a revelação com substrato cromógeno, a desidratação e a montagem com Entellan. As lâminas foram avaliadas e suas imagens capturadas para posterior análise com auxílio de um software de processamento de imagem. Estas técnicas foram realizadas no laboratório de Patologia da UFCSPA.

Dosagens séricas e teciduais

Para a dosagem sérica de potássio, após a colheita sanguínea as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2500 x g para separação do soro. O soro obtido foi submetido à técnica de eletrodo íon seletivo para determinar a quantidade de potássio sérico das amostras.

Para a dosagem dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, os metabólitos lipídicos serão extraídos do soro ou do tecido placentário através de um buffer acidificado com ácido acético glacial para pH 3.5 em coluna de octadecilsilano e analisados por fase reversa através da técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). As frações contendo os metabólitos 15-H-11,12-EETA e 11,12,15-THETA serão coletadas, acidificadas e extraídas com acetato de ciclohexano/etil, serão secas sob uma corrente de N₂ para análise por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC/MS), conforme protocolo descrito por Tang e colaboradores. Esta técnica será executada na Central Analítica da UFCSPA.

Cálculo do tamanho amostral

Baseado em estudos anteriores que avaliaram características de expressão de canais iônicos em tecidos placentários de mulheres com pré-eclâmpsia, os quais avaliaram entre 70 e 80 mulheres, a amostragem deste estudo foi por conveniência, com o recrutamento de pacientes que procuraram o Serviço de Obstetrícia do Hospital Santa Clara e que preencheram os critérios de inclusão durante o primeiro ano de realização do estudo (2018), até que fosse atingido um número mínimo de 70 pacientes. Ao total, foram coletadas amostras de 67 pacientes, incluindo os grupos pré-eclâmpsia e controle.

Análises estatísticas

A normalidade das variáveis a serem analisadas (fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio) será avaliada pelo 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 18.0.

Aspectos éticos

A presente proposta está de acordo com a Resolução 466/2012 no que diz respeito à realização de pesquisa com seres humanos. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFCSPA e da ISCMPA, tendo

foi aprovado nos seus aspectos éticos. Foi solicitada a prorrogação do prazo de execução, igualmente aprovada por ambos os Comitês.

vi) Etapas de execução e cronograma do projeto

	1ª trim	2º trim	3º trim	4º trim
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Avaliação dos fatores hiperpolarizantes	X	X		
Análise dos dados	X	X	X	
Submissão de artigo científico				X
Publicação dos resultados e conclusão do estudo				X

Orçamento

Custeio – Material de consumo (Estratificados no Anexo 7A do Edital):

1. Consumíveis plásticos e itens de manipulação de amostras. Luvas de procedimento, caixas de estocagem, ponteiros, tubos e microtubos a serem utilizados para a condução dos experimentos descritos na metodologia da proposta. Valor: R\$ 8.406,34.
2. Reagentes. Reagentes químicos e solventes para o uso no sistema de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas de (LC-MS). Valor: R\$ 3.516,00.

vii) Produtos esperados como resultado da execução do projeto

De acordo com a fundamentação teórica e os objetivos propostos, os produtos esperados para a presente proposta são:

- Desenvolvimento e padronização do método de quantificação dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em matrizes biológicas de soro e de tecido placentário;
- Publicação de artigo científico em periódico indexado;
- Formação de recursos humanos.

viii) Potencial impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação, difusão, sócio-econômico e ambiental

A UFCSPA carece de pesquisas voltadas para a grande área da Biofísica, de modo que este projeto visa fortalecer esta área do conhecimento das ciências biológicas, aplicável tanto às ciências básicas quanto às ciências da saúde. Neste sentido, a pesquisa no campo da Biofísica propicia o desenvolvimento da bancada à clínica, dada à interface translacional do conhecimento em si e sua potencial aplicabilidade.

Além do investimento em recursos humanos na formação de novos pesquisadores e na consolidação de profissionais da área da Biofísica na UFCSPA, a padronização de técnicas e métodos necessários para o desenvolvimento do projeto corroboram para potencial prestação de serviço pela equipe do projeto e seus colaboradores, no sentido de disseminar novos protocolos e saberes. Somado a tudo isso, a busca de mecanismos envolvidos na etiopatogênese da pré-eclâmpsia – foco do

trabalho – poderá oportunizar, a longo prazo, o desenvolvimento de novos fármacos e/ou terapias para o tratamento desta condição, com potencial aumento da qualidade de vida de gestantes em risco para eclampsia e redução de custos para o sistema de saúde.

Referências Bibliográficas

- ¹ 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
- ² 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
- ³ Freire CMV, Tedoldi CL. Hipertensão arterial na gestação. *Arq Bras Cardiol*, 2009; 93(6 supl.1): e110-e178
- ⁴ 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
- ⁵ Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*, 2002; 19(1): 103–111
- ⁶ Redman CW, Sargent IL. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science*, 2005; vol. 308
- ⁷ Weel IC, Romão-Veiga M, Matias ML, et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*, 2017; 123: 40-47
- ⁸ Cheng S, Sharma S. Preeclampsia and health risks later in life: an immunological link. *Semin Immunopathol*. 2016
- ⁹ Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*, 2012 April 1; 2(2): 72–83
- ¹⁰ Moore KL. *Embriologia Clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ¹¹ Griffith OW, Wagner GP. The placenta as a model for understanding the origin and evolution of vertebrate organs. *Nature Ecol Evol.*, 2017; 1 (4): 72
- ¹² Nifedipina. Farm. Resp.: Marco Aurélio Limirio G. Filho. Neo Química. Bula de remédio.
- ¹³ Barbosa FT, Barbosa LT, Jucá MJ, Cunha RM. Usos do sulfato de magnésio em obstetrícia e em anestesia. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 2010; 60(1)
- ¹⁴ Verlohren S, Stepan H, Dechend R. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clin. Sci*, 2012; 122: 43–52
- ¹⁵ Nartita T, Ichihara A, Matsuoka K, Takai Y, Bokuda K, Morimoto S, Itoh H, Seki H. Placental (pro)renin receptor expression and plasma soluble (pro)renin receptor levels in preeclampsia. *Placenta*. 2016; 37:72-78
- ¹⁶ Verdonk K, Saleh L, Lankhorst S, Ilse Smilde JE, Van Ingen MM, Garrelds IM, Friesema ECH, Russcher H, Van Der Meiracker AH, Visser W, Danser AHJ. Association Studies Suggest a Key Role for Endothelin-1 in the Pathogenesis of Preeclampsia and the Accompanying Renin–Angiotensin–Aldosterone System Suppression. *Hypertension*. 2015; 65: 1316-1323
- ¹⁷ Campbell WB, Gauthier KM. Inducible Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (iEDHF): Role of the 15-Lipoxygenase-EDHF Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013; 61(3): 176–187
- ¹⁸ Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1215-25
- ¹⁹ Gillham JC, Meyers JE, Baker PN, Taggart MJ. Regulation of Endothelial-Dependent Relaxation in Human Systemic Arteries by SKCa and IKCa Channels. *Reproductive Sciences*, 2007; 14(1): 43-50
- ²⁰ Watanapa WB, Theerathananon W, Akarasereenont P, Techatraisak K. Effects of preeclamptic plasma on potassium currents of human umbilical vein endothelial cells. *Reproductive Sciences*, 2012; 19(4) 391-399
- ²¹ Leik CE, Willey A, Graham MF, Walsh SW. Isolation and culture of arterial smooth muscle cells from human placenta. *Hypertension*, 2004; 43: 837-840
- ²² Lange A, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder D. 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid-induced Vasoconstriction 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.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação do papel dos canais de potássio na fisiopatologia da pré-eclâmpsia**” realizado na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) em colaboração com a Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Este estudo pretende identificar alguns componentes placentários que podem estar envolvidos no desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

Como a senhora está prestes a dar à luz ao seu filho através de parto cesáreo, a senhora está sendo convidada a participar deste estudo. Caso aceite, sua participação consistirá em doar uma porção da sua placenta e uma amostra de sangue venoso. A placenta - órgão que permite a nutrição de seu bebê enquanto dentro do útero - é retirado 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-ECLÂMPsia. 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 sangue por punção venosa. Após o parto, depois do término de todos os procedimentos envolvendo o nascimento do seu filho, depois da retirada da placenta, procederemos a coleta de porções da placenta para o nosso estudo. Também utilizaremos informações do seu prontuário como idade, valores de pressão arterial, sintomas e medicamentos que a senhora utiliza, ficando o seu nome sempre em completo sigilo.

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 de sangue e das amostras de placenta).

Os riscos envolvidos na 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. 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. Ainda dentro dos riscos, você pode se sentir desconfortável em responder alguma questão dentro dos questionários. O profissional que estará acompanhando a senhora estará treinado e habilitado para fornecer informações referentes à pesquisa e esclarecer dúvidas quanto aos questionários. 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 a confidencialidade dos dados de identificação pessoal. Os resultados serão divulgados de maneira agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participam do estudo.

No futuro, essas características que estão sendo estudadas poderão auxiliar no melhor entendimento do desenvolvimento da pré-eclâmpsia para que assim se obtenha melhoras no tratamento e prevenção desta doença. Em relação aos resultados das análises feitas nas amostras de sangue e dos tecidos coletados, eles não trarão benefícios diretos para você.

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. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo, bem como a senhora não terá nenhuma despesa para participar do projeto, mas todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Está assegurada a indenização diante de eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa. 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 33038753/981401240, e Érika Leotério, da UFCSPA, no telefone 51 984176464. Este projeto foi revisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA e da ISCMPA, sendo que a senhora poderá entrar em contato para esclarecimentos se assim o desejar.

CEP da UFCSPA: telefone (51) 3303.8804, endereço: Rua Sarmento Leite, 245, Prédio 3, sala 407, Porto Alegre – RS. E-mail: cep@ufcspa.edu.br. De segunda à sexta, das 8h às 17h.

CEP da ISCMPA, telefone (51) 3214.8571, endereço: Av. Independência, 155 – 6º andar – HDVS-Porto Alegre -RS. E-mail: cep@santacasa.tche.br. De segunda à sexta, das 9h às 12h e das 13h30 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 atendimento médico e nos meus direitos legais;
- 5) Receberei uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado e datado.

Nome da Participante de Pesquisa: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____.

Nome do Responsável por obter o TCLE: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____.

Identificação da proposta

Pesquisa científica

Título

Validação da metodologia de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) para detecção de *Histoplasma capsulatum*

Palavras chave

Histoplasmose, LAMP, Diagnóstico molecular

Resumo

Histoplasmose é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum* que, apesar de ter uma distribuição mundial, apresenta áreas de maior endemicidade sendo prevalente na América do Sul, incluindo o Brasil. Apresenta diversas formas clínicas sendo os sintomas mais frequentes semelhantes à tuberculose, o que dificulta a suspeita clínica. Ainda, a forma disseminada e mais grave, acomete principalmente os indivíduos HIV+ sendo importante, especialmente neste grupo um diagnóstico rápido e preciso. Atualmente o diagnóstico se baseia em exame direto e cultivo, além de teste sorológico. Porém estes testes podem ser demorados e de baixa sensibilidade. Métodos moleculares têm sido sugeridos para o diagnóstico, porém devido à falta de acurácia não são estabelecidos como método padrão ouro. Além disso, as metodologias disponíveis são trabalhosas e de alto custo. No ano 2000 a técnica molecular *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) foi descrita e, se baseia em uma reação isotérmica para amplificação do DNA, apresentando algumas vantagens em relação ao PCR, dentre elas baixo custo, boa sensibilidade e especificidade e rapidez na realização da técnica. Desta forma, a validação de metodologias baseada na amplificação de DNA para o diagnóstico de histoplasmose acessível a diferentes serviços de saúde se faz necessária e vai ao encontro à proposição 100 por 2025, definida na Declaração de Manaus em Histoplasmose nas Américas e Caribe, em 2019, organizada pela *Global Action for Fungal Infections* (Gaffi), que define que todos os países devem ter acesso a testes rápidos para o diagnóstico de histoplasmose. O objetivo do projeto é validar a metodologia LAMP para detecção de *H.capsulatum* a partir de isolados. Serão utilizados isolados previamente identificados da micoteca do laboratório de Micologia da Santa Casa. Para a técnica de LAMP, será utilizado um conjunto de primers já descrito na literatura. Será validada as condições ótimas da

reação em relação a concentração dos reagentes, volume da reação, tempo de incubação para realização da leitura visual. Ainda, será validada a sensibilidade e especificidade da reação.

Dados do proponente

Biomédica, mestre em diagnóstico genético e molecular e doutora em biologia celular e molecular. Professora adjunta das disciplinas de Parasitologia e Micologia da UFCSPA. Tem experiência na área de diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas, atualmente com foco no diagnóstico molecular. Colaboradora do grupo de pesquisa "Aspectos moleculares na caracterização e tratamento de doenças multifatoriais" atuando na linha de Micologia Molecular, constituída em 2021, em parceria com as professoras doutoras Vanessa Suñe Mattevi e Cecília Bittencourt Severo. Dentro desta linha, atualmente é co-orientadora de um projeto de mestrado que tem como objetivo trabalhar com a validação da técnica de LAMP em isolados de levedura. O presente projeto conta com a colaboração da professora e pesquisadora Dr^a Melissa Orzechowski Xavier, docente da faculdade de medicina da Universidade Federal do Rio Grande e do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FURG, que irá contribuir com isolados da micoteca do laboratório de micologia do hospital universitário.

Caracterização da proposta

Infecções sistêmicas causadas por fungos são importantes e estão muitas vezes associadas a uma alta taxa de morbidade e mortalidade. O diagnóstico é um desafio pois em muitas situações são similares a infecções bacterianas desenvolvendo-se na mesma população alvo e, exibindo o mesmo espectro clínico. Uma comparação clássica é de histoplasmose *versus* tuberculose, que são duas infecções extremamente similares do ponto de vista clínico, radiológico e histopatológico, o que gera equívocos terapêuticos (Hage; Wheat, 2010; Zollner et al., 2010). Devido às dificuldades de diferenciação clínica, uma revisão sistemática demonstrou que 1167 pacientes foram testados para ambas as infecções. Ainda, importante destacar que em 10,37% destes pacientes as infecções coexistiam (Almeida et al. 2019).

Histoplasmose é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum*, que facilmente dispersa seus conídios pelo ambiente aéreo e, estes ao serem inalados podem infectar o hospedeiro humano. O agente causador, *H. capsulatum*, é encontrado em solo contendo grande quantidade de excretas de aves, como galinhas e de morcegos (Kauffman, 2007; Wheat et al.,

2007). Entretanto, o fungo pode se dispersar por correntes áreas atingindo inclusive a população que não tem contato direto com o nicho ecológico do agente.

Apesar de ter uma distribuição mundial, apresenta áreas de maior endemicidade principalmente na região de Ohio e vale do lago do Mississipi e em grande parte da América Latina. Na América Latina, as áreas de maior prevalência para a histoplasmosse são Venezuela, Equador, Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. No Brasil, a infecção é descrita em casos esporádicos, tendo relatos de surtos no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Rossini e Goulart, 2006). Segundo Almeida et al (2019), a histoplasmosse é endêmica em todas as regiões do Brasil, sendo mais frequente no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Casos de histoplasmosse humana foram reportados em 19 dos 26 estados brasileiros, incluindo o Distrito Federal. Esta micose sistêmica, apesar de endêmica nas Américas, também vem sendo identificada em outras partes do mundo, principalmente por causa da população HIV positivo (Colombo et al., 2011).

A tuberculose já é uma condição bem conhecida e sempre lembrada pelos clínicos já, a histoplasmosse, foi considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma micose negligenciada. Por não ser uma doença de notificação obrigatória, dados de incidência e prevalência, bem como de morbidade e mortalidade muitas vezes não estão disponíveis ou estão subestimados em muitas áreas endêmicas.

As características demográficas (altitude, temperatura e hidrografia) da depressão central do Rio Grande do Sul favorecem o nicho ecológico do *H. capsulatum*. Este dado já foi confirmado devido à casuística do estado, sendo que o Rio Grande do Sul atualmente recebe a denominação de região endêmica de histoplasmosse, particularmente no vale do rio Jacuí, onde cepas de *H. capsulatum* já foram isoladas do solo e, 18-89% dos homens jovens foram reagentes ao teste da histoplasmina (Severo et al, 2001).

O espectro clínico da histoplasmosse é variável, influenciado pelo tempo e quantidade de exposição aos propágulos fúngicos, idade do paciente bem como o estado imunológico e, a presença de doenças pulmonares crônicas prévias a infecção fúngica (Wheat et al., 2007). As formas mais graves devido aos riscos de sequelas ou de mortalidade são, a forma cavitária crônica, geralmente associada a indivíduos com desordem pulmonar prévia e, disseminada (Wheat et al., 2007). Esta última tem ocorrência em pacientes imunocomprometidos, principalmente indivíduos HIV positivos, uso de corticosteróides ou antagonistas de fator de necrose tumoral ou, com alguma deficiência congênita de células T (Colombo et al., 2011).

O Brasil é o maior país da América Latina e atualmente vivendo uma epidemia de infecção por HIV, com aproximadamente 1.000.000 de casos. Muitas vezes o diagnóstico de HIV é tardio o

que favorece o desenvolvimento de infecções oportunistas. De acordo com um estudo realizado por Pacheco et al. (2019) as infecções oportunistas mais frequentes antes do início da terapia antirretroviral no Brasil foram penumocistose, toxoplasmose cerebral, tuberculose e histoplasmose (Pacheco et al., 2019). Em países em desenvolvimento estima-se que a tuberculose tem uma incidência de 1.1 milhão de pacientes co-infectados e 350.000 mortes anual. Já a histoplasmose, em áreas endêmicas, alcança uma prevalência de 5% por ano na população infectada por HIV+ (Agudelo et al. 2012). Cabe destacar que, no Brasil, a prevalência de co-infecção por *H.capsulatum* em pacientes HIV+ é mais frequente, em relação à tuberculose, conforme diminui a quantidade de células TCD4+ (Falci et al., 2019).

O diagnóstico da histoplasmose muitas vezes é difícil. Biópsia de aspirado de medula óssea ou adrenal é usualmente necessário para obter amostra para exame direto, cultivo e histopatologia (Queiroz-Telles et al. (2017). Cultivo é potencialmente perigoso pelo risco de contaminação dos profissionais do laboratório e requer um laboratório de nível de biossegurança 3, além de requerer em torno de 1 a 6 semanas de incubação, resultando em atraso para início do tratamento. Porém, este ainda é o método de referência para a forma disseminada. Embora a especificidade do cultivo seja de 100%, a sensibilidade é dependente da carga fúngica presente na amostra. Logo, este método não é eficaz para diagnóstico primário em pacientes imunocompetentes onde a carga fúngica costuma ser baixa (Oladele et al. 2018).

A histopatologia, se obtida a amostra adequada, é um método rápido que pode sugerir o diagnóstico de histoplasmose, porém não confirmar, quando utilizado isoladamente. A não confirmação ocorre pois outros patógenos podem se apresentar de forma semelhante ao *H.capsulatum*. Detecção de anticorpo por imunodifusão ou fixação do complemento é particularmente eficaz nas formas assintomáticas ou pulmonar crônica da histoplasmose onde a carga fúngica é baixa, porém, não tem boa sensibilidade no paciente HIV+ ou outra condição que leve a diminuição ou não funcionamento das células TCD4+. Além de apresentar reação cruzada com outros patógenos, entre eles *Mycobacterium tuberculosis* (Wheat L J, 2006; Oladele et al. 2018).

Métodos moleculares têm sido reportados para o diagnóstico de histoplasmose, porém devido à falta de acurácia não são estabelecidos como método padrão ouro para o diagnóstico. Além disso, os métodos atuais requerem uma estrutura de laboratório sofisticada, equipamentos de alto custo e profissional capacitado muitas vezes não disponível em países ou regiões em que o patógeno fúngico é endêmico. Desta forma, a implementação de novos procedimentos diagnósticos que sejam sensíveis e específicos, rápidos de realizar e de baixo custo são um desafio para aumentar

o acesso ao diagnóstico das micoses negligenciadas (Wheat, L.J., 2006). Ainda procedimentos moleculares acessíveis e de baixo custo também atende à proposição 100 por 2025, definida na Declaração de Manaus em Histoplasmoses nas Américas e Caribe, em 2019, organizada pela *Global Action for Fungal Infections* (Gaffi). Nesta declaração, está definido que todos os países tenham acesso a testes rápidos (antígeno ou PCR/molecular) para o diagnóstico de histoplasmoses (Gaffi, 2022).

Em 2000, Notomi et al. descreveram uma técnica molecular *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) que se baseia em uma reação isotérmica para amplificação do DNA. A amplificação de ácidos nucleicos via LAMP tem uma série de vantagens em relação ao PCR. Primeiro, LAMP não requer um termociclador, uma vez que o ensaio é realizado em uma única temperatura utilizando-se um bloco de aquecimento ou um banho-maria. Reações são rápidas levando algumas vezes em torno de 60 minutos, realizadas em um tubo único e a leitura é realizada visualmente quanto a presença ou não de turvação no tubo ou por colorimetria. Além de ser uma técnica rápida, custo efetiva por não requerer equipamentos sofisticados, também tem acurácia por utilizar de dois a três pares de primers em uma mesma reação altamente específica e sensível. Além disso, a técnica de LAMP pode ser utilizada para detectar o patógeno isolado em cultivo ou diretamente da amostra biológica.

Esta metodologia já vem sendo aplicada na microbiologia para identificação de bactérias e detecção de genes resistentes (Yamamoto et al. 2015), detecção de fungos anemófilos e de fungos patogênicos (Chen 2016; Noguchi 2017; Yamamoto 2018). Para detecção de *M. tuberculosis* já tem relato na literatura da utilização da técnica a partir de amostra biológica (Rodríguez-García et al., 2018). Porém, nenhum estudo com isolados ou amostras da região sul. Para *H. capsulatum* tem um estudo na literatura demonstrando a eficácia da técnica em identificar o agente fúngico a partir de cultivo e amostra de urina. A técnica apresentou boa sensibilidade e especificidade, não apresentando reação cruzada com diferentes fungos testados e *M. tuberculosis* (Scheel et al., 2014). O limite de detecção variou entre 10 fg/uL a 1 pg/uL (1 a 30 genoma por reação) e, a técnica quando comparada ao PCR convencional foi 10 x mais sensível. Porém o número de amostras clínicas testadas foi baixo e, a técnica apresentou limitações de acordo com a subespécie do patógeno utilizado. Esta variação genética do patógeno justifica a padronização da técnica em cada região uma vez que o genótipo do fungo pode variar de acordo com a localização geográfica. A padronização de uma técnica de baixo custo pode agilizar e facilitar o acesso ao diagnóstico para a população mais predisposta a infecção por *H. capsulatum*, bem como para as regiões onde a falta de infraestrutura dificulta o diagnóstico.

Objetivos e metas

Objetivo geral

Validar a metodologia LAMP para detecção de *H.capsulatum* a partir de isolados.

Objetivos específicos

- Validar conjunto de primer já descrito na literatura em isolados de *H.capsulatum* provenientes do Rio Grande do Sul;
- Padronizar a metodologia LAMP em cepa padrão e isolados clínicos dos patógenos *H.capsulatum*;
- Determinar a sensibilidade de detecção da reação para os isolados.

Metodologia e estratégia de ação

Amostras

Serão utilizados 20 isolados de *H.capsulatum* provenientes da micoteca do laboratório de micologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e do laboratório de micologia do Hospital Universitário de Rio Grande. Os microorganismos foram previamente identificados na rotina dos serviços a partir do isolamento em cultivo em ágar Sabouraud e posterior análise da macroscopia e da microscopia. A manipulação dos cultivos será realizada no laboratório 205 - prédio 1 (Parasitologia e Micologia) que possui uma cabine de fluxo laminar.

Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop

Para amplificação dos isolados através da técnica de LAMP serão utilizados um conjunto de primers. Os primers utilizados para validação foram descritos por Zatti et al. 2019 e já foram adquiridos pelo grupo de pesquisa. Serão comparadas, utilizando-se bancos de dados de domínio público, sequências de genomas de isolados da região sul com isolados de outras localidades para identificar se existe variabilidade genômica para fins de verificar *in vitro* a especificidade dos primers descrito na literatura. A etapa de extração de DNA, para a reação de LAMP, se dará a partir de uma suspensão dos microorganismos correspondente a escala 5 de McFarland, aquecido por 15 a 30 minutos a 99° C antes da amplificação. Para etapa de amplificação será adicionado 1.6 uM (cada) FIP e BIP primers, 0,2 mM (cada) F3 e B3, 3.2 U *Bst* polimerase, 900 µM de cada dNTP, 0,8M de betaína, 3 mM de MgCl₂ e tampão para um volume final de 10 uL. As condições ótimas para reação de amplificação quanto a concentração dos reagentes e tempo de aquecimento para amplificação do produto serão validadas durante a execução do trabalho. A leitura da amplificação

será realizada visualmente a partir de um indicador de cor onde a reação negativa permanece na coloração pink e, a reação positiva torna-se amarela.

Para fins de determinar a especificidade da reação serão utilizados isolados de outros gêneros de fungos: *Trichosporon* sp, *Cryptococcus* sp, *Rhodotorula* sp, *Saccharomyces* sp, *Geotrichum* sp, *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp, *Paracoccidoides* sp, *Mucor* sp, *Candida* sp. Para determinação do limite de sensibilidade da reação será realizada uma diluição em série de 10X (de 1 ng a 1 fg) do DNA dos isolados e, realizada a reação de amplificação. Para todas as etapas, os ensaios serão realizados em duplicata e, serão incluídos como controle negativo DNA humano e um tubo sem DNA.

A etapa de validação da técnica de LAMP será realizada no laboratório de Biologia Molecular (laboratório 304 - prédio 3).

Etapas de execução do projeto com cronograma

Etapa 1. Revisão bibliográfica

Revisão da literatura para avaliação da metodologia de LAMP no que diz respeito a conjunto de primers utilizados, condições de reação, alternativas de leitura do resultado do teste.

Etapa 2. Obtenção dos isolados

Recuperação dos isolados provenientes da micoteca dos laboratórios participantes para crescimento em meio de cultura.

Etapa 3. Otimização da reação e validação da técnica

Obtenção do conjunto de primers já descrito na literatura e padronização das condições da reação de LAMP. Se necessário, nesta etapa será realizado o desenho de novo conjunto de primers com base nas sequências dos isolados obtidos do Rio Grande do Sul. Após padronizada a condição da reação, será realizada a etapa de validação do teste com a aplicação do teste em pelo menos 20 isolados de *H.capsulatum*. Também será determinada a sensibilidade e especificidade da metodologia.

Etapa 4. Análise e publicação dos resultados

Nesta etapa será realizada a análise estatística e correlação dos resultados para elaboração de publicação científica tais como artigos e resumos para congresso.

	Ano											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Obtenção dos isolados em cultura e extração de DNA		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Desenho dos primers			x	x	x							
Padronização da reação					x	x	x	x	x	x	x	x
Validação da técnica								x	x	x	x	x
Análise dos resultados						x	x	x	x	x	x	x
Análise estatística										x	x	x
Elaboração artigo científico										x	x	x

Produtos esperados como resultado da execução do projeto

A partir da execução do projeto, espera-se padronizar uma metodologia baseada na detecção de DNA para o diagnóstico de histoplasmose, que pode ser aplicada na rotina laboratorial como diagnóstico. Ainda, a partir da execução do projeto como produto prevê-se a elaboração de artigos, participação em congressos através do envio de resumos, além de orientação de dissertação de mestrado.

Potencial de Impacto dos Resultados do Ponto de Vista Técnico científico, de inovação e/ou difusão

Com a execução do projeto, espera-se padronizar e otimizar a metodologia de LAMP para detecção de isolados de clínicos de *H.capsulatum*, provenientes da região sul do Brasil, além de estabelecer o limite de detecção da técnica.

Com a padronização desta metodologia, contribui-se para um melhor suporte ao diagnóstico de histoplasmose especialmente atendendo uma população vulnerável em que um diagnóstico preciso e rápido se faz necessário para início de um tratamento adequado. Sendo a técnica de LAMP de baixo custo, não necessitando de equipamentos sofisticados e, altamente sensível e específica, acredita-se que esta metodologia possa ser implementada em laboratórios de médio e

pequeno porte bem como possa ser oferecida como alternativa de diagnóstico ao Sistema Único de Saúde (SUS), atendendo regiões mais distante de grandes centros. A oferta de métodos diagnósticos de fácil execução e baixo custo contribuem para o acesso ao diagnóstico de infecções que muitas vezes acometem indivíduos moradores de zonas rurais e, que muitas vezes não têm acesso a grandes centros.

Como resultado e impacto esperado, a partir da validação da metodologia em isolados clínicos espera-se padronizar a metodologia em amostras clínicas, agilizando o diagnóstico destas infecções. Esta é uma perspectiva de continuidade do projeto, além da padronização da técnica para detecção de outros microrganismos.

Orçamento

Produto	Quantidade	Valor unitário	Total
Warmstart colorimetric LAMP 2x master mix - 100 reações	3	2.370,49	7111,48
Ponteiras com filtro 1 - 200 uL (10 caixas de 96 u)	2	1339,50	2679,00
Ponteiras com filtro 0,1 - 10 uL (10 caixas com 96 u)	1	1390,50	1390,50
			11.180,98

* o conjunto de primers já foi adquirido com orçamento de outro projeto.

Referências Bibliográficas

ADENIS, A.; NACHER, M.; HANF, M.; et al. Tuberculosis and histoplasmosis among human immunodeficiency virus-infected patients: A comparative study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 216–223, 2014.

AGUDELO, C. A.; RESTREPO, C. A.; MOLINA, D. A.; et al. Tuberculosis and histoplasmosis co-infection in AIDS patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 1094–1098, 2012.

ALMEIDA, M. DE A.; ALMEIDA-SILVA, F.; GUIMARÃES, A. J.; ALMEIDA-PAES, R.;

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 147–156, 2019. International Society for Infectious Diseases. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.009>>.

COLOMBO, A. L.; TOBN, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 2011.

FALCI, DI. R.; MONTEIRO, A. A.; BRAZ CAURIO, C. F.; et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living with HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 4, 2019.

GLOBAL ACTION FOR FUNGAL INFECTIONS - GAFFI disponível em www.gaffi.org, 2022.

GUTIERREZ, M. E.; CANTON, A.; SOSA, N.; PUGA, E.; TALAVERA, L. Disseminated Histoplasmosis in Patients with AIDS in Panama: A Review of 104 Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 8, p. 1199–1202, 2005.

HAGE, C. A.; WHEAT, L. J. Editorial: Diagnosis of pulmonary histoplasmosis using antigen detection in the bronchoalveolar lavage. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 4, n. 4, p. 427–429, 2010.

HUBER, F.; NACHER, M.; AZNAR, C.; et al. capsulatum infection : 25 years experience of French Guiana. **Aids**, , n. January, 2008.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 115–132, 2007.

L.J., W. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. **Transplant Infectious Disease**, v. 8, n. 3, p. 128–139, 2006. Disponível em : <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44201948%0Ahttp://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2006.00165.x%0Ahttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?>

sid=EMBASE&issn=13982273&id=doi:10.1111%2Fj.1399-3062.2006.00165.x&atitle=Antigen+de
> . .

MUÑOZ-OCA, J. E.; VILLARREAL MORALES, M. L.; NIEVES-RODRIGUEZ, A.; MARTÍNEZ-BONILLA, L. Concomitant disseminated histoplasmosis and disseminated tuberculosis after tumor necrosis factor inhibitor treatment: A case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2017. BioMed Central Ltd.

OLADELE, R. O.; AYANLOWO, O. O.; RICHARDSON, M. D.; DENNING, D. W. Histoplasmosis in Africa: An emerging or a neglected disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006046>>.

PACHECO, P. R. G.; ZARA, A. L. S. A.; SILVA E SOUZA, L. C.; TURCHI, M. D. Late Onset of Antiretroviral Therapy in Adults Living with HIV in an Urban Area in Brazil: Prevalence and Risk Factors. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2019, p. 1–8, 2019. Hindawi Limited.

QUEIROZ-TELLES, F.; FAHAL, A. H.; FALCI, D. R.; et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7)>.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, Á.; MARES, R.; MUÑOZ, P.; et al. DNA Extraction with DNAzol and LAMP, Performed in a Heating Block as a Simple Procedure for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum Specimens. **Methods and Protocols**, v. 1, n. 4, p. 37, 2018.

SCHEEL, C. M.; ZHOU, Y.; THEODORO, R. C.; et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of Histoplasma capsulatum DNA in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 483–488, 2014.

WHEAT, L. J.; FREIFELD, A. G.; KLEIMAN, M. B.; et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 7, p. 807–825, 2007.

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, ALSHAMI MM, TAMURA T, SATOH K, IGUCHI S, KIKUCHO K, MIMAKI M, MAKIMURA K. Rapid detection of *Candida auris* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **J Clin Microbiol** 56:e00591-18, 2018.

ZATTI MS, ARANTES TD, FERNANDES JAL et al. Loop-mediated Isothermal Amplification and nested PCR of the Internal Transcribed Spacer (ITS) for *Histoplasma capsulatum* detection. **PLoS Negl Trop Dis**. 13(8):e0007692, 2019.

ZÖLLNER, M.S.A.C.; PINTO, K.M.; REZENDE, C. et al. Características clínicas evolutivas de quatro pacientes com histoplasmose pulmonar encontrado na Região do Vale do Paraíba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43: 599-601, 2010.

**COMPARAÇÃO ENTRE AS ABORDAGENS DIAGNÓSTICAS DE RT-PCR E TESTE SOROLÓGICO
RÁPIDO EM PACIENTES COM SUSPEITA DE COVID-19: INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS
NO DIAGNÓSTICO, DURAÇÃO DA RESPOSTA SOROLÓGICA E DESFECHOS CLÍNICOS DA
DOENÇA.**

Pesquisadora responsável: Júlia Pasqualini Genro.

Porto Alegre, abril de 2022.

EQUIPE

Professora proponente: Profª Drª Júlia Pasqualini Genro.

Colaboradores da UFCSPA

Profª Drª Lucia Campos Pellanda: Médica, professora de Metodologia Científica da UFCSPA.

Profª Drª Marilu Fiegenbaum: Farmacêutica, professora de Genética Humana da UFCSPA.

Giulia Souza da Costa: Biomédica, aluna de mestrado do PPG Biociências da UFCSPA.

Gabriel Tassi Mousquer: Biomédico, aluno de mestrado do PPG Biociências da UFCSPA.

Colaboradores externos à UFCSPA

Bruna Pasqualini Genro: Bióloga, assistente do Serviço de Bioética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Rosimar da Rosa Minho dos Santos: Enfermeira, servidora da Secretaria Municipal de Saúde de Capão da Canoa (SMS-PMC).

Tatiana Jacobsen: Biomédica, funcionária do laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (SCMPA).

RESUMO

No Brasil, país de dimensões continentais e com grande desigualdade social, a pandemia de COVID-19 se apresenta como um grande desafio. Considerando a escassez dos recursos necessários para o teste de RT-PCR (padrão-ouro para o diagnóstico), os testes sorológicos rápidos vêm ganhando destaque como alternativa para testagem em massa da população, no intuito de um manejo mais eficiente da pandemia. A acurácia diagnóstica destes testes sorológicos têm se mostrado boa, embora identifique a infecção em estágios mais tardios e, portanto, seja pouco útil quando o objetivo é minimizar a propagação do vírus. Além disso, outras questões permanecem incertas em relação a estes testes como, por exemplo, o comportamento dos anticorpos ao longo da infecção e após a cura, e a relação entre seus resultados e os da RT-PCR. Ainda, supõe-se que a resposta variável do organismo ao vírus esteja relacionada às variações no sistema imunológico e inflamatório, portanto, polimorfismos em genes relacionados a estes mecanismos biológicos podem influenciar tanto nos resultados dos testes como nos desfechos clínicos. O objetivo do presente estudo é comparar os resultados do teste molecular de RT-PCR com os resultados do teste sorológico rápido, avaliar a evolução da resposta sorológica ao longo do tempo e investigar se a variabilidade genética dos pacientes influencia na resposta desses testes e nos desfechos clínicos. O presente projeto propõe um estudo prospectivo longitudinal, cuja amostra será composta por pacientes com suspeita de infecção por SARS-CoV-2 testados através da metodologia de RT-PCR na Unidade de Isolamento COVID-19 da Secretaria Municipal de Saúde de Capão da Canoa, município do litoral norte do Rio Grande do Sul. O estudo está dividido em 4 momentos: (1) realização do teste sorológico rápido dentro de 48 horas da coleta do material para diagnóstico assistencial através do teste de RT-PCR e coleta de sangue venoso para a extração de DNA; (2) repetição do teste sorológico 15 dias após a coleta do material para o teste de RT-PCR; (3) retorno do paciente 2 meses após a coleta do material para o teste de RT-PCR para repetição do teste sorológico rápido; (4) retorno 8 meses após a coleta do material para o teste de RT-PCR para repetição do teste sorológico rápido. A partir das amostras de DNA, iremos avaliar se polimorfismos em genes envolvidos nas vias biológicas de infecção, inflamação e resposta imune ao vírus influenciam a resposta dos testes e desfechos clínicos. Os resultados do presente estudo poderão contribuir para a otimização e melhor delineamento dos testes como ferramenta diagnóstica, bem como para a detecção de marcadores que facilitem o diagnóstico e manejo dos pacientes, além de permitir a identificação de fatores específicos da população brasileira.

Palavras chave: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PCR, teste sorológico, anticorpos, genética.

1. INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19 no Brasil e no mundo

O surto de SARS-CoV-2, surgido ao fim do ano de 2019, revelou uma nova e contagiosa cepa de vírus respiratório que, em pouco tempo, expandiu pelo globo e desafiou o sistema de saúde mundial em muitos aspectos. SARS-CoV-2 é o agente causador da COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), doença caracterizada por quadros de síndrome gripal leve em suas formas brandas e, nos casos mais severos, é causa da síndrome respiratória aguda grave - SRAG (no inglês, SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome). Desde março de 2020, a COVID-19 foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial de Saúde (Organização Mundial da Saúde, 2020; Raoult et al., 2020). Ainda é escasso o conhecimento sobre os fatores endógenos e exógenos que influenciam os seus desfechos clínicos e a resposta imunológica da população frente a esta infecção. Um subdiagnóstico massivo também dificulta o conhecimento sobre sua propagação e impactos na saúde mundial (Raoult et al., 2020; Zhao et al., 2020; Lachmann, et al., 2020).

O Brasil tem atingido, diariamente, recordes em relação à pandemia e atualmente é o terceiro país no mundo com maior número de casos e segundo em óbitos decorrentes da COVID-19 (Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, 2020). Considerando os grupos com risco aumentado de desenvolver as formas mais graves da COVID-19, aproximadamente 20% da população mundial está suscetível à infecção grave. Quase 350 milhões de pessoas demandarão hospitalização se infectadas (Clark et al., 2020), o que representa um iminente risco de colapso dos sistemas de saúde no cenário de expansão descontrolada e contaminação simultânea da população (Wu & Mcgoogan, 2020). Diante deste quadro, os testes diagnósticos possuem um papel central, visto que são ferramenta essencial para obtenção de dados de prevalência dos afetados, propagação do vírus e definição de estratégias de saúde pública para sua contenção (Wu & Mcgoogan, 2020; Organização Mundial da Saúde, 2020).

1.2 Diagnóstico de COVID-19

O teste de RT-PCR é a metodologia direta para pesquisa de SARS-CoV-2 baseada na detecção da sequência viral por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa. Este método é o padrão-ouro para diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e é realizado através da análise de amostras de swab nasal e faríngeo, lavagem broncoalveolar ou plasma sanguíneo. Deve ser aplicado preferencialmente entre os dias 2 e 6 do início da manifestação da infecção (Ministério da Saúde, 2020; Li et al., 2020; He et al., 2020). Em que pese a eficácia dos testes moleculares na detecção do RNA viral para diagnóstico da infecção ativa por SARS-CoV-2, existem algumas dificuldades importantes no emprego da RT-PCR, entre elas, está a demanda por insumos e instalações laboratoriais especializadas, além de equipe técnica qualificada. Outro obstáculo é o tempo demandado para processamento e liberação do resultado (Ministério da Saúde, 2020).

Para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 também podem ser empregados os testes rápidos sorológicos, que tanto podem ser diretos, detectando antígenos específicos do vírus, quanto indiretos, detectando anticorpos produzidos pelo organismo do hospedeiro contra o vírus. Desde o início da pandemia, os testes de anticorpos têm assumido um papel central entre os métodos sorológicos rápidos. Estes testes baseiam-se em imunoensaio cromatográficos para a pesquisa de anticorpos IgM e IgG (imunoglobulinas M e G) específicos. Por não demandarem nenhuma estrutura especializada, pela velocidade dos resultados, facilidade de execução e menor custo quando comparados às outras metodologias, os testes rápidos sorológicos têm se mostrado interessantes (Patel et al., 2020). A ANVISA recebe um número crescente de pedidos de registro de testes rápidos baseados em imunocromatografia (Ministério da Saúde, 2020). Dependendo da opção entre as disponíveis no mercado, estes testes podem detectar a

presença dos anticorpos do tipo IgG e IgM na amostra, ou ainda, detectar separadamente a presença dos dois tipos de anticorpos.

Quando comparados aos testes moleculares, os testes sorológicos rápidos se apresentam menos sensíveis e específicos mas, ainda assim, demonstram uma boa acurácia diagnóstica (Castro et al., 2020). Todavia, possuem a capacidade de identificar a infecção em estágios mais tardios, em razão do desenvolvimento e detectabilidade dos anticorpos, impondo importantes limitações ao uso dos testes com o objetivo de diminuir a propagação do vírus (Patel et al., 2020; Xiao et al., 2020). Os testes rápidos também vêm sendo sugeridos como uma ferramenta para presumir imunidade adquirida, mas o comportamento e duração destes anticorpos, tanto ao longo da infecção como após a cura, permanece pouco compreendido (Zhao et al., 2020; Raoult et al., 2020; Long et al., 2020; Robbiani et al., 2020).

1.3 COVID-19 e a genética do hospedeiro

Independente dos grupos de risco, a COVID-19 pode apresentar manifestações bastante distintas entre a população. Enquanto alguns indivíduos não apresentam sintomas da doença, ainda que sejam capazes de transmiti-la, outros desenvolvem um quadro sintomático grave, com comprometimento das funções vitais (Shi et al., 2020; Antonio et al., 2020). Essa heterogeneidade na suscetibilidade ao vírus, tal como no prognóstico e no desfecho da COVID-19, é característica das doenças multifatoriais de herança genética complexa. Logo, não podemos desprezar o papel que a genética do hospedeiro pode desempenhar no curso da infecção e nos desfechos clínicos (Tay et al., 2020). Em que pese o perfil clássico de hospedeiro para as formas mais graves, alguns pacientes fora deste perfil e aparentemente hígidos apresentam resposta inflamatória exacerbada e a doença grave (Golonka et al., 2020). Atualmente, carecem evidências não apenas sobre os fatores que levam a estas variações, como também, qual é sua relação com a resposta humoral nos indivíduos.

Um papel determinante na patologia da COVID-19 envolve o sistema imunológico do hospedeiro, sendo que pacientes em estado grave manifestam resposta inflamatória intensa, incluindo episódios de hipercitocinemia e inflamação sistêmica (Golonka et al., 2020; Costela-Ruiz et al., 2020; Rodríguez et al., 2020). É bastante provável que esta resposta do organismo esteja vinculada a variações no sistemas imunológico e inflamatório dos indivíduos. Deste modo, polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas nestes sistemas podem estar influenciando tanto nos desfechos clínicos da doença como nos resultados dos testes diagnósticos (Prompetchara et al., 2020; Qin et al., 2020). Um estudo de associação genômica realizado na população europeia reuniu amostras de 1980 pacientes com a forma grave da COVID-19. Analisando mais de 8 milhões de SNPs (*single nucleotide polymorphism*), os pesquisadores encontraram associação com duas regiões do genoma. Uma delas envolvia os genes *SLC6A20*, *LZTFL1*, *CCR9*, *FYCO1*, *CXCR6*, e *XCR1*. A segunda região associada foi onde se localiza o gene *ABO* (Ellinghaus et al., 2020). Outro estudo recente de associação genômica, que incluiu amostras de 2.244 pacientes do Reino Unido com COVID-19 grave, identificou associação significativa com o polimorfismo rs10735079, em um grupo de genes que codifica ativadores de enzimas de restrição antivirais (*OAS1*, *OAS2* e *OAS3*), com rs74956615 próximo ao gene que codifica a tirosina quinase 2 (*TYK2*), com rs2109069 dentro do gene que codifica a dipeptidil peptidase 9 (*DPP9*) e com rs2236757 no gene do receptor de interferon *IFNAR2* (Pairo-Castineira et al., 2020).

Mesmo dentro da população brasileira, é possível identificar algumas discrepâncias entre a quantidade de óbitos e indivíduos infectados nos grandes centros urbanos quando comparados com os registros do mesmo período para as comunidades indígenas; aparentemente, os indígenas são mais vulneráveis à COVID-19 e, apesar das evidentes diferenças socioculturais envolvidas, a genética pode estar contribuindo nessa equação (Ferrante & Philip, 2020). De fato, já existem consórcios internacionais realizando a análise genômica em massa das vítimas da pandemia, no entanto, dada a miscigenação que forjou a população brasileira, e que não existem estudos genéticos em nossa população, torna-se evidente a necessidade por estudos nacionais aprofundados sobre o tema (Ellinghaus et al., 2020; Pairo-Castineira et al., 2020; Patrick et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA

A pandemia causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) é uma emergência de saúde pública de importância internacional com o mais alto nível de alerta da Organização Mundial da Saúde. As atuais taxas de prevalência demonstram que o Brasil é o novo epicentro global da COVID-19. A pandemia também tem refletido social e economicamente de forma importante. A falência de pequenas empresas e o grande número de trabalhadores autônomos e informais sem um sistema de proteção social que os ampare têm levado ao aumento da fome, exacerbando a ameaça à saúde pública. Estudos que forneçam mais informações acerca desta doença, especialmente no que diz respeito ao diagnóstico e caracterização do hospedeiro, são fundamentais para amparar políticas públicas de controle e mitigação dos danos neste cenário.

2.1 Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Não há produtos esperados como resultado da execução deste projeto.

2.2 Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

Os resultados do presente estudo poderão contribuir para a otimização e melhor delineamento dos testes como ferramenta diagnóstica e para o entendimento dos mecanismos biológicos da infecção por SARS-CoV-2. A comparação do teste molecular com sorológico poderá fornecer informações sobre o momento mais oportuno de aplicação dos testes na população e, caso seja detectada associação entre os resultados dos testes e os desfechos clínicos, esta informação poderá auxiliar futuramente no diagnóstico e prognóstico dos pacientes. Esta comparação também contribui para a vigilância em saúde, uma vez que a detecção mais precisa e precoce dos infectados auxilia no isolamento dos casos e redução do contágio. As análises de associação das variantes genéticas com a resposta dos testes e desfechos clínicos podem contribuir para a detecção de marcadores que facilitem o diagnóstico e manejo dos pacientes e para identificação de fatores específicos da população brasileira em relação à infecção, resultados dos testes e manifestações clínicas, podendo trazer evidências para novas estratégias diagnósticas e terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar os resultados do teste molecular de RT-PCR com os resultados do teste sorológico rápido, avaliar a evolução da resposta sorológica ao longo do tempo e investigar se a variabilidade genética dos pacientes influencia na resposta desses testes e nos desfechos clínicos.

3.2 Objetivos específicos

- a)** Comparar os resultados de testes sorológicos rápidos para detecção de anticorpos com o teste padrão ouro da RT-PCR;
- b)** Verificar se existe relação entre o resultado dos testes sorológicos e a evolução do quadro clínico dos pacientes com PCR positivo;
- c)** Avaliar a presença, evolução e duração da resposta sorológica ao longo do tempo nos pacientes com PCR positivo após a alta hospitalar;
- d)** Verificar se existe relação entre o resultado dos testes sorológicos e a evolução do quadro clínico dos pacientes com PCR negativo;
- e)** Avaliar a presença, evolução e duração desta resposta sorológica ao longo do tempo nos pacientes com PCR negativo após a alta hospitalar;
- f)** Comparar os desfechos clínicos entre pacientes com PCR negativo e positivo;

- g) Comparar os desfechos clínicos entre pacientes com teste sorológico positivo e negativo;
- h) Relacionar polimorfismos genéticos marcadores de vias biológicas de interesse com os desfechos clínicos (como gravidade dos sintomas e taxa de óbito) e com o diagnóstico molecular;
- i) Testar a associação entre estes marcadores genéticos e a presença e duração dos anticorpos verificados pelo teste sorológico rápido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

O presente projeto propõe um estudo prospectivo longitudinal desenvolvido com a colaboração da Secretaria Municipal de Saúde de Capão da Canoa (SMS-PMCC). A amostra será composta por pacientes com suspeita de infecção por SARS-CoV-2 testados através de metodologia de RT-PCR na Unidade de Isolamento COVID-19 do município. A inclusão dos pacientes será independente do resultado do teste de PCR. O recrutamento desses pacientes está previsto até fevereiro de 2022, estimando-se um tamanho amostral de 800 participantes. Destes, estima-se que metade da amostra (N=250) retorne após a alta hospitalar para os momentos 3 e 4 da pesquisa descritos abaixo. São critérios de inclusão: ter indicação assistencial para realização do teste molecular (RT-PCR) para diagnóstico de COVID-19; Ser maior de 18 anos. Não estão previstos critérios de exclusão para este estudo.

4.2 Desenho do estudo

Os pacientes que forem indicados para realização do teste diagnóstico de COVID-19 na Unidade de Isolamento COVID-19, conforme critérios assistenciais, serão convidados a participar do estudo através de um processo de consentimento realizado por um profissional da rede municipal de saúde e também membro da equipe de pesquisa.

No momento 1 será feito o convite e, após aceite, será realizada a assinatura do TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, quando também será solicitada autorização para coletar os dados do prontuário do paciente. Será aplicado, então, o teste sorológico rápido (explicado a seguir no item 4.3.2) dentro de 48 horas da coleta do material para teste de RT-PCR. Também será realizada a coleta de 5 mL de sangue venoso para a extração de DNA. Visando minimizar o grau de invasividade, esta pode ser uma alíquota adicional concomitante a qualquer outra coleta para exame de sangue que o paciente possuir indicação de realizar ao longo da consulta ou internação. Neste momento, serão levantadas algumas informações não registradas em prontuário que sejam potencialmente relevantes para a análise dos resultados, incluindo dados sociodemográficos e histórico familiar de comorbidades, através de questionário. Será agendado retorno para repetição do teste sorológico em 15 dias.

No momento 2, 15 dias após a coleta de RT-PCR, será realizado o segundo teste sorológico. Através de outro questionário, serão levantados dados de sintomas e isolamento social atualizados. Ainda, será agendado retorno para repetição do teste sorológico em 2.

O momento 3 será de 55 a 65 dias (média 2 meses) após a coleta de RT-PCR para realização do terceiro teste sorológico rápido e preenchimento da ficha de coleta de dados III sobre presença de sintomas e isolamento social. O paciente deverá comparecer ao mesmo local e realizar os mesmos procedimentos, encerrando sua participação na pesquisa.

4.3 Análises do material biológico

4.3.1 Teste molecular RT-PCR

Os testes de RT-PCR são realizados atualmente nos pacientes admitidos através do Sistema Único de Saúde (SUS) dentro dos critérios estabelecidos pela Secretaria Estadual de Saúde por intermédio do Comitê de Operações Emergenciais (COE-SES/RS), que atualmente consistem no seguinte: pacientes com síndrome respiratória aguda

grave (SRAG) independentemente do tempo de sintomas; pacientes com síndrome gripal do 1º ao 8º dia do início dos sintomas; indivíduos assintomáticos de Instituição de Longa Permanência de Idosos (ILPI) entre o 5º e o 10º dia do início dos sintomas do caso positivo (contactantes residentes de ILPI); indivíduos assintomáticos trabalhadores de estabelecimentos de saúde e gestantes entre o 5º e o 10º dia do último contato conhecido com o caso positivo.

Das amostras de swab de nasofaringe e orofaringe ou aspirado nasofaríngeo coletadas, o RNA do vírus será isolado para ser transcrito reversamente para cDNA e então analisado pela PCR nos laboratórios de referência. As amostras são enviadas ao Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN-RS), onde o procedimento de processamento segue protocolos estabelecidos de acordo com o preconizado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) para detecção de sequências específicas do SARS-CoV-2.

4.3.2 Teste sorológico rápido

O teste rápido sorológico que será utilizado neste estudo é o teste de fluxo lateral da Wondfo® para anticorpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2 (Wondfo® SARS-CoV-2 Antibody Test), aprovado pela ANVISA. Este teste consiste de um imunoensaio cromatográfico rápido qualitativo para a detecção anticorpos IgG/IgM anti-Coronavírus (COVID-19) em amostras de sangue total, soro ou plasma. O procedimento de testagem consistirá na coleta de uma gota de sangue total da extremidade do dedo, com o auxílio de uma lanceta. O resultado é gerado em 15 minutos após a adição da amostra e do reagente. Os testes já estão disponíveis e foram doados pelo Ministério da Saúde do Brasil e as estimativas de sensibilidade e especificidade foram descritas em estudo de validação independente realizado na população do Sul do Brasil, e são de 84,8% e 99,0%, respectivamente (Pellanda et al., 2020).

4.3.3 Análise genética

A extração de DNA dos pacientes será baseada na técnica de "Salting Out" (Lahiri & Numberger, 1991) no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA. Após, estas amostras de DNA serão quantificadas, terão a qualidade verificada e serão preparadas para envio a laboratório capacitado para realizar a genotipagem. A genotipagem será feita empregando-se a plataforma Global Screening Array 2.0 (Illumina), abrangendo aproximadamente 650 mil marcadores genéticos polimórficos distribuídos no genoma. Após a realização da genotipagem, será conduzida a imputação de variantes adicionais, utilizando as populações parentais depositadas no Projeto 1000 Genomas. Então, baseado em hipóteses biológicas prévias, serão extraídos polimorfismos genéticos (SNPs) relacionados aos seguintes mecanismos:

- a) Estabelecimento e progressão da infecção viral: como os genes *ACE2*, *AGTR2*, *Mx1*, *TMPRSS2*, *SLC6A20*, *LZTFL1*, *CCR9*, *FYCO1*, *CXCR6*, *XCR1*, *ABO* que codificam proteínas relacionadas à entrada e estabelecimento do vírus no organismo hospedeiro;
- b) Resposta imune do paciente: como genes do sistema HLA e de receptores envolvidos nesta resposta *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *RIG-I*, *MDA5*;
- c) Resposta inflamatória do paciente: como os genes *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-7*, *IL-10*, *IL-12*, *G-CSF*, *IP-10*, *MCP-1*, *MIP-1A*, *IFN γ* e *TNF α* que codificam citocinas e quimiocinas importantes na resposta.

4.3 Análise estatística

Os dados serão organizados em uma planilha do SPSS v. 20 para realização da análise estatística. As variáveis serão comparadas entre os grupos através de testes como qui-quadrado e teste exato de Fisher ou quando envolver variáveis quantitativas, testes de comparação de média (teste t e ANOVA ou seus respectivos testes não paramétricos). Para análise longitudinal, será usada a regressão de Cox multivariada. Na extração e análise dos

dados no que diz respeito à análise genética, as variantes comuns dos genes de interesse serão testadas a partir de um modelo genético aditivo utilizando regressão logística através do software PLINK. Para as demais análises de associação genética utilizaremos os softwares PLINK e MAGMA, que permitem análises de associação genética tanto a partir de genes individuais, como de variantes individuais e também de grupos de genes relacionados a uma mesma via biológica. A construção de escores de risco poligênicos será realizada quando houver estudos de associação genômica robustos já publicados, cujos resultados serão empregados para fazer a ponderação do escore em nossa amostra.

4.4 Aspectos éticos

Os pesquisadores se comprometem em conduzir a pesquisa em consonância com as diretrizes vigentes, de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde, em especial a CNS 466/2012 e a CNS 441/2011, zelando pela confidencialidade dos dados obtidos bem como pela privacidade e sigilo das informações dos participantes.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os relacionados à coleta de sangue, caso seja necessária uma coleta adicional, sendo possível algum desconforto ou dor leve, bem como formação de hematoma. As coletas para os testes rápidos são realizadas com uma lanceta na ponta do dedo dos participantes, sendo bastante superficial e, em geral, causando um leve incômodo. Adicionalmente poderá haver algum constrangimento do participante ao responder perguntas pessoais ou sobre a sua respectiva história clínica, bem como o inconveniente de ter dois retornos para repetir os testes rápidos, que acarretam em deslocamento dos participantes ao lugar indicado pela pesquisa.

Os potenciais benefícios associados à pesquisa são especialmente coletivos, tendo em vista que os resultados poderão ajudar a entender como as pessoas respondem ao vírus. Não estão previstos retornos quanto ao resultado dos exames genéticos, tendo em vista que as informações que serão analisadas não possuem nenhuma repercussão clínica direta para os participantes. O resultado do teste rápidos estará disponível para o participante em 15 minutos, indicando se o mesmo já tem anticorpos contra o vírus. Esta informação será explicada com cautela pelo pesquisador, pois embora possa ajudar a entender se a pessoa desenvolveu imunidade contra o vírus, a interpretação do resultado ainda é motivo de discussão na literatura científica neste momento, sendo, por esta razão, um dos objetivos do presente estudo.

5. CRONOGRAMA

Atividade	2022			2023								
	out	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set
Revisão bibliográfica.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Recrutamento e inclusão de participantes.	X	X	X									
Realização dos testes sorológicos.	X	X	X	X	X	X	X					
Coleta de dados clínicos.	X	X	X	X								
Extração de DNA.	X	X	X	X	X	X						
Realização da Genotipagem.	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Análise dos dados genéticos.					X	X	X	X	X	X		
Redação de artigos e divulgação dos dados.								X	X	X	X	X

6. ORÇAMENTO

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em reais (R\$)
Ensaio de Genotipagem SNP rs2531743 (tamanho S / pequeno).	Custeio	1.778,37
Ensaio de Genotipagem SNP rs73064425 (tamanho S / pequeno).	Custeio	1.778,37
MicroAmp™ Fast Optical 96- Well Reaction Plate, 0.1 mL.	Custeio	570,58
MicroAmp™ Optical Adhesive Film.	Custeio	1.894,02
TaqMan™ Genotyping Master Mix (10mL).	Custeio	5.772,80
TOTAL		11.794,14

7. REFERÊNCIAS

1. ANTONIO, E. C.; ROST, M. M.; DE SOUZA, M. A.; VIEIRA, G. F. Can the protection be among us? Previous viral contacts and prevalent HLA alleles could be avoiding an even more disseminated COVID-19 pandemic. **Preprint** em <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.06.15.20131987v1> (2020).
2. CASTRO, R.; LUZ, P. M.; WAKIMOTO, M. D.; VELOSO, V. G.; GRINSZTEJN, B.; PERAZZO, H. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil **Braz J Infect Dis** 2020.
3. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC 006-00019**: CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Revision: 03 ed. Atlanta Ga: Division Of Viral Diseases, 2020. 53 p. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>. Acesso em: 27 abr. 2020.
4. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS DO RIO GRANDE DO SUL. **NOTA INFORMATIVA 30**: SG e SRAG relacionada à infecção humana pelo COVID-19, sistemas de notificação, rede laboratorial e estratégias de testagem. 9 ed. Porto Alegre: Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2021. 21 p. Disponível em: <https://coronavirus.rs.gov.br/upload/arquivos/202104/01080622-nota-informativa-30-atualiz-31-03-21.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2021.
5. CLARK, A.; JIT, M.; WARREN-GASH, C.; GUTHRIE, B.; WANG, H. H. X.; MERCER, S. W.; SANDERSON, C., et al. Global, regional, and national estimates of the population at increased risk of severe COVID-19 due to underlying health conditions in 2020: a modelling study. **The Lancet Global Health** 2020. Elsevier BV.
6. COSTELA-RUIZ, V. J.; ILLESCAS-MONTES, R.; PUERTA-PUERTA, J. M.; RUIZ, C.; MELGUIZO-RODRÍGUEZ, L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine Growth Factor Rev** 2020.
7. ELLINGHAUS, D.; DEGENHARDT, F.; BUJANDA, L.; BUTI, M.; ALBILLOS, A.; INVERNIZZI, P., et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. **N Engl J Med** 2020.
8. FERRANTE, Lucas; PHILIP, M. Fearnside. "Protect Indigenous Peoples from COVID-19". **Science**, organizado por Jennifer Sills, vol. 368, nº 6488, abril de 2020, p. 251.1-251. DOI.org (Crossref), doi:10.1126/science.abc0073.
9. GOLONKA, R. M.; SAHA, P.; YEOH, B. S.; CHATTOPADHAY, S.; GEWIRTZ, A. T.; JOE, B., et al. Harnessing Innate Immunity to Eliminate SARS-CoV-2 and Ameliorate COVID-19 Disease. **Physiol Genomics**. 2020.
10. HE, X.; LAU, E. H. Y.; WU, P. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nat Med** 2020.
11. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, COVID-19 Map. 2020. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acesso em: 13 jun. 2021.
12. LACHMANN, A.; JAGODNIK, K. M.; GIORGI, F. M.; RAY, F.. Correcting under-reported COVID-19 case numbers: estimating the true scale of the pandemic. **Preprint** em <http://dx.doi.org/10.1101/2020.03.14.20036178> (2020). Cold Spring Harbor Laboratory.
13. LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research** 1991. Oxford University Press (OUP).
14. LI Y.; YAO, L.; LI, J. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19 [published online ahead of print, 2020 Mar 26]. **J Med Virol** 2020.
15. LONG, Q.; TANG, X.; SHI, Q.; LI, Q.; DENG, H.; YUAN, J., et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nature Medicine** 2020. Springer Science and Business Media LLC.
16. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Centro de Operações de Emergência em Saúde Pública (MS - COE). 012/20: Boletim Covid-19 - Vigilância Epidemiológica Laboratorial. 17 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 71p. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/19/BE12-Boletim-do-COE.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2020.
17. Organização mundial da Saúde. Coronavirus. Geneva: WHO 2020 [Acesso em: 25 Abril 2020]. Disponível

em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>.

18. PAIRO-CASTINEIRA, E.; CLOHISEY, S.; KLARIC, L.; BREThERICK, A. D.; RAWLIK, K.; PASKO, D.; WALKER, S., et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. **Nature** 2020. Springer Science and Business Media LLC.
19. PATEL, R.; BABADY, E.; THEEL, E. S.; STORCH, G. A.; PINSKY, B. A.; GEORGE, K. St., et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. **Mbio** 2020. American Society for Microbiology.
20. PATRICK, M. T.; ZHANG, H.; WASIKOWSKI, R.; PRENS, E. P.; WEIDINGER, S.; GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T.; HE, K.; TSOI, L. C. Associations between COVID-19 and skin conditions identified through epidemiology and genomic studies. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. **Elsevier BV** 2021.
21. PELLANDA, L.C. WENDLAND, E. M.; MCBRIDE A. J. A.; TOVO-RODRIGUES, L.; FERREIRA M. R. A.; DELLAGOSTIN, O. A., et al. Sensitivity and specificity of a rapid test for assessment of exposure to SARS-CoV-2 in a community-based setting in Brazil. **Preprint em:** <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.06.20093476v1> (2020).
22. PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pac J Allergy Immunol** 2020.
23. QIN, C.; ZHOU, L.; HU, Z.; ZHANG, S.; YANG, S.; TAO, Y., et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clin Infect Dis**. 2020.
24. RAOULT, D.; ZUMLA, A.; LOCATELLI, F.; IPPOLITO, G.; KROEMER, G. Coronavirus infections: epidemiological, clinical and immunological features and hypotheses. **Cell Stress** 2020. Shared Science Publishers OG.
25. ROBBIANI, D. F.; GAEBLER, C.; MUECKSCH, F.; LORENZI, J. C. C.; WANG, Z.; CHO, A., et al. Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2 Infection in Convalescent Individuals. **Nature**, 2020. Cold Spring Harbor Laboratory.
26. RODRÍGUEZ, Y.; NOVELLI, L.; ROJAS, M.; DE SANTIS, M.; ACOSTA-AMPUDIA, Y.; MONSALVE, D. M., et al. Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19. **J Autoimmun** 2020.
27. Secretaria de ciência, tecnologia, inovação e insumos estratégicos em saúde. SCTIE 04/2020: Acurácia dos testes diagnósticos registrados para a Covid-19. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 20 p.
28. Secretaria de ciência, tecnologia, inovação e insumos estratégicos em saúde - SCTIE 01/2020. Diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 74 p.
29. SHI, Y.; WANG, Y.; SHAO, C.; HUANG, J.; GAN, J.; HUANG, X., et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death Differ** 2020.
30. TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. F. P. The trinity of COVID- 19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol** 2020.
31. WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **Jama** 2020. American Medical Association (AMA).
32. XIAO, S.; WU, Y.; LIU, H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. **Journal Of Medical Virology** 2020. Wiley.
33. ZHAO, J.; YUAN, Q.; WANG, H.; LIU, W.; LIAO, X.; SU, Y., et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. **Clinical Infectious Diseases** 2020. Oxford University Press (OUP).



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROJETO DE PESQUISA CIENTÍFICA

Perfil de compostos fenólicos e voláteis do azeite de oliva do estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a qualidade sensorial e nutricional

1. Identificação do projeto

Proponente

Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9365240807755308>

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGNut), Linha de Pesquisa em Alimentos e Nutrição e Líder do Grupo de Pesquisa em Alimentos, Alimentação e Gestão (NUGAGE): <http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/8802106111560801>

Colaboradores

Prof. Dr. Josias de Oliveira Merib

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3106279436590490>

Profa. Dra. Simone Morelo Dal Bosco

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1374852306373444>

Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0040291517754373>

Jessica Jéssica Vidal Damasceno (Mestranda PPGNut)

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4811674427459220>

Resumo da proposta

O consumo de azeite de oliva tem aumentado, principalmente, associado a hábitos saudáveis e a busca de qualidade de vida e através da Dieta Mediterrânea, a qual recomenda o consumo de 25 a 50 ml/dia

de azeite de oliva Extra virgem. Isso porque, o azeite de oliva possui comprovadas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, decorrente da sua composição em compostos fenólicos, tocoferóis, ácidos graxos entre outros componentes bioativos. O presente projeto de pesquisa tem como objetivo caracterizar a funcionalidade dos azeites de oliva “Extra virgem”, das variedades ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’ produzidos no estado do Rio Grande do Sul. Serão avaliados azeites provenientes de distintas áreas de produção do Estado do Rio Grande do Sul e as amostras serão analisadas quanto aos parâmetros legais de qualidade, os compostos fenólicos majoritários, os compostos voláteis de aroma, o perfil de ácidos graxos, as características sensoriais (necessária para classificar cada azeite) e a quantidade de tocoferóis. Os dados obtidos serão correlacionados com as variedades de azeitona e as regiões produtoras utilizando distintas ferramentas de análise estatística multivariada, buscando correlacionar os diferentes compostos fenólicos com a região produtora e a variedade de azeitona utilizada e assim, favorecer o consumo de azeites com elevado valor nutricional.

Palavras-chave: azeite de oliva; extra virgem; valor nutricional; análise sensorial; compostos fenólicos; tocoferóis.

2. Caracterização da proposta

A produção de azeite de oliva vem aumentando com o desenvolvimento de hábitos de consumo mais saudáveis. Além disso o azeite de oliva extra virgem (AOEV), o qual possui elevada qualidade, possui características nutricionais e distintas aplicações tecnológicas, características sensoriais e atividades benéfica de proteção à saúde que o torna um ingrediente único da Dieta Mediterrânea (Celano et al., 2018). O Regulamento Europeu 432/2012 distingue os azeites quanto ao seu efeito benéfico a saúde, dependendo da sua composição e reconhece que os compostos fenólicos do azeite contribuem para a proteção dos lipídeos do sangue contra o estresse oxidativo se o azeite contiver pelo menos 5 mg de hidroxitirosol e seus derivados (oleuropeína e tirosol) a cada 20 g de azeite (EU, 2012).

A ingestão de azeite de oliva, no contexto da dieta Mediterrânea tem sido associada à melhora das concentrações de lipídios e lipoproteínas (George et al., 2018). Os impactos benéficos para a saúde associados ao consumo de azeite de oliva se tornam evidentes quando comparados com os de outras gorduras e óleos (Foscolou et al., 2018). O AOEV pode melhorar os resultados de doenças cardiovasculares incluindo pressão arterial, inflamação e os níveis colesterol, isto porque é rico em ácidos graxos monoinsaturados, que podem mediar a prevenção e gestão de doenças cardiovasculares e fatores de risco associados através de vários mecanismos incluindo a modulação favorável dos níveis de colesterol e melhora da sensibilidade à insulina (George et al., 2018). Além disso, o azeite

pode exercer efeitos sobre marcadores de função endotelial e marcadores de inflamação e têm ações preventivas sobre as funções cognitivas e motoras relacionadas à idade (Foscolou et al., 2018).

A ingestão de AOEV pode atenuar as respostas inflamatórias no corpo e, portanto, reduzir o risco de doença inflamatória crônica (Cicerale et al. 2012). Os compostos fenólicos do azeite tem demonstrado potente ação antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (George et al., 2018). Estudos relacionam o consumo de alimentos antioxidantes, ricos em compostos fenólicos e ácidos graxos poli-insaturados (principalmente ômega-3) como sendo essencial para as funções metabólicas e estruturais nas células (Halmenschlager et al., 2017). Além da redução do risco cardiovascular, os ácidos graxos poli-insaturados podem reduzir mecanismos pró-inflamatórios, são indispensáveis na síntese de prostaglandinas e proteínas, são responsáveis pelo processo de regeneração das células, mecanismos de defesa e processos fisiológicos e bioquímicos relacionados à regeneração dos tecidos (Halmenschlager et al., 2017).

Neste contexto, a importância dos compostos fenólicos se torna evidente. Todos estes fenóis são encontrados no azeite em diferentes concentrações, dependendo, dentre outros fatores, a época de colheita, as condições de extração do azeite e a variedade de oliveira utilizada (Diamantakos et al., 2021). A designação de um azeite como “produto alimentar protetor da saúde” pode ser adotada e atribuída a azeites com conteúdo fenólico maior que 250 mg/kg, o que consequentemente leva ao aumento de seu valor nutricional e remuneração ao produtor (EU, 2012). Os compostos fenólicos mais abundantes no azeite são o hidroxitirosol e tirosol e seu derivados (oleaceína, oleocantal e oleuropeína), ácido vanílico e cafeico, vanilina, luteolina e apigenina (Diamantakos et al., 2021).

Com a evidência e valor nutricional do AOEV, novas zonas de plantio têm sido exploradas, buscando a produção de azeites de elevada qualidade sensorial, como o aumento no plantio de oliveiras no Estado do Rio Grande do Sul, principalmente, na região sudoeste do Estado (cidades como Bagé, Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Dom Pedrito, São Sepé e Encruzilhada do Sul). Estes azeites possuem comprovada qualidade, seja na questão sensorial, quanto na sua composição química e, na sua maioria, são classificados como “Extra virgem”. O AOEV possui um grande valor agregado e possui um aroma agradável e característico, além de um elevado sabor e valor nutricional diretamente relacionado com a quantidade de compostos fenólicos, tocoferóis, ácidos graxos, moléculas voláteis e outros componentes.

A qualidade do azeite e seu consumo podem ser atribuídos a partir de perspectivas comerciais, nutricionais e sensoriais. O valor nutricional do AOEV decorre de seu alto nível de ácido oleico e componentes minoritários, como os compostos fenólicos e tocoferóis. Esta categoria de azeite é o produto extraído do fruto da oliveira (*Olea europea* L.) unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle de temperatura adequada, mantendo-se sua natureza original e

observados os valores dos parâmetros de qualidade com base em análises físico-químicas e sensoriais que o qualificarão (BRASIL, 2012). É diretamente obtido por esmagamento e prensagem, composto principalmente de ácidos graxos, tais como, o ácido oleico (55,0-83,0%), C16:0 (7,5-20,0%), C16:1 (0,3 a 3,5%), C18:0 (0,5-5,0%), C18:2 (3,5-21,0%) e C18:3 (1,5%) e outros componentes (de 1 a 3% da composição), dentre estes, hidrocarbonetos, fosfatídeos, esteróis, vitamina E entre outras vitaminas lipossolúveis (A, D e K), compostos fenólicos, pigmentos (clorofila: cor verde; caroteno: cor amarela) e compostos voláteis (Inajeros-García et al., 2013).

Técnicas de análise sensorial são importantes ferramentas para a definição de cada categoria do azeite de oliva, e ainda representam o teste mais importante de qualidade. Atributos sensoriais positivos e alta qualidade global dependem de uma série de fatores incluindo a azeitona utilizada, sua maturação e a região de cultivo (Angerosa et al., 2004). Para ser considerado “Extra virgem”, o azeite de oliva deve possuir uma série de critérios de qualidade. Esta classificação é concedida de acordo com suas características de composição (parâmetros físico-químicos) e ainda, mais importante, a avaliação sensorial realizada por um painel treinado. De acordo com o International Olive Oil Council (COI) o método de análise sensorial deve ser aplicável à avaliação das características e atributos sensoriais do AOEV, tal como reconhecido pelo órgão responsável e de fiscalização, sendo que, a avaliação deverá ser realizada por um grupo de avaliadores selecionados e treinados como um painel sensorial (COI, 2018).

O método de análise é baseado na detecção de certos atributos negativos, assim como, na medida da intensidade de três principais atributos positivos (frutado, amargor e picante), o painel sensorial atribui a classificação sensorial de um azeite de oliva (COI, 2018). Amostras que apresentam uma média de defeitos abaixo de zero e uma média de frutado acima de zero, são categorizados como “Extra virgem”, a qual representa o mais alto nível de classificação que um azeite de oliva pode receber (COI, 2018; BRASIL, 2012). Além disso, a análise sensorial é utilizada para classificar os azeites, de acordo com suas características sensoriais positivas e/ou negativas (Dias et al., 2016). Principalmente, através desta técnica, é possível a descrição do aroma e sabor do azeite de oliva, principalmente nos atributos agradáveis de aroma (notas frutadas, amêndoas, grama e herbáceo, maçã, pera, baunilha) e desagradáveis (critério de qualidade) (Inarejos-García et al., 2013). Amargor é uma característica de sabor do azeite obtido a partir de azeitonas verdes ou trocando de cor (se tornado negras) e o sabor doce provem de azeites obtidos a partir de azeitonas já em maior estágio de maturação e, um equilíbrio entre estes dois sabores é desejado nos azeites de oliva extra virgem (COI, 2018).

Quanto às propriedades de aroma, os azeites podem ser caracterizados por apresentarem descritores como frutado de azeitona, grama verde ou herbáceo, bem como, aroma de frutas maduras, que contribuem para a riqueza e complexidade de seu aroma. O principal composto identificado nos

AOEV é o *E*-2-hexenal, seguido por 1-hexanol (aroma herbáceo, frutado e de tomate), *E*-2-hexen-1-ol (aroma herbáceo, grama e folhas verdes) e *Z*-3-hexen-1-ol (aroma herbáceo), ambos encontrados em azeites obtidos com azeitonas verdes e parcialmente maduras. O aroma característico dos AOEV depende dos compostos voláteis presentes, os quais são derivados da degradação de ácidos graxos poli-insaturados utilizando a rota da lipooxigenase, que ocorre durante o processo de extração. A ação de enzimas lipooxigenases sobre o substrato (ácidos graxos) ocorre com o esmagamento do fruto da azeitona e sucede a liberação de compostos formados por uma cadeia de seis carbonos (C6), aldeídos, C6 álcoois e seus ésteres correspondentes, todos formando os mais importantes compostos de aroma dos azeites (Dias et al., 2016). Compostos de cinco carbonos de cadeia linear (C5) também são importantes para o aroma e podem ser sintetizados através de outra reação da via da lipooxigenase e assim, formar álcoois C5 por reação com o radical hidroxila (Angerosa et al., 2004).

Porém inúmeros processos podem causar a alteração do perfil de voláteis e assim, originar notas sensoriais desagradáveis, conhecidos como defeitos sensoriais dos azeites. Esses defeitos e suas intensidades são responsáveis pela classificação sensorial dos azeites, classificados como virgem ou lampante, de acordo com a intensidade de cada defeito, respectivamente (COI, 2018; BRASIL, 2012). Desta forma, os compostos de aroma são cruciais para determinar a qualidade e categoria dos azeites de oliva.

Como o AOEV apresenta diversos componentes em menores quantidades, a análise sensorial é uma forma de valorização do azeite, facilitando seu consumo e ressaltando sua qualidade ao consumidor. Além disso, seu consumo possui vários efeitos benéficos, associados a hábitos alimentares saudáveis, tais como a baixa incidência de câncer e de doenças coronarianas, incluindo hipertensão. O seu uso contínuo, pode fornecer uma carga suficiente de antioxidantes, reduzindo a oxidação através da inibição da peroxidação dos lipídeos, fator que está envolvido nas doenças coronarianas, no câncer e no envelhecimento.

Todos os fatores nutricionais apontados são decorrentes da quantidade de compostos fenólicos e tocoferóis presentes no azeite “Extra virgem”, portanto sua quantificação é de extrema importância. Neste sentido se emprega a análise sensorial como uma importante ferramenta de classificação e ao mesmo tempo, valorização dos efeitos benéficos dos azeites, pois apenas os AOEV possuem alta quantidade de compostos fenólicos e, portanto, podem apresentar valor nutricional superior, além de qualidade sensorial e perfil de compostos voláteis principais adequado e bastante complexo.

3. Objetivo geral

Analisar a quantidade de compostos fenólicos, tocoferóis, perfil de voláteis, aspectos sensoriais e nutricionais de azeites de oliva extra virgem produzido a partir de azeitonas cultivadas no estado do Rio Grande do Sul e em diferentes zonas de produção.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar as características físico-químicas e nutricionais, bem como os parâmetros de qualidade, definindo o perfil de ácidos graxos de cada azeite e o seu teor de tocoferóis;
- Determinar os compostos fenólicos, a atividade antioxidante e o perfil de compostos voláteis das amostras de AOEV ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’;
- Correlacionar, por meio de diferentes técnicas de estatística multivariada (análise de clusters, componentes principais, regressão linear etc.), os resultados de compostos fenólicos, voláteis e tocoferóis com os AOEV, verificando sua relação com cada variedade e local de produção.

4. Metodologia Proposta

Para execução do projeto, serão avaliados AOEV comerciais e produzidos no Estado do Rio Grande do Sul, no ano de 2022, num total de 30 amostras, 15 monovarietais da variedade ‘Arbequina’ e 15 da variedade ‘Koroneiki’. Serão tomadas amostras de azeite já engarrafado, em recipientes de vidro com volume total de 250 mL e em triplicata e após, serão identificadas de acordo com a zona de produção, a variedade de oliveira utilizada (azeite monovarietal ‘Arbequina’ ou ‘Koroneiki’) e o processo de obtenção. As amostras serão mantidas a 10 °C e ao abrigo da luz para melhor conservação.

Os parâmetros físico-químicos e de qualidade analisados serão a acidez expressa em ácido oleico, índice de peróxidos, absorbância em ultravioleta a 270 nm, 232 nm e o Delta K, bem como o perfil de ácidos graxos. Todas as metodologias utilizadas serão de acordo com os métodos propostos pela Comunidade Europeia (Official Journal of the European Communities, 1991). O teor das frações de clorofila e carotenoides totais serão determinados de acordo com método proposto por Mínguez-Mosquera et al. (1991), através da medida da absorbância do AOEV dissolvido em ciclohexano (1,5:5 w/v) nos comprimentos de onda de 670 e 470 nm, respectivamente. Os resultados obtidos são expressos em mg de feofitina “a” e luteína por kg de azeite, respectivamente.

A quantidade de compostos fenólicos totais será determinada através do método de Folin-Ciocalteu, como proposto por Vázquez-Roncero et al. (1973), através de extração líquido-líquido com solução metanol/água (60:40 v/v) e os resultados serão expressos em mg ácido cafeico/kg de azeite. O perfil de compostos fenólicos será avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com o método do Conselho Oleícola Internacional com algumas modificações

(COI, 2009). Os fenólicos serão extraídos via extração com solução de metanol/água (80:20), e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (LC-20A Prominence, Shimadzu, Tokyo, Japão), utilizando uma coluna C18 (5µm, 250 x 4,6 mm) e detector a 280 nm. A fase móvel será composta por solução de 0,2% de H₃PO₄, metanol e acetonitrila, em modo gradiente e fluxo de 1 ml/minuto. A quantidade de compostos fenólicos será estimada utilizando padrão interno (ácido siríngico) e em relação com o padrão externo (tirosol) e a quantidade total de compostos fenólicos das amostras será calculada pela soma das áreas dos picos obtidos no cromatograma. Serão realizadas também curvas de quantificação com os principais compostos fenólicos do azeite e os resultados expresso em mg/kg.

A atividade antioxidante será medida utilizando o método de captura do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (ABTS) e pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), como proposto por Nakby et al. (2010). Inicialmente será realizado um procedimento de extração líquido-líquido com solução de metanol: água (80:20) das amostras de azeite e, para ambos os métodos, será realizada uma curva padrão de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich) e atividade antioxidante será expressa em µmol de Trolox/kg de azeite.

O conteúdo de tocoferóis será determinado através da metodologia proposta por Demnati et al. (2018). Um total de 2g de azeite será dissolvido em 25 mL de *n*-hexano (Sigma-Aldrich) e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (LC-20A Prominence, Shimadzu, Tokyo, Japão), utilizando uma coluna C18 (Varian, LiChrosphereSil 60A, 5µm, 250 x 4mm) e detector de fluorescência (Shimadzu RF-20A) programado com um comprimento de onda de 290 nm para excitação e 330 nm para emissão. A fase móvel será composta por 0,5% de 2-propanol em *n*-hexano e a um fluxo de 0,5 ml/minuto. Os tocoferóis serão identificados através da comparação com o tempo de retenção dos padrões puros de tocoferóis e quantificados utilizando uma curva padrão respectiva e será expresso em mg de tocoferóis/kg de azeite.

Para a determinação dos compostos voláteis será realizada usando a microextração em fase sólida (SPME) e utilizando a cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massas (MS). Para extração (2 g de azeite), será utilizada a fibra com revestimento de PDMS/DVB/CARBOXEN (Sigm-Aldrich) acoplada a um *holder* manual, a 40 °C por 30 min. Para dessorção dos compostos, a fibra será inserida no equipamento de GC/MS e mantida por 10 minutos a 250 °C. Será utilizada uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) a 36 °C por 10 minutos, e depois aumentará para 156 °C a 4 °C/minuto, após 250 °C a 10 °C/minutos. O hélio (99,9%) será usado como gás de limpeza, a um fluxo constante de 0,8 ml/minuto. A temperatura do MS será de 250 °C e o detector MS será usado no modo de varredura (40 a 600 m/z). Cada amostra será analisada em triplicata. Após esta otimização de todos os parâmetros descritos, será verificada a linearidade do método, assim como os limites de detecção e quantificação, precisão e repetibilidade. Os compostos

serão identificados comparando o tempo de retenção e o espectro de massa de cada composto com o banco de dados das bibliotecas Wiley6N e NIST98, além de sua comparação com o padrão puro específico e para quantificação relativa dos compostos voláteis, serão utilizadas curvas de calibração com os principais compostos e utilizando 1-octanol como padrão interno, dissolvido em azeite refinado (10 mg/kg).

Para análise das amostras de azeite será aplicado método oficial de análise sensorial de azeites de oliva, utilizando a normativa COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 10 2018 (COI, 2018). A análise será realizada pelo Painel Sensorial UFCSPA/MAPA-LFDA/RS, utilizando 12 avaliadores treinados, em cabines individuais, utilizando copos de prova e as amostras (12.8 a 14.6 g), servidas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, codificadas. Será utilizada uma escala não estruturada de 10 cm para os principais defeitos sensoriais e atributos positivos (Frutado, Amargo e Picante). Ressalta-se que o projeto foi aprovado pelo CEP da UFCSPA (CAAE: 62324516.8.0000.5345). Além disso, será aplicada a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), com as mesmas condições de amostra, utilizando uma escala não estruturada de 10 cm, sendo que os limites serão “Fraco” (limite mínimo) e “Forte” (limite máximo). Para a ADQ, serão analisados alguns atributos importantes para o AOEV, tais como, Frutado, Frutado Maduro, Frutado Verde, Amargo, Picante, Aroma Herbáceo, Aroma de Maça, Aroma de Amêndoas, Retrogosto Agradável, Sabor Adocicado, Acidez, Nozes e Harmonia.

Para todos os dados obtidos em triplicata, será realizado a Análise de Variância (ANOVA) dos dados e para a comparação de médias entre os grupos o teste de Tukey ($p < 0,05$), calculando a média e o desvio padrão dos resultados. Além disso será aplicada diferentes técnicas de análise de dados tais como a Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Clusters e de Regressão Linear, buscando a correlação dos dados obtidos com os diferentes azeites (variedade ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’) e regiões de cultivo no Estado do Rio Grande do Sul. Todas as análises estatísticas serão realizadas utilizando o software STATISTICA 10.0 package (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

5. Etapas de Execução do Projeto com respectivo Cronograma de Atividades

Este projeto terá duração de 12 meses, sendo que as etapas estão dispostas no quadro abaixo.

Atividades	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Amostragem dos AOEV	X	X										
Análise sensorial dos azeites						X	X	X	X	X	X	

Análise dos parâmetros físico-químicos e ácidos graxos		X	X	X	X	X	X	X				
Avaliação dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e tocoferóis					X	X	X	X	X	X	X	
Análise dos compostos voláteis dos azeites					X	X	X	X	X	X	X	
Relatório final da pesquisa e prestação de contas											X	X

Todas as atividades relativas à análise dos azeites serão executadas na UFCSPA, utilizando os laboratórios multiusuário, principalmente a Central Analítica.

6. Produtos Esperados como Resultado da Execução do Projeto

A partir dos resultados encontrados será possível uma análise sobre a relação da composição química, compostos voláteis, tocoferóis e fenólicos nas características sensoriais encontradas nos AOEV e sua relação com a zona de produção. Além disso, poderão integrar a comunidade acadêmica ao produtor e ao consumidor, destacando o valor nutricional de cada azeite, bem como, quais os compostos fenólicos predominantes em cada amostra. Estes resultados poderão subsidiar o desenvolvimento da cadeia produtiva como um todo, além de guiar futuros estudos na implantação de um sistema de Denominação de Origem ao azeite produzido no estado do Rio Grande do Sul, direcionando o consumidor a busca de azeites com maior quantidade de compostos fenólicos e benefícios a sua saúde.

Também se espera obter um maior conhecimento sobre as características sensoriais e a composição volátil dos azeites produzido no Estado. De acordo com a legislação vigente, a principal diferença entre os tipos de azeite se refere às características sensoriais, evidenciando a importância do estudo e seus benefícios para a cadeia produtiva do azeite de oliva no Estado.

Por outro lado, será possível a verificação de quais compostos fenólicos serão encontrados em cada azeite e suas quantidades. Com essa pesquisa, busca-se também, um incremento no consumo de AOEV, além de informar sua elevada qualidade sensorial e nutricional. Os benefícios do consumo de AOEV têm sido evidenciados em diferentes estudos, porém, poucos dados têm demonstrado quais componentes fenólicos estão realmente presentes nos azeites do Rio Grande Sul e nas variedades mais plantadas, ‘Arbequina’ e ‘Koroneiki’. Neste contexto, com o projeto, será possível este mapeamento dos componentes em maior concentração nos azeites destas variedades, amplamente difundidas em distintas áreas de produção no Estado, evidenciando o seu valor nutricional e de qualidade, além de sua relação com diferentes locais de produção.

7. Potencial de Impacto dos Resultados do Ponto de Vista Técnico-Científico, de Inovação e/ou Difusão

O principal impacto da execução do projeto é o conhecimento gerado a partir da composição dos azeites, evidenciando os índices de compostos fenólicos e tocoferóis, componentes presentes nos azeites e que apresentam conhecidos efeitos biológicos. Ressalta-se que estes componentes são pouco conhecidos quando se refere aos azeites brasileiros, principalmente, produzidos no estado do Rio Grande do Sul.

Do ponto de vista químico, será possível demonstrar as características de cada azeite produzido no Estado e assim, orientar possíveis manejos culturais da oliveira nas regiões produtoras, conduzindo novos plantios, bem como, difundindo a cultura para outras áreas. Além disso, será verificada a qualidade dos azeites elaborados, direcionando assim novas tecnologias e técnicas de cultivo, aprimorando ainda mais a qualidade dos azeites e sua difusão entre os consumidores.

Do ponto de vista nutricional, será possível comprovar a abundância de compostos bioativos e sua possível relação com efeitos biológicos, principalmente relativos à atividade antioxidante. O azeite de oliva é um alimento reconhecidamente benéfico a saúde, porém, poucos estudos têm sido conduzidos com os azeites brasileiros, principalmente, na caracterização das amostras e quantificação dos componentes de interesse e com efeito biológico, principalmente os compostos fenólicos e os tocoferóis. Sendo assim, o projeto tem como impacto a produção de dados para embasar a recomendação do consumo de azeites de oliva, principalmente os azeites regionais, para a população e assim, promover, a saúde.

Do ponto de vista tecnológico, a execução do projeto leva ao fortalecimento do setor produtivo, uma vez que evidencia a qualidade dos azeites produzidos localmente. Porém, a caracterização dos AOEV e ainda sua composição em compostos fenólicos e compostos voláteis e sua avaliação sensorial, podem subsidiar outros projetos e assim, possibilitar a criação de Denominações de Origem para os azeites gaúchos. Isso porque, será realizado um levantamento total da composição dos azeites e sua relação com a região produtora, demonstrando o efeito da localização geográfica no cultivo das azeitonas e sobre o azeite produzido.

De maneira geral, o projeto tem impacto direto sobre a cadeia produtiva da azeitona e do azeite de oliva uma vez que permitirá a caracterização dos AOEV e sua relação com a qualidade, seja físico-química, sensorial e nutricional. O projeto visa também a formação de recursos humanos, na medida que a equipe executora conta com a participação do corpo docente e discente da UFCSPA, contribuindo para o fortalecimento e consolidação do PPGNut. Espera-se também o desenvolvimento de publicações de alta qualidade e impacto na comunidade científica em periódicos internacionais.

Além disso, espera-se a divulgação dos resultados junto ao setor produtivo, na forma de artigos em revistas, também, resumos em congressos científicos e apresentação de pôsteres e/ou palestras e dias de campo.

8. Referências Bibliográficas

F. Angerosa, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto, G.F. Montedoro, Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, *J. Chromatogr. A*, 1054 (2004) 17-31.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2012). Instrução Normativa n.1, de 30 de janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.azeiteonline.com.br/wp-content/uploads/2012/02/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-1-DE-30-DE-JANEIRO-DE-2012_MAPA.pdf>. Acesso em: 29/03/2022.

S. Cicerale, X.A. Conlan, A.J. Sinclair, R.S. Keast, Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49 (2009), 218-236.

COI (International Olive Oil Council). (2018). Method for the organoleptic assessment of extra virgin olive oil applying to use a designation of origin. COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 10 2018. Disponível em: <<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T20-Doc.-15-REV-10-2018-Eng.pdf>>. Acesso em: 20/05/2021

D. Demnati, R. Pacheco, L. Martínez, S. Sánchez, Effect of roasting temperature and time on the chemical composition and oxidative stability of argan (*Argania spinosa* L.) oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 120 (2018), 1700136.

L.G. Dias, N. Rodrigues, A.C.A. Veloso, J.A. Pereira, A.M. Peres, Monovarietal extra virgin olive oil classification: a fusion of human sensory attributes and an electronic tongue. *Eur. Food Res. Technol.*, 242 (2016), 259-270.

A. Foscolou, E. Critselis, D. Panagiotakos, Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas*, 118 (2018), 60-66

E.S. George, S. Marshall, H.L. Mayr, G.L. Trakman, O.A. Tatucu-Babet, A.M. Lassemillante, A. Bramley, A.J. Reddy, A. Forsyth, A.C. Tierney, C.J. Thomas, C. Itsiopoulos, W. Marx, The effect of high-polyphenol extra virgin olive oil on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30 (2018), 2772-2795.

L. Halmenschlager, A.M. Lehn, A. Marcadenti, M.M. Markoski, Omega-3 fatty acids supplementation differentially modulates the SDF-1/CXCR-4 cell homing axis in hypertensive and normotensive rats. *Nutrients*, 9 (2017), 826.

A.M. Inarejos-García, A. Gómez-Alonso, G. Fregapane, M.D. Salvador, Evaluation of minor components, sensory characteristics and quality of virgin olive oil by near infrared (NIR) spectroscopy. *Food Res. Int.*, 50 (2013), 250-258

A. Vázquez-Roncero, C. Janer del Valle, M.L. Janer del Valle, Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 24 (1973), 350.

Official Journal of the European Communities. Commission regulation (EEC) no 2568/91 of 11 July 1991. (1991), Brussels: Publications Office of the European Union.

R. Celano, A. L. Piccinelli, A. Pugliese, S. Carabetta, R. di Sanzo, L. Rastrelli, M. Russo. Insights into the Analysis of Phenolic Secoiridoids in Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 66 (2018), 6053-6063.

Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 Establishing a List of Permitted Health Claims Made on Foods, Other than Those Referring to the Reduction of Disease Risk and to Children's Development and Health Text with EEA Relevance. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32012R0432>>. Acesso em: 29/03/2022

P. Diamantakos, K. Ioannidis, C. Papanikolaou, A. Tsolakou, A. Rigakou, E. Melliou, P. Magiati. A New Definition of the Term “High-Phenolic Olive Oil” Based on Large Scale Statistical Data of Greek Olive Oils Analyzed by qNMR. *Molecules*, 26 (2021), 1115

COI (International Olive Oil Council). (2009). Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29 November 2009. Disponível em: <<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T.20-Doc.-No-29-Rev-1-2017.pdf>>. Acesso em: 29/03/2022.

A. Nakbi, M. Issaoui, S. Dabbou, N. Koubaa, A. Echbili, M. Hammami, N. Attia. Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (2010), 711-715

**EDITAL PROPPG N°10/2022 PROGRAMA DE FOMENTO PARA REALIZAÇÃO
DE PROJETOS DE PESQUISA NA UFCSPA**

**A susceptibilidade de *Caenorhabditis elegans* a infecções bacterianas pode
ser influenciada pela sua dieta?**

Proponente: Profa Dra Karine Rigon Zimmer

Porto Alegre, abril de 2022

1. Identificação do projeto

1.1. Título: A susceptibilidade de *Caenorhabditis elegans* a infecções bacterianas pode ser influenciada pela sua dieta?

1.2. Palavras-chave: dieta, *Caenorhabditis elegans*, infecções, biofilmes, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3. 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. O estudo dessas relações em mamíferos, incluindo o ser humano, é difícil, pois, entre outros fatores, há a necessidade de longos períodos no 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 e vias de sinalização evolutivamente conservadas. 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. Portanto, este estudo se propõe investigar a influência de dietas com altas concentrações de glicose na susceptibilidade de *C. elegans* a dois patógenos humanos importantes, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, nas suas formas planctônica e de biofilme. Para tal, os nematoides na fase larval L1, serão expostos a dieta suplementada com altas concentrações de glicose por curtos e longos períodos de tempo. Após alimentados, serão avaliados quanto a sua fisiologia, através dos ensaios de longevidade, tamanho corporal e da ninhada, estimulação mecanossensorial e parâmetros bioquímicos. Posteriormente, os nematoides serão desafiados com os patógenos, onde a taxa de sobrevivência e a carga bacteriana serão avaliadas. Na literatura, há uma carência de estudos voltados para este tipo de investigação, especialmente nas 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 projeto. 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.

1.4. Dados do proponente e equipe (incluindo colaborações e parcerias já estabelecidas para a execução do projeto):

1.4.a. Proponente (coordenador): Professora Karine Rigon Zimmer (Departamento de Ciências Básicas da Saúde – UFCSPA; orientadora no Programa de Pós-Graduação em Biociências – UFCSPA, PPG- Biociências e pesquisadora do Grupo de Pesquisa Diversidade Química/ Chemical Diversity Group/ ChemDiG).

1.4.b. Colaboradores:

- **Professor:** Eduardo Rigon Zimmer (Departamento de Farmacologia da UFRGS, orientador no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica (PPGBioq - UFRGS) e no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica (PPGFT - UFRGS);

- **Alunos:** Belisa Ávila Rodrigues (aluna de doutorado do PPG-Biociências - UFCSPA); Amanda Moreira de Barros (graduanda em Biomedicina UFCSPA e bolsista de iniciação científica - FAPERGS); Marco Antônio De Bastiani (bolsista de pós-doutorado Júnior - PPGBioq - UFRGS).

Caracterização da proposta: pesquisa científica

2. Caracterização da proposta

2.1. Dieta e saúde

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. Devido a essas relações, dietas que influenciam o sistema imune, também podem ter influência no sistema nervoso (ESTRADA; CONTRERAS, 2019).

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 e colab., 2018; 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 neuropeptídeos e o sistema nervoso central controla a resposta imune inata através das vias hormonais e neuronais (SALVADOR e colab., 2021). 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.

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. Além disso, seu genoma já foi completamente sequenciado (60-80% de seus genes possuem ortologia com os genes humanos), o custo de manutenção dos nematoides é baixo e o ciclo de vida é curto, com geração rápida (3-4 dias e longevidade de 2-3 semanas) (CHIU e colab., 2011; KHAN e colab., 2018; The *C. elegans* sequencing consortium, 1998).

2.2. *Caenorhabditis elegans*

2.2.1. Aspectos gerais e dieta

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).

Caenorhabditis 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 micro-organismo patogênico, o verme o reconhece e aprende a evita-lo (KHAN e colab., 2018). Como outras estratégias, possui 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, *C. elegans* ainda conta com a produção de proteínas e peptídeos antimicrobianos e a liberação de espécies reativas de oxigênio (KUMAR e colab., 2019).

O sistema imune e o sistema nervoso de *C. elegans* usam de comunicação bidirecional para controlar as respostas aos patógenos, com diferentes circuitos neuronais ativando ou inibindo as respostas imunes (SINGH; ABALLAY, 2020).

Vermes alimentados com altas concentrações de glicose apresentaram uma redução na longevidade, alterações no conteúdo e absorção de glicose, conteúdo de triglicerídeos, tamanho corporal, progenia e redução da locomoção (ALCÁNTAR-FERNÁNDEZ e colab., 2018; SCHLOTTERER e colab., 2009). Além disso, apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (ALCÁNTAR-FERNÁNDEZ e colab., 2018; SCHLOTTERER e colab., 2009), bem como diminuição da capacidade de aprendizado e prejuízo neuronal (GUZMAN e colab., 2020; MENDLER e colab., 2017; PINKAS e colab., 2018). Dois estudos que adicionaram glicose ao meio investigaram seu efeito na resposta do verme frente a infecções bacterianas. Um destes trabalhos avaliou a infecção do animal 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 e colab., 2013; LI e colab., 2018).

2.2.2. Interação patógeno-hospedeiro

Caenorhabditis 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, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, (DASGUPTA e colab., 2020; JANSEN e colab., 2002; LAVIGNE e colab., 2013), as gram-negativas *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*

(HEAD e colab., 2017; LI e colab., 2018; SOMASIRI e colab., 2020), além de fungos como *Candida albicans* (HOLT e colab., 2017). Nas infecções em *C. elegans*, esses patógenos utilizam os mesmos mecanismos de virulência que nas infecções humanas, incluindo a formação de biofilme (ATKINSON e colab., 2011).

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 (KHAN e colab., 2018). Um dos patógenos mais estudados em *C. elegans*, a bactéria *P. 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 e colab., 1999). Do grupo das bactérias gram-positivas, *S. 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 e colab., 2010).

Assim como podem causar infecção e morte no animal, *S. aureus* e *P. aeruginosa* são responsáveis por uma variedade de infecções nos humanos, incluindo pneumonia em pacientes com fibrose cística, infecções de feridas, infecções associadas a dispositivos médicos e pneumonias em pacientes hospitalizados. Muitas dessas infecções estão associadas a produção de biofilmes, nos quais ambos patógenos podem ser encontrados e suas interações influenciam na dificuldade de tratamento (HOTTERBEEKX e colab., 2017). As infecções envolvendo biofilmes no verme ainda são muito pouco estudadas, especialmente quando a avaliação envolve mais de uma espécie formando biofilme (ATKINSON e colab., 2011; HOLT e colab., 2017).

Os micro-organismos raramente existem como formas planctônicas e de espécie única, sendo frequentemente encontrados como biofilmes multiespécie (PETERS e colab., 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).

3. 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 de forma conjunta na resposta aos patógenos, nossa hipótese neste projeto é que dietas com altas concentrações de glicose causem efeitos negativos neste sistema bidirecional, levando assim, a uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas.

Para estudar a influência de dietas com altas concentrações de glicose, *C. elegans* é considerado um modelo alternativo muito interessante devido às suas diversas vantagens, como ciclo de vida curto e rápido tempo de geração, vias de sinalização conservadas, facilidade na avaliação do sistema neuronal, além de ser infectado por muitos patógenos humanos.

A investigação da influência das dietas na susceptibilidade a infecções bacterianas ainda é escassa, especialmente nas condições propostas neste estudo. 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.

4. Objetivos gerais

Avaliar a influência de dietas com altas concentrações de glicose na susceptibilidade de *C. elegans* a infecções bacterianas.

4.1. Objetivos específicos

- (i) Investigar o efeito de dietas com altas concentrações de glicose na fisiologia de *C. elegans*, quando exposto por curtos e longos períodos de tempo;
- (ii) Avaliar a susceptibilidade de *C. elegans* a infecções por *P. aeruginosa* e *S. aureus* (nas formas planctônica e de biofilmes mono e duo-espécie) após serem submetidos as dietas com altas concentrações de glicose.

5. Metodologia proposta

5.1. Análises em *C. elegans*

5.1.1. Cepas e condições de cultivo

Caenorhabditis elegans do tipo selvagem (N2 Bristol) 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.

5.1.2. Dieta

Uma dieta com alta concentração de glicose será adicionada junto ao ágar NGM (concentração de glicose de 2% (111 mM)) (SALIM; RAJINI, 2014). *E. coli* OP50 viva ou morta pelo calor será adicionada ao meio. Como dieta controle será utilizada *E. coli* OP50 em meio ágar NGM.

5.1.3. Sincronização e estágios do desenvolvimento

A sincronização dos vermes será realizada pelo método de tratamento com hipoclorito de sódio (AMRIT e colab., 2014). Serão utilizados nos ensaios vermes no estágio L1, divididos em 2 grupos (um grupo será exposto a dieta por um curto período de tempo enquanto o outro por um período mais longo):

1. A dieta será administrada na fase larval L1 por tempos pré-definidos, e em seguida, os vermes serão retirados para o meio NGM, com *E. coli* OP50 (alimentação padrão), para o crescimento até a fase larval L4 quando serão então desafiados com as bactérias (exposição por curto tempo).
2. Os vermes serão expostos a dieta desde o estágio larval L1 até a fase larval L4, quando então serão desafiados com as bactérias (exposição por longo tempo).

5.1.4. Avaliação da fisiologia

Após a administração da dieta, serão realizados ensaios que avaliam a fisiologia do nematoide:

1. Longevidade: Um número fixo de vermes será transferido para placas de NGM contendo a dieta. 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 e colab., 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. 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. 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 e colab., 2019).
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 e colab., 2018).
5. 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 e colab., 2018; SALIM; RAJINI, 2014).

5.1.5. Microscopia e coloração

O corante Nilo red será utilizado para quantificação de lipídeos segundo protocolo de Escorcia e colab. (2018). As imagens serão obtidas em microscópio confocal.

5.2. Infecções bacterianas

5.2.1. 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 triptona de soja (TSA) aerobicamente a 37°C *overnight*.

5.2.2. Formação de biofilme mono e duo-espécie

A formação de biofilme será realizada utilizando microplacas de poliestireno segundo protocolo de Zimmer e colab. (2013) e quantificação da biomassa do biofilme será mensurada através da técnica de cristal violeta e atividade metabólica pela utilização de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) (KHAN e colab., 2017; ZIMMER e colab., 2013). Esse ensaio será realizado para assegurar que as bactérias utilizadas neste estudo estão formando biofilme. Vancomicina (para *S. aureus*) ou gentamicina (para *P.*

aeruginosa) e meio de cultura serão os controles positivos e negativo de crescimento bacteriano, respectivamente.

5.2.3. Ensaios de sobrevivência

Nos ensaios de infecção de *C. elegans* serão utilizadas (1) células planctônicas, (2) células do biofilme mono e (3) biofilme duo-espécie para a formação dos tapetes bacterianos nas placas de NGM. Células planctônicas e do biofilme (mono e duo-espécie) de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, serão cultivadas em caldo triptona de soja e coletados. Então, 50 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. Um verme será considerado morto quando ele não responder ao toque (SIFRI e colab., 2003; HOLT et al., 2017).

5.2.4. 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 e colab., 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 das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

5.3. Análise estatística

Os 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 de $p \leq 0,01$ 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 através do software Graphpad Prism 9.0.

6. Etapas de execução do projeto com respectivo cronograma de atividades

Atividades	1° Bimestre	2° Bimestre	3° Bimestre	4° Bimestre	5° Bimestre	6° Bimestre
Análises em <i>C. elegans</i>						
Ensaios iniciais de padronização	x	x				
Ensaios grupo 1 (curto período de exposição): avaliação dos parâmetros fisiológicos		x	x	x		

Ensaio grupo 2 (longo período de exposição): avaliação dos parâmetros fisiológicos		x	x	x	x	
Ensaio grupo 1 (curto período de exposição): ensaios de infecção			x	x	x	
Ensaio grupo 2 (longo período de exposição): ensaios de infecção			x	x	x	
Análise de resultados		x	x	x	x	x
Redação de artigos/apresentação de trabalhos em eventos				x	x	x

É importante ressaltar que o modelo de *C. elegans* já se encontra implementado no laboratório de Microbiologia Molecular localizado no prédio 3 da UFCSPA, e que este laboratório possui a infraestrutura necessária para os ensaios propostos. Além disso, outros materiais de consumo que não foram solicitados neste edital encontram-se já disponíveis para utilização (oriundos de verbas institucionais, de outros órgãos de fomento e de colaborações da pesquisa).

O laboratório já retomou na sua totalidade as atividades presenciais, seguindo todas as orientações do COE da UFCSPA, portanto não havendo problemas quanto a execução dos ensaios previstos nesta proposta.

6. Orçamento

Descrição	Valor (R\$)
Materiais para ensaios com <i>C. elegans</i> (placas de Petri, microplacas, Nile red, 5-fluoro-2'-deoxiuridina, dextrose, kits para dosagem de glicose e triglicerídeos)	5.255,95
Reagentes para ensaios microbiológicos (meios de cultura, placas de Petri, microplacas, ponteiras, antimicrobianos, cristal violeta, XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2HTetrazolium-5-Carboxanilide))	6.744,05
TOTAL	12.000,00

7. Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Científico: (i) Publicação de artigos científicos em periódicos internacionais de alto fator de impacto tais como *PLoS Pathogens*, *PLoS One* e *Scientific Reports*; (ii) Disseminar conhecimento técnico-científico através da participação em mostras de iniciação científica, eventos, congressos e simpósios nacionais e internacionais.

Formação: Formação, treinamento e qualificação de recursos humanos a nível de graduação (iniciação científica) e pós-graduação (doutorado e pós-doutorado).

8. Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

Técnico-científico:

Esse projeto permitirá a padronização e o estabelecimento de novos protocolos de estudo no laboratório de Microbiologia Molecular localizado na UFCSPA, envolvendo a utilização de dietas específicas e infecções bacterianas no modelo *in vivo* de *C. elegans*. O estabelecimento de ensaios deste tipo poderá beneficiar outros pesquisadores da UFCSPA bem como pesquisadores de outras instituições, permitindo que colaborações e parcerias sejam firmadas, aumentando ainda mais a qualidade da produção científica institucional. Além disso, possibilitaremos a ampliação das linhas de pesquisa do grupo com maior oferta de integração com a graduação e com os Programas de Pós-Graduação da Instituição e externo a ela (UFRGS). Importaneamente, com as parcerias já estabelecidas para o desenvolvimento dessa proposta poderemos contribuir significativamente para a geração de produtos científicos e formação de recursos humanos de alta qualidade.

Ainda, com os dados obtidos neste projeto poderemos contribuir para a descoberta de estratégias ou intervenções terapêuticas alternativas na prevenção ou tratamento de infecções bacterianas envolvendo biofilmes, as quais apresentam altas taxas de morbi-mortalidade e oneram de forma significativa os sistemas de saúde.

Difusão:

Difundir informações e orientações relacionadas aos efeitos das dietas na saúde de indivíduos, e seus possíveis efeitos nos processos infecciosos envolvendo bactérias com elevada resistência aos antimicrobianos para o público em geral;

Criar estratégias a partir das informações geradas pelo projeto que sejam de fácil alcance e interpretação por parte da população, a fim de reduzir e/ou prevenir as consequências negativas geradas por dietas de má qualidade.

9. Referências

- ALCÁNTAR-FERNÁNDEZ, Jonathan e colab. *Caenorhabditis elegans* respond to high-glucose diets through a network of stress-responsive transcription factors. *PLOS ONE*, v. 13, n. 7, p. e0199888, 10 Jul 2018.
- AMRIT, Francis Raj Gandhi e colab. The *C. elegans* lifespan assay toolkit. *Methods*, v. 68, n. 3, p. 465–475, Ago 2014.
- ATKINSON, Steve e colab. Biofilm development on *Caenorhabditis elegans* by *Yersinia* is facilitated by Quorum Sensing-dependent repression of type III secretion. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 1, p. e1001250, 6 Jan 2011.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.
- CHIU, Hui e colab. *C. elegans* as a genetic model to identify novel cellular and molecular mechanisms underlying nervous system regeneration. *Cell Adhesion and Migration*, v. 5, n. 5, p. 387–394, 2011.
- DASGUPTA, Madhumanti e colab. NHR-49 transcription factor regulates immunometabolic Response and survival of *Caenorhabditis elegans* during *Enterococcus faecalis* infection. *Infection and Immunity*, v. 88, n. 8, p. 1–16, 1 Jun 2020.
- DIRKSEN, Philipp e colab. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*:

Gateway to a new host-microbiome model. *BMC Biology*, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2016.

ESCORCIA, Wilber e colab. Quantification of lipid abundance and evaluation of lipid distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2018, n. 133, p. 1–6, 5 Mar 2018.

ESTRADA, José Antonio; CONTRERAS, Irazú. Nutritional modulation of immune and central nervous system homeostasis: The role of diet in development of neuroinflammation and neurological disease. *Nutrients*, v. 11, n. 5, 2019.

FRANCOLINI, Iolanda; DONELLI, Gianfranco. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 227–238, 2010.

FRÉZAL, Lise; FÉLIX, Marie Anne. *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife*, v. 4, p. 1–14, 2015.

GUO, Naijing; WANG, Jiayu; WANG, XiangMing. Effect of starvation and high-carbohydrate diet on learning ability of *Caenorhabditis elegans*. *Heliyon*, v. 5, n. 3, p. e01289, 2019.

GUZMAN, Arvie Camille De e colab. High glucose diet attenuates dopaminergic neuronal function in *C. elegans* leading to acceleration of aging process. p. 1–22, 2020.

HEAD, Brian P.; OLAITAN, Abiola O.; ABALLAY, Alejandro. Role of GATA transcription factor ELT-2 and p38 MAPK PMK-1 in recovery from acute *P. aeruginosa* infection in *C. elegans*. *Virulence*, v. 8, n. 3, p. 261–274, 2017.

HOLT, Jillian E. e colab. Role of extracellular polymeric substances in polymicrobial biofilm infections of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* modelled in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pathogens and Disease*, v. 75, n. 5, p. 1–7, 2017.

HOTTERBEEKX, An e colab. In vivo and in vitro interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, 3 2017.

IRAZOQUI, Javier E. e colab. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 7, p. e1000982, 2010.

JANSEN, W. T.M. e colab. Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 9, p. 5202–5207, 2002.

KHAN, Fazlurrahman; JAIN, Saurabh; OLOKETUYI, Sandra Folarin. Bacteria and bacterial products: Foe and friends to *Caenorhabditis elegans*. *Microbiological Research*, v. 215, p. 102–113, 2018.

KHAN, Shahper N. e colab. Enhanced killing and antibiofilm activity of encapsulated Cinnamaldehyde against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. August, p. 1–15, 29; 2017.

KIM, Younghoon; MYLONAKIS, Eleftherios. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 7, p. 2500–2508, 2012.

KUMAR, Arun e colab. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host–microbe interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, n. 7, p. 1229–1249, 4 2019.

LAVIGNE, Jean-Philippe e colab. Influence of a high-glucose diet on the sensitivity of *Caenorhabditis elegans* towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. *Microbes and Infection*, v. 15, n. 8–9, p. 540–549, 2013.

LI, Le e colab. Glucose negatively affects Nrf2/SKN-1-mediated innate immunity in *C. elegans*. *Aging*, v. 10, n. 11, p. 3089–3103, 15 2018.

MENDLER, Michael e colab. 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*, v. 31, n. 2, p. 304–310, 2017.

MÖRCK, Catarina; PILON, Marc. *C. elegans* feeding defective mutants have shorter body lengths and increased autophagy. *BMC Developmental Biology*, v. 6, p. 1–11, 2006.

PETERS, Brian M. e colab. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 193–213, 1 2012.

PINKAS, Adi; LAWES, Michael; ASCHNER, Michael. System-specific neurodegeneration following glucotoxicity in the *C. elegans* model. *NeuroToxicology*, v. 68, n. July, p. 88–90, Set 2018.

RODRIGUES, Cristiane Freitas e colab. *Salvia hispanica* L. (chia) seeds oil extracts reduce lipid accumulation and produce stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Nutrition and Metabolism*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2018.

SALIM, Chinnu; RAJINI, P.S. Glucose feeding during development aggravates the toxicity of the organophosphorus insecticide Monocrotophos in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Physiology & Behavior*, v. 131, p. 142–148, 2014.

SALVADOR, Andrea Francesca; DE LIMA, Kalil Alves; KIPNIS, Jonathan. Neuromodulation by the immune system: a focus on cytokines. *Nature Reviews Immunology*, v. 0123456789, 2021.

SCHLOTTERER, Andreas e colab. *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. *Diabetes*, v. 58, n. 11, p. 2450–2456, 1 2009.

SIFRI, Costi D. e colab. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 2208–2217, Abr 2003.

SINGH, Jogender; ABALLAY, Alejandro. Neural control of behavioral and molecular defenses in *C. elegans*. *Current opinion in neurobiology*, v. 62, p. 34–40, 2020.

SOMASIRI, Pamodha e colab. Transcriptional response of *Caenorhabditis elegans* when exposed to *Shigella flexneri*. *Genomics*, v. 112, n. 1, p. 774–781, 2020.

TAN, Man Wah; MAHAJAN-MIKLOS, Shalina; AUSUBEL, Frederick M. 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*, v. 96, n. 2, p. 715–720, 1999.

The *C. elegans* sequencing consortium. Genome Sequence of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, v. 282, n. 5396, p. 2012–2018, 11 1998.

ZIMMER, Karine R. e colab. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus inhibits bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, v. 15, n. 7, p. 2008–2018, 2013.

Editais PROPPG nº 10/2022

Programa de fomento para a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA

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

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* códons 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:

Lenara Golbert (proponente) - 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).

Vanessa Suñé Mattevi (equipe) – 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.

Erika Laurini de Souza Meyer (equipe) - 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).

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 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 (CT) 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 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 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 US 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 CT 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).

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 ou pela citologia indeterminada (12). A citologia indeterminada inclui três diagnósticos citológicos específicos: atipia ou lesão folicular de significado indeterminado, neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia folicular e suspeita de malignidade. Deve-se atentar à grande variabilidade de risco de malignidade em nódulos retirados cirurgicamente nos casos com citologia indeterminada(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 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 CT, 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, 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 códon 12/13 do proto-oncogene *KRAS*.

3.5 Orçamento: Apresentado no Anexo 7-A Salienta-se que alguns materiais necessários e que não estão incluídos no Anexo 7-A 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:

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, Folgieri 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, MD, 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, Chiose S, 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://ej.e.bioscientifica.com>).
23. Kizys MML et al. Optimizing nucleic acid extraction from thyroid fine-needle aspiration cells in stained slides, formalin-fixed/paraffin-embedded tissues, and long-term stored blood samples. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56/9.
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).

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 (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) 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 órgãos, óbito) com biomarcadores de dano renal, bioquímicos e imunológicos	8-10
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

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.

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 (UFPel)
- 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 coirmãs, 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 número 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 liraglutida e Val(8)-GLP-1, podem reduzir a formação da placa amilóide, prevenir o comprometimento da memória e perda de sinapses no hipocampo além de resgatar a plasticidade sináptica em um modelo animal para doença de Alzheimer em camundongos (McClean *et al.*, 2011; Gengler *et al.*, 2012). Pode também, 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 (SRB, Sulforodamina B), Morte celular – apoptose e necrose (Caspase-3 clivada, IP, Iodeto de propídeo e HSC, Hoersch)
- Marcadores inflamatórios (S100B), Marcadores de astrócitos em diferentes fases de ativação (GFAP, EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT1, 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) e morte neuronal (Fluoro Jade C) em diferentes regiões do encéfalo;
- Investigar marcadores de astrócitos em diferentes fases de ativação (GFAP, EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT1, Sox-9), neurônios adultos (NeuN, Sinaptofisina), neurônios imaturos (Doublecortina) e de proliferação celular (PCNA) em diferentes regiões do encéfalo;
- Investigar a distribuição de receptores para o GLP-1 e Insulina (IR) e transportadores de glicose regulados por insulina (GLUT4, GLUT8), 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 $\pm$ 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 $\pm$ 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 (UFPeI).

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)

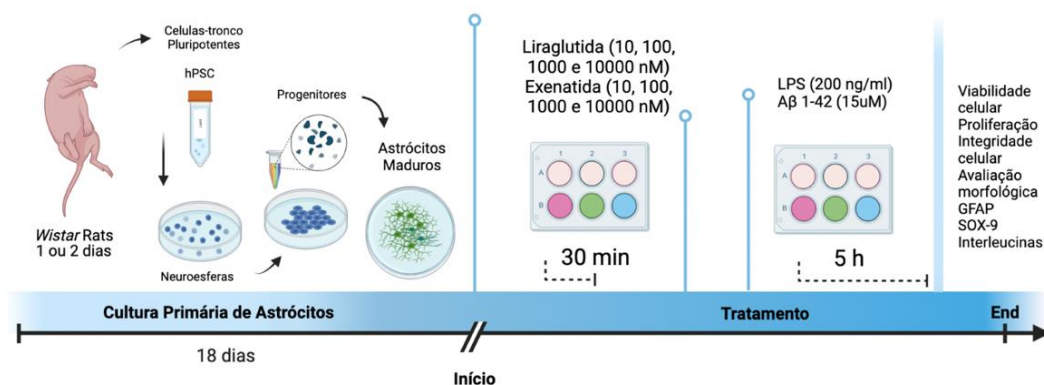


Figura 1 - Esquema experimental dos protocolos I e II

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 estereotáxico. Será injetado 0,2 mL de lidocaína no local da raspagem do periósteo, 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 µL/ventrículo). Animais controles receberão apenas o veículo FCSA (147 mM NaCl; 2,9 mM KCl; 1,6 mM MgCl, 1,7 mM CaCl 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 µg/kg/dia) e Liraglutida (200 µg/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:** Veiculo (Salina 0.9%)(n=10); **Grupo 2:** STZ icv bilateral (3 mg/kg)(n=10); **Grupo 3:** Exenatida 10 µg/kg (n=10); **Grupo 4:** Liraglutida (200 µg /kg) (n=10); **Grupo 5:** STZ + Exenatida 10 µg/kg (n=10); **Grupo 6:** STZ + Liraglutida 200 µg/kg (n=10)

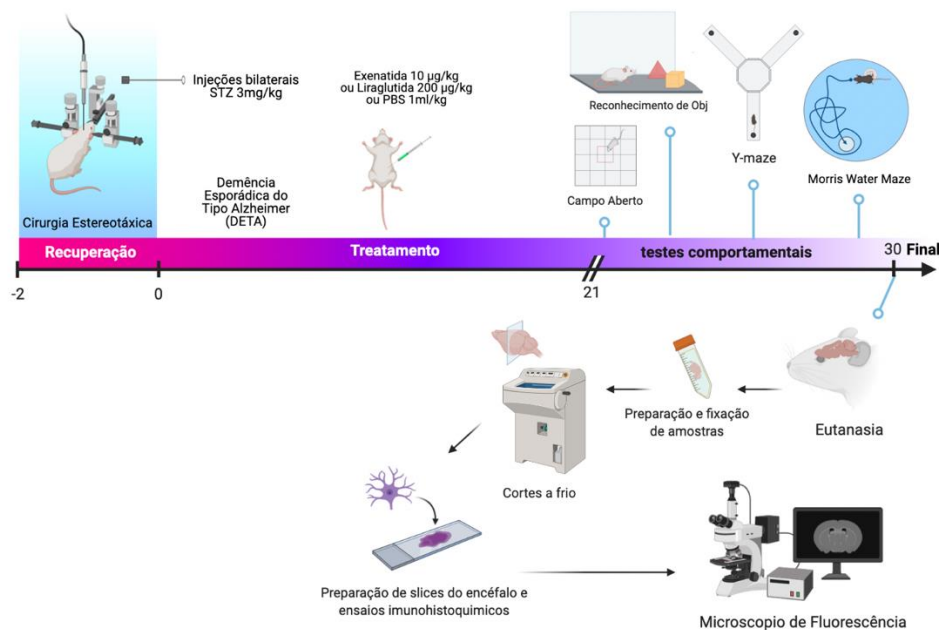


Figura 2. Esquema experimental

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 Flúor 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.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
PROJETO DE PESQUISA

1.1 TÍTULO: Efeito da Melatonina na Doença Hepática causada por Exposição ao Etanol em Peixe-zebra

PALAVRAS-CHAVE: doença hepática alcoólica, melatonina, zebrafish, permeabilidade intestinal

RESUMO: A esteatose hepática, relacionada ao abuso do álcool, é causa frequente 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 alcoólica (DHA) está associada 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 é um hormônio muito utilizado para o tratamento de distúrbios do sono, porém foram observadas outras aplicações importantes, como adjuvante no tratamento de cancer, melhora na defesa imunológica e regulação da glicose. A melatonina possui ainda uma potente atuação na diminuição do estresse oxidativo. Assim, a avaliação da ação da melatonina como substância antioxidante e anti-inflamatória no tratamento da doença hepática alcoólica pode trazer contribuições relevantes. Objetivo Geral: Verificar a ação da melatonina na Doença Hepática Alcoólica por exposição ao etanol. Objetivos 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 dos genes relacionados às claudinas: cldn-15a, cldn-15b, cldn-c pela técnica de qRT-PCR. 3) Quantificar a expressão proteica da iNOS, IL-1, IL-6 e NFkB no intestino de peixe-zebra, pela técnica de western-blot.

1.2 EQUIPE

PROPONENTE: Dra. Marilene Porawski

COLABORADORES: Dra. Themis Reverbel da Silveira, Dr. Orlando Vieira Furtado Filho, Daniela Diglio, Kevin Takahiro

1.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

1.3.1 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. A exposição ao etanol, tanto em seres humanos quanto em 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).

O etanol é responsável 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 está associado aos prejuízos na função de barreira no epitélio intestinal, promovendo ruptura das Tight Junctions (TJ), aumento na translocação de endotoxinas e a inflamação.

1.3.2 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 TJ 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.

1.3.3 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-κB, da IL-1b 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 e colaboradores (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 dextrana 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 DHA.

1.3.4 Zebrafish

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido popularmente como *zebrafish*, peixe zebra ou como paulistinha, pertence à família *Cyprinidae* e é um pequeno peixe teleosteo (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 & 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 & Wolfe, 2005).

Em relação à pesquisa das doenças humanas causadas pelo consumo aumentado 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). 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.

1.3.5 Justificativa

A doença hepática alcoólica está entre as principais causas de morte no mundo. Para o tratamento da DHA, a abstinência ao álcool proporcionaria melhora dos sintomas clínicos e a regressão parcial dos estágios avançados da doença. No entanto, essa estratégia nem sempre é bem-sucedida, principalmente por causa da dificuldade de adesão dos pacientes. Por isso, considera-se que não existe ainda um tratamento eficaz para esta doença que em estágios avançados, acarreta perda da qualidade de vida do paciente, aumenta os custos do sistema de saúde e podem levar à morte. Logo são necessárias pesquisas para descobrir terapias eficazes para tratamento 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 alcólica.

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 do etanol na esteatose hepática e fornecer evidência científica sobre a ação da melatonina na DHA.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1 GERAL: Verificar a ação da melatonina na Doença Hepática Alcoólica por exposição ao etanol.

1.4.2 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) Quantificar a expressão proteica da iNOS, IL-1, IL-6 e NFkB no intestino de peixe-zebra, pela técnica de western-blot.

1.5 METODOLOGIA PROPOSTA

1.5.1 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.

1.5.2 Amostra estudada

A amostra estudada constará de 250 peixes (*Danio rerio*), *wild-type*, adultos (acima de 3 meses), divididos em 3 grupos de 50 e 100 animais: 1) Controle (C); 2) Etanol (E); 3) Etanol + Melatonina (E+M). Na tabela apresentada no anexo 1 estão descritas as

técnicas que serão utilizadas e o respectivo número de animais necessários. O cálculo amostral foi baseado nos artigos indicados a seguir 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).

1.5.3 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.

1 - Grupo C (50 animais – 05 para hematoxilina + 15 western blot + 15 Nile red + 15 qRT-PCR) - grupo sem adição de etanol ou melatonina.

2- 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.

3 - 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.

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 será trocada a fim de uniformizar o protocolo.

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 uM (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).

O grupo que recebe somente melatonina será feito no protocolo experimental de outro projeto em andamento em nosso grupo de pesquisa e realizado nas mesmas condições deste.

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.

1.5.4 Avaliação histológica:

A coloração com Hematoxilina-eosina será 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 de três a cinco lâminas coradas com hematoxilina-eosina (Schneider *et al.*, 2017).

1.5.5 Quantificação de gordura hepática:

A coloração com Nile red será utilizada para detecção e medição fluorométrica quantitativa de gotículas lipídicas intracelulares através da espectrometria, utilizando espectrofotômetro 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)

1.5.6 Western blot:

O método de Western blot será utilizado para detecção de proteínas específicas. Envolve a separação de proteínas por eletroforese em gel e transferência para a membrana e imunodeteção 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).

1.5.7 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (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 permeabilidade intestinal (cldn-c, cldn-15a, cldn-15b). As amostras de 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).

1.5.6 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

1.5.7 Análise Estatística

Os dados serão descritos como média e desvio padrão nas variáveis quantitativas, e frequências e percentual nas variáveis qualitativas. A avaliação das diferenças entre variáveis quantitativas será realizada através da análise de variância ANOVA, se os resultados forem simétricos, 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.

1.5.8 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 foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre com o parecer 649/19.

1.6 CRONOGRAMA

Atividades/ Período	2023 1º trim	2023 2º trim	2023 3º trim	2023 4º trim
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Aquisição dos animais e materiais	X			
Desenvolvimento do modelo experimental e coleta das amostras	X	X		
Realização da técnica de HE e Nile Red		X		
Realização da técnica de Western blot e PCR- real time		X	X	X

Análise dos resultados		X	X	X
Redação do artigo científico			X	X
Publicação				X

1.7 PRODUTOS ESPERADOS

Formação de recursos humanos: 1 doutorado, 2 alunos de iniciação científica

Divulgação dos resultados em reuniões científicas e congresso

Publicação de um artigo científico em revista de impacto

1.8 POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO E/OU DIFUSÃO

Consolidação do laboratório e da linha de pesquisa em zebrafish na UFCSPA.

Geração de conhecimento novo sobre a ação da melatonina na prevenção e tratamento da doença alcoólica hepática.

Geração de conhecimento novo sobre os mecanismos de permeabilidade intestinal em reposta ao tratamento com melatonina na doença alcoólica hepática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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].

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

Ferrari JT, Ayres R, Hammes TO *et al.* Experimental modelo f hepatic steatosis by fructose in adult zebrafish: A pilot study. *Clin Biomed Res.* 2018;38(2)

Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013;93(2):525-569.

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

Jegatheesan P, De Bandt JP. Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients.* 2017; 9(3):230.

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.

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.

Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(9):1075-1083.

Osna NA, Donohue TM Jr, Kharbanda KK *et al.* Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol Res.* 2017;38(2):147-161.

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.

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.

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.

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.

Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *J Hepatol.* 2019 Mar;70(3):531-544.

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.

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

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título: Doenças monogênicas raras: caracterização molecular e computacional de variantes genéticas.

Palavras-chaves: doenças monogênicas; biologia molecular; genética; sequenciamento; bioinformática.

Resumo: Existem, no mundo, aproximadamente 7.000 doenças monogênicas conhecidas, sendo que a identificação de apenas metade dos genes alterados nestas patologias foi realizada. Apesar das extensas investigações para identificar a causa específica de uma doença rara, a etiologia da mesma permanece não identificada para muitos pacientes. Sendo assim, o diagnóstico para a maioria dos pacientes com suspeita de alguma condição monogênica continua imprecisa. Atualmente a possibilidade de sequenciamento de todo exoma e todo genoma (WES e WGS) permite a identificação de muitas variações genéticas novas e ferramentas computacionais auxiliam na elucidação das consequências fenotípicas destas variações. Desta forma, a caracterização molecular do genoma de pacientes com doenças monogênicas permite uma série de perspectivas benéficas para o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo e a identificação de fatores etiológicos e prognósticos para um aconselhamento familiar mais preciso. Assim, estratégias combinadas de genética médica, biologia molecular e bioinformática têm sido bem-sucedidas ao auxiliar na compreensão de diferentes doenças com etiologia genética. O objetivo deste trabalho é realizar a avaliação molecular de pacientes com diagnóstico clínico suspeito de diferentes alterações monogênicas raras e avaliar *in silico* as variantes genéticas encontradas.

DADOS DO PROPONENTE E EQUIPE

Proponente: Professora Marilu Fiegenbaum – PPG Ciências da Saúde, PPG Patologia e PPG Biociências (UFCSPA). <http://lattes.cnpq.br/7718325334309102>. Pesquisadora colaboradora.

Equipe:

Professor Rafael Fabiano Machado Rosa – PPG Patologia (UFCSPA).
<http://lattes.cnpq.br/7255679916272398>.

Professor Paula Ricardo Gazzola Zen – PPG Patologia (UFCSPA).
<http://lattes.cnpq.br/2755927536747919>. Pesquisador colaborador.

Desirée Deconte – PPG Patologia (UFCSPA). <http://lattes.cnpq.br/9054085370465653>.
Doutoranda.

Instituições parceiras:

- Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).
- Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV).

CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

Apresentação da proposta

Na patologia, muitas doenças são monogênicas, ou seja, em indivíduos afetados um único gene é responsável por conter uma variação patogênica que influencia diretamente na sua condição patológica. As doenças monogênicas são comumente referidas como transtornos Mendelianos, apesar de muitas destas não apresentarem estritamente padrões Mendelianos de herança, especialmente na presença de penetrância incompleta (Guo et al., 2016), na qual apenas uma parcela dos portadores do genótipo apresenta o fenótipo correspondente.

Existem, no mundo, aproximadamente 7.000 doenças monogênicas conhecidas, sendo que a identificação de apenas metade dos genes responsáveis por estas patologias foi realizada (Boycott et al., 2013). Enquanto a prevalência para a maioria das doenças causadas por mutações em um único gene é baixa e definidas, então, com raras, as doenças monogênicas juntas acometem aproximadamente 10 indivíduos a cada 1.000 nascimentos de acordo com dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (Fagioli et al., 2013). Além disso, os fenótipos apresentados em pacientes

diagnosticados pela maioria destas condições envolvem morte, incapacidade ou malformação congênita, as quais trazem uma série de problemas tanto para as famílias afetadas como para o sistema de saúde público e privado (Yan et al., 2015). Apesar das extensas investigações para identificar a causa específica de uma doença rara, a etiologia da mesma permanece não identificada para muitos pacientes. Avanços recentes, como análises cromossômicas em microarray e testes de DNA em painel multigênico, bem como o sequenciamento de genoma ou exoma, tem motivado novas abordagens para o mapeamento de genes associados a doenças e estimulou a rápida descoberta de genes subjacentes a centenas de doenças monogênicas (Boycott et al., 2015 e Chong et al., 2015). Entretanto, para a maioria destas, as causas genéticas ainda não foram descobertas ou foram descobertas apenas para um conjunto de casos. Sendo assim, o diagnóstico para a maioria dos pacientes com suspeita de alguma condição monogênica continua imprecisa (Boycott et al., 2015 e Guo et al., 2016).

Análise clínica e molecular

A Genética Médica refere-se a toda aplicação prática da Genética à Medicina. Ela abrange o estudo da herança das doenças nas famílias, a identificação de genes causadores de doenças, a análise dos mecanismos moleculares através dos quais os genes causam doenças, o diagnóstico e a possibilidade de tratamento e prevenção de doenças genéticas (Carakushansky, 2001). Ela abrange também o aconselhamento genético, que consiste na informação quanto aos riscos, prognóstico e tratamento de apoio dispensado aos pacientes e suas famílias (Carakushansky, 2001; Cassidy e Allanson, 2005). Atualmente as análises de sequenciamento de todo exoma e todo genoma (WES e WGS) permite a identificação de muitas variações genéticas novas e ferramentas computacionais auxiliam na elucidação das consequências fenotípicas destas variações (Chong et al., 2015). Sendo assim, cada descoberta bem-sucedida é uma futura contribuição para possíveis diagnósticos, prevenções e oportunidades terapêuticas para as doenças correspondentes e, ainda, um auxílio para a elucidação dos mecanismos biológicos e patológicos destes fenótipos (Biesecker, 2010; Gonzaga-Jauregui et al., 2012). Desta forma, o aconselhamento genético para famílias com integrantes portadores de doenças monogênicas poderá ser realizado de maneira

adequada, garantindo um melhor prognóstico e apoio para estes pacientes e seus familiares.

De fato, está surgindo uma nova visão dos transtornos monogênicos, já que pacientes com sintomas antes não explicados estão sendo cada vez mais diagnosticados com mutações causais específicas. Como o grau de heterogeneidade na apresentação da doença também está aumentando, é claro que a completa complexidade do painel genético em transtornos monogênicos ainda está longe de ser completamente compreendida. Ainda há muito a se aprender a respeito do espectro fenotípico da maioria das doenças monogênicas, e conclusões sólidas estão aguardando o acúmulo de dados ao passo que a medicina genômica vai ganhando experiência no ramo do diagnóstico clínico e molecular destas condições (Stranneheim e Wedell, 2016).

Análise *in silico*

A American College of Medical Genetics and Genomics e a Association for Molecular Pathology estipularam normas e orientações para a interpretação de variantes genéticas de forma a aprimorar a investigação e a elucidação da potencial relação genótipo-fenótipo nas doenças raras. Isso se deve ao fato de que cada paciente pode ser único no mundo, sendo a variação identificada como possível causadora do fenótipo analisado ainda não descrita (“nova mutação”) e não caracterizada em termos de funcionalidade. Algoritmos de predição e critérios de patogenicidade devem ser considerados na análise a fim de providenciar uma avaliação mais fidedigna do nível de importância patológica de variantes na população. Sabe-se que polimorfismos existem em diferentes populações e que essas variantes não necessariamente indicam risco de patogenicidade para o indivíduo portador (Richards et al., 2015).

Concomitantemente aos algoritmos de predição, análises de bioinformática permitem, também, a investigação a nível proteico das alterações ocasionadas por variantes, possibilitando a elucidação de causas moleculares e a realização da associação entre genótipo-fenótipo (Gasteiger et al., 2005; Yang et al., 2015). Estratégias combinadas de genética médica, biologia molecular e bioinformática têm sido bem-sucedidas ao auxiliar na compreensão de diferentes doenças com etiologia genética, como fibrose cística e deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (Michels et al., 2019; Pinheiro

et al., 2019). A análise da desordem proteica é um exemplo de análise *in silico* que pode ser realizada para avaliar o tipo de alteração que a variante encontrada causa na estrutura e na conformação da proteína (Dunker et al., 2002(a); Uversky et al., 2008). Análises *in silico* de variantes encontradas nos pacientes avaliados pelo Serviço de Genética da UFSCPA mostraram que a desordem proteica pode explicar a perda de funcionalidade, ou má funcionalidade da proteína. Em um paciente diagnosticado com a síndrome de Marshall-Smith foi encontrada uma duplicação de sete nucleotídeos que alterou toda a sequência de aminoácidos posterior a ela. Ao realizar a investigação computacional, foi possível notar que a estrutura antes desordenada, se tornou ordenada com a presença da duplicação. A ordenação de uma região implica diretamente nas suas interações intermoleculares e, conseqüentemente, na sua função.

Dessa forma, a análise molecular aliada à análise computacional proporciona uma investigação mais completa de novas variantes genéticas, auxiliando na elucidação de causas moleculares e na associação entre genótipo-fenótipo, bem como na relevância da mesma a nível populacional.

OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Objetivo geral: Caracterizar no âmbito clínico, molecular e *in silico* pacientes com suspeita de alterações monogênicas raras diagnosticados pelo Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Objetivos específicos:

I. Realizar a avaliação clínica e molecular de pacientes com diagnóstico clínico suspeito de diferentes alterações monogênicas raras associadas aos genes investigados neste estudo e diagnosticadas no Serviço de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

II. Realizar a análise computacional através de algoritmos de predição para a estrutura e função proteica, bem como a conservação evolutiva das variantes encontradas.

III. Avaliar as variantes encontradas para critérios de patogenicidade através das normas e orientações estipuladas pelo American College of Medical Genetics and Genomics e a Association for Molecular Pathology para a interpretação de variantes.

METODOLOGIA PROPOSTA

Delineamento: O projeto consiste em um estudo observacional, transversal, envolvendo uma série de pacientes e seus genitores. O presente estudo faz parte do projeto intitulado “Estudo de aspectos etiológicos e clínicos de pacientes com doenças genéticas ou síndromes malformativas atendidos no Serviço de Genética Clínica”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (CAAE: 69178217.7.0000.5345).

Amostra e dados clínicos

O material clínico utilizado para a pesquisa consiste de dados e de imagens de exames complementares constantes nos prontuários médicos dos pacientes atendidos pelos serviços de Genética Clínica da UFCSPA. Este material será preservado confidencial e de uso exclusivo dos pesquisadores. Será sempre assegurado o anonimato dos pacientes envolvidos na pesquisa, os quais serão identificados apenas através de números. Em todos os casos foi aplicado um termo de consentimento livre e esclarecido, tanto para utilização dos dados clínicos e realização da análise molecular como para o uso das imagens dos pacientes.

A amostra é constituída de pacientes e familiares atendidos pelos Serviços de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Foram incluídos no estudo apenas pacientes que apresentavam características clínicas compatíveis com doenças monogênicas. Pacientes nos quais não for possível realizar a coleta de sangue periférico para extração de DNA serão excluídos do estudo. Os dados clínicos foram obtidos a partir das fichas de atendimento do Serviços de Genética Clínica envolvido. Foram anotadas informações referentes ao sexo e idade dos indivíduos; história familiar e gestacional; dados do nascimento e de

evolução clínica; exame físico dismorfológico e resultados de exames complementares realizados (tanto de imagem como laboratoriais).

Análises moleculares

Para as análises moleculares, o material genético foi extraído das amostras de sangue coletadas em tubos de EDTA dos pacientes através do método de precipitação com alta concentração de sal, descrita por Lahiri e Nurnberger (1991). Os DNAs extraídos encontram-se congelados e estocados em refrigerador no laboratório de Genética Clínica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Os procedimentos realizados neste trabalho consistirão em amplificação e sequenciamento dos DNAs de todos os indivíduos e identificação de variantes nos genes investigados.

A amplificação será realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. Os pares de primers foram desenhados com auxílio do programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para cobrir toda região codificante ou região onde variantes já foram descritas dos genes de interesse. Uma parcela dos primers já foi adquirida e encontra-se estocada em refrigerador no Serviço de Genética Clínica da UFCSPA. Os demais primers serão desenhados e, posteriormente, adquiridos e estocados em refrigerador. As condições de termociclagem serão estabelecidas ao longo do desenvolvimento do projeto.

Após a reação de PCR, as amplificações dos produtos de interesse serão verificadas através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed. Os produtos de PCR serão purificados com 10U de Exonuclease I e 2U de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), através de incubação por 15 min a 37°C e 15 min a 80°C. O sequenciamento das amostras será realizado utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3130 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) serão marcados por PCR utilizando-se 3,2 pmol dos primers forward e 2 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação serão realizadas em termociclador com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após marcadas, as amostras serão purificadas pela precipitação

com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados serão diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento serão coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; BioLIMS Project “3100_Project1”; Run Module 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e Analysis Module 1 “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

Após o sequenciamento, será realizada a análise dos eletroferogramas com o programa Chromas Lite. O alinhamento das sequências dos pacientes, seus familiares e do controle externo será feito com o auxílio do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7.

Análises *in silico*

Para a triagem e a avaliação das variantes moleculares associadas a doenças raras identificadas nesse projeto, diferentes técnicas computacionais preditivas serão empregadas. No nível gênico, serão usadas as 25 ferramentas recomendadas pelas Diretrizes para Interpretação de Variantes de Sequências da ACMG quanto às análises preditivas para troca de sentido, alteração de sítios de splicing e conservação de nucleotídeos (Richards et al., 2015).

No nível proteico (considerando possíveis produtos gênicos viáveis), os quatro níveis hierárquicos de sua estrutura serão avaliados. Em nível primário, serão analisados os perfis físico-químicos (distribuição de cargas, alternância de hidrofobicidade, preferência de composição aminoacídica), com uso da Plataforma ProtParam (Gasteiger et al., 2005). Em nível secundário, serão realizadas análises preditivas e comparativas de elementos conservados de estrutura secundária, empregando a plataforma Phyre2. Em nível terciário, as estruturas peptídicas serão construídas com auxílio do software dedicado Modeller e da suíte I-TASSER (Marti-Renom et al., 2000; Yang et al., 2015). Potenciais interações de nível quaternário serão investigadas com as plataformas SymmDock e DockThor (Schneidman-Duhovny et al., 2005; Magalhães et al., 2019).

Algoritmos de predições estipulados pela American College of Medical Genetics and Genomics e a Association for Molecular Pathology serão utilizados para realizar a

avaliação dos critérios de patogenicidade das variantes encontradas a nível populacional, de estrutura proteica e conservação evolutiva.

ETAPAS DE EXECUÇÃO DO PROJETO COM RESPECTIVO CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Principais atividades	Meses											
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cursar as disciplinas	X	X	X	X	X	X	X					
Realização de PCR	X	X	X	X	X	X	X	X				
Análise dos sequenciamentos		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Avaliação <i>in silico</i>				X	X	X	X	X	X	X	X	X
Artigos originais							X	X	X	X	X	X
Redação da tese									X	X	X	X

PRODUTOS ESPERADOS COMO RESULTADO DA EXECUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Formação de recursos humanos: Através do projeto pretende-se formar uma aluna de doutorado, com envolvimento de pelo menos um aluno de iniciação científica.

Produção científica: Este trabalho terá impacto para divulgação em congressos nacionais e internacionais da área, assim como a redação e publicação de artigos em periódicos de impacto internacional. Pretende-se através da abordagem a publicação de um mínimo de um artigo para cada um dos casos avaliados nesse projeto.

Consolidação da pesquisa na área de genética monogênica na UFCSPA através de parcerias já estabelecidas: Este projeto servirá para consolidar esta linha de pesquisa na UFCSPA e servirá para ampliar o conhecimento na área. Além disso, uma vez identificadas novas variantes genéticas, este tipo de abordagem poderá ser estendido para outras áreas onde o grupo atualmente também desenvolve projetos de pesquisa.

POTENCIAL DE IMPACTO DOS RESULTADOS DO PONTO DE VISTA TÉCNICO-CIENTÍFICO, DE INOVAÇÃO, DIFUSÃO, SÓCIOECONÔMICO E AMBIENTAL

Dentro do contexto de expansão da Pesquisa na UFCSPA, o presente projeto pretende contribuir para a consolidação da pesquisa na Instituição, bem como expandir a pesquisa na área de doenças monogênicas raras. A originalidade desse trabalho consiste em caracterizar molecularmente pacientes com diferentes doenças monogênicas de forma a permitir: 1) o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo, 2) o melhor manejo e tratamento destes pacientes, 3) a possível identificação de fatores etiológicos e prognósticos e 4) um aconselhamento familiar mais preciso.

Estratégias combinadas de genética médica, biologia molecular e bioinformática têm sido bem-sucedidas ao auxiliar na compreensão de diferentes doenças com etiologia genética. Sendo assim, espera-se que por meio de ferramentas *in silico*, obtenha-se informações que embasem a proposição de mecanismos fisiopatológicos associados às manifestações clínicas das diferentes doenças raras analisadas, inclusive justificando variações interpessoais em pacientes acometidos por uma mesma síndrome analisada.

Finalmente, os resultados do presente estudo contribuirão para a elaboração de trabalhos que serão encaminhados a congressos e periódicos especializados de circulação nacional e internacional, além de integrar as atividades deste núcleo de pesquisa com iniciativas semelhantes em outras instituições nacionais e internacionais para promover o desenvolvimento científico e transferência de informação na área.

REFERÊNCIAS

Biesecker, L.G. Exome sequencing makes medical genomics a reality. Nat. Genet. 42, 13–14, 2010.

Boycott, K.; Hartley, T.; Adam, S.; Bernier, F.; Chong, K.; Fernandez, B.A.; Friedman, J.M.; Geraghty, M.T.; Hume, S.; Knoppers, B.M.; Laberge, A.M.; Majewski, J.; et al. The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: Position Statement of the Canadian College of Medical Geneticists. J Med Genet. 52(7):431-7, 2015.

Boycott, K.M.; Vanstone, M.R.; Bulman, D.E.; MacKenzie, A.E. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: Discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14(10):681–691, 2013.

Carakushansky G. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Cassidy S.B.; Allanson .JE. Management of genetic syndromes. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Liss; 2005.

Chong, J.X.; Buckingham, K.J.; Jhangiani, S.N.; Boehm, C.; Sobreira, N.; Smith, J.D.; Harrell, T.M.; McMillin, M.J.; Wiszniewski, W.; Gambin, T.; et al. The genetic basis of Mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities. *Am J Hum. Genet.* 97, 199–215, 2015.

Dunker, A.K.; Brown, C.J.; Lawson, J.D.; Iakoucheva, L.M.; Obradovic, Z. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry.* 41:6573–82, 2002.

Fagioli, S.; Daina, E.; D'Antiga, L.; Colledan, M.; Remuzzi, G. Monogenic Diseases that can be cured by liver transplantation. *J Hepatol.* 59(3):595-612, 2013.

Gasteiger E.; Hoogland C.; Gattiker A.; Duvaud S.; Wilkins M.R.; Appel R.D.; Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 571-607, 2005.

Gonzaga-Jauregui, C.; Lupski, J.R.; Gibbs, R.A. Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med.* 63, 35–61, 2012.

Guo, M.H; Dauber, A.; Lippincott, M.F.; Chan, Y.; Salem, R.M; Hirschhorn, J.N. Determinations of power in gene-based burden testing for monogenic disorders. *Am J Hum Genet.* 1;99(3):527-39, 2016.

Magalhães, C.S.; Almeida, D.M.; Barbosa, H.J.C.; Dardenne, L.E. A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands. *Information Sciences,* 289, p. 206-224, 2014.

Marti-Renom, M.A.; Stuart, A.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Sali, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29, 291-325, 2000.

Michels, M.; Matte, U.; Fraga, L.R.; Mancuso, A.C.B.; Ligabue-Braun, R.; Berneira, E.F.R.; Siebert, M.; Sanseverino, M.T.V. Determining the pathogenicity of CFTR

missense variants: Multiple comparisons of in silico predictors and variant annotation databases. *Genet. Mol. Biol.* 42:560-570, 2019.

Pinheiro, F.C.; Sperb-Ludwig, F.; Ligabue-Braun, R.; Schüler-Faccini, L.; de Souza, C.F.M.; Vairo, F.; Schwartz, I.V.D. Genetic analysis of patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Gene*. 699:102-109; 2019.

Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; Voelkerding, K.; Rehm, H.L. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 17(5): 405–424, 2015.

Schneidman-Duhovny, D.; Inbar, Y.; Nussinov, R.; Wolfson, H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucl. Acids. Res.* 33: W363-367, 2005.

Stranneheim, H.; Wedell, A. Exome and genome sequencing: a revolution for the discovery and diagnosis of monogenic disorders. *J Intern Med.* 279(1):3-15, 2016.

Uversky, V.N.; Oldfield, C.J.; Dunker, A.K. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 215–46, 2008.

Yan, L.; Huang, L.; Xu, L.; Huang, J.; Ma, F.; Zhu, X.; Tang, Y.; Liu, M.; Lian, Y.; Liu, P.; Li, R.; Lu, S.; Tang, F.; Qiao, J.; Xie, X.S. Live births after simultaneous avoidance of monogenic diseases and chromosome abnormality by next-generation sequencing with linkage analyses. *Proc Natl Acad Sci.* 29;112(52):15964-9, 2015.

Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12:7-8, 2015.

i) Identificação da proposta

Título: Proteção radiológica na radiologia intervencionista: avaliação dosimétrica.

Resumo

Feixes de radiações ionizantes têm sido amplamente utilizados em procedimentos médicos, tanto para o diagnóstico quanto para tratamento de doenças. A radiologia intervencionista é uma das especialidades de diagnóstico que proporciona maiores doses a pacientes e profissionais envolvidos, já que em alguns procedimentos o tempo de exposição é longo, assim como, as taxas de dose, utilizadas para gerar imagens quase em tempo real. Porém, é uma área deveras importante, pois possibilita procedimentos complexos e minimamente invasivos, como cortes cirúrgicos pequenos, de forma mais segura e altamente eficaz. O aumento do uso dessas técnicas sem um adequado programa de proteção radiológica, pode acarretar em danos biológicos, como lesões radioinduzidas, muitas vezes irreversíveis aos indivíduos expostos às doses de radiação. A quantificação da dose de radiação em procedimentos de radiologia intervencionista, além de ser um desafio, é de grande interesse na Física Médica. A utilização de filmes radiocrômicos, por suas características de alta resolução espacial, tecido equivalente e baixa dependência energética, durante esses procedimentos permitirá uma avaliação mais acurada da distribuição de dose ao longo de toda a superfície exposta. Assim, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar filmes radiocrômicos, para serem utilizados na mensuração das doses recebidas pelos pacientes durante procedimentos intervencionistas.

Palavras-chaves: radiologia intervencionista, filme radiocrômico, proteção radiológica.

ii) Descrição da equipe

O projeto de colaboração interinstitucional conta, inicialmente, com o apoio de professores, colaboradores e alunas de graduação conforme descrito abaixo:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - (UFCSPA)

Prof. Dr. Mirko Salomón Alva Sánchez (Coordenador do projeto)

Prof^a. Dr^a. Gabriela Göethel

Prof. Dr. Henrique Trombini

Prof. Dr. João Vinicius Batista Valença

Prof^a. Dr^a. Maíra Tiemi Yoshuzimi

Prof^a. Dr^a. Thatiane Alves Pianoschi Alva

Alunas de graduação: Julia Forell

Luiza Stefani Brune Leidemer

Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dr. William de Souza Santos

Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Física Laura Morás – SEMST

iii) **Caracterização da proposta**

A fluoroscopia tem sido uma ferramenta muito útil, quais sejam para o diagnóstico ou para a terapia. Sua grande contribuição consiste no fornecimento de imagens quase em tempo real com alta resolução temporal, permitindo estudos dinâmicos de estruturas e líquidos internos. A radiologia intervencionista consiste na realização de procedimentos intervencionistas com o uso de imagens em tempo real e apresenta um ótimo custo-benefício comparado com procedimentos cirúrgicos equivalentes.

Porém, os sistemas de fluoroscopia são, dentre os equipamentos utilizados na radiologia, os que mais expõem os pacientes à radiação. Isso porque os procedimentos, tanto diagnósticos quanto intervencionistas, duram mais do que alguns minutos, consequentemente expondo os pacientes a uma quantidade de radiação maior. As doses administradas aos pacientes podem provocar reações teciduais como eritema e epilação temporária, assim como, contribuir com algum efeito estocástico carcinogênico ou hereditário [McPARLAND, 1998].

A exposição à radiação ionizante pela população vem aumentando significativamente ao longo dos anos, principalmente devido às fontes artificiais. Quando as células do corpo são expostas à radiação ionizante ocorrem eventos físicos devido à deposição de energia. Esses eventos físicos podem ocasionar efeitos químicos e biológicos, que podem promover danos macroscópicos aos tecidos e órgãos, acarretando o surgimento de doenças associadas.

Isto posto, é imprescindível a implementação de programas de proteção radiológica nesses serviços, como preconizado nas regulamentações nacionais [ANVISA, 2019; CNEN, 2005]. O principal objetivo da proteção radiológica é viabilizar os usos da radiação ionizante, pois são consenso geral seus enormes benefícios, de uma forma segura, evitando os efeitos determinísticos e reduzindo a probabilidade de ocorrência de efeitos estocásticos. Dessa forma, nenhuma prática deve visar os limites de dose estabelecidos, pois estes não são limites entre o “perigoso” e o “seguro”. Esse é um dos princípios da radioproteção, a otimização da proteção a fim de utilizar a menor dose necessária para os fins justificados.

A Metrologia das Radiações, cujo objetivo é desenvolver métodos e equipamentos para medição das grandezas associadas à radiação ionizante, é um dos braços da proteção radiológica. Dentro dessa área estão incluídas: monitoração individual, monitoração de área, calibração de fontes e detectores, levantamento radiométrico, dentre outras atividades.

Na prática clínica e hospitalar, a metrologia das radiações é de suma importância, pois a exposição médica está crescendo a cada dia e comparando os valores da dose recebida pela população norte-americana em 2006 [NCRP, 2009] com os dados anteriores,

de 1980 [NCRP, 1987], observa-se um aumento na dose efetiva devida à exposição médica, indo de 0,53 mSv a 3,0 mSv per capita (Figura 1). Isso representa um aumento de 566% na dose efetiva. Outro dado que chama atenção é a fonte dessas exposições. Em 1980, a dose de radiação advinda dos procedimentos intervencionistas representava apenas 3% das exposições médicas, valor este, que subiu para 14% em 2006. A Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) em conjunto com a Organização Mundial de Saúde (OMS), na Conferência Internacional sobre Proteção contra Radiação em Medicina em 2012, publicou dez ações principais identificadas como essenciais para o fortalecimento da proteção contra radiação na medicina na próxima década em todo o mundo (WHO, 2012). Na lista publicada, correspondendo à quarta ação, está o item “reforçar a educação e o treinamento em proteção radiológica dos profissionais de saúde”. Cientes da importância deste tema para a segurança e preservação da saúde dos trabalhadores, autoridades nacionais como a Secretaria de Trabalho do Ministério da Economia, a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam uma atualização periódica em proteção radiológica para trabalhadores ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes.

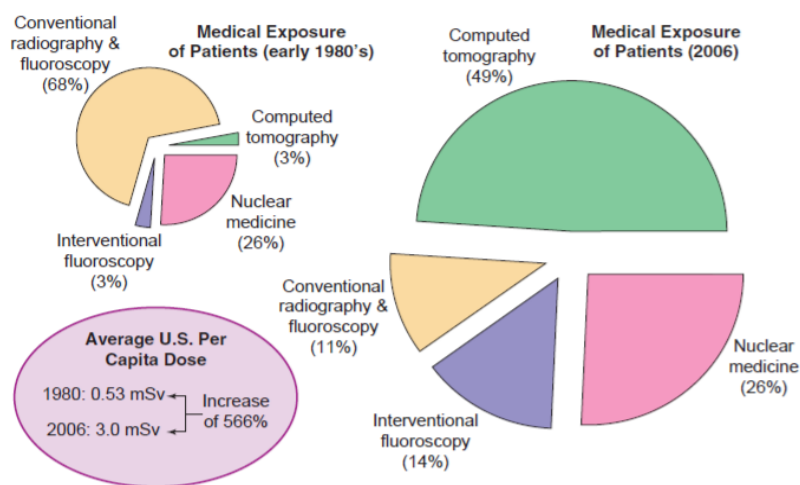


Figura 1: Doses efetivas anuais médias por pessoa nos Estados Unidos por procedimentos de imagens médicas em 2006. Retirado de (Bushberg, 2012), adaptado de NCRP 93 e NCRP 160 [NCRP, 1987 e NCRP, 2009].

Além do aumento de dose efetiva em pacientes, indivíduos ocupacionalmente expostos (IOE) que atuam na área de radiologia intervencionista também recebem doses mais elevadas. Esse aumento de dose é de difícil quantificação uma vez que depende de diversos fatores como por exemplo, a localização dos dosímetros, as técnicas e o equipamento utilizado e as medidas de proteção radiológica empregadas [TSAPAKI, 2001].

A relação entre o aumento de dose nesses procedimentos e o possível dano biológico advindo nem sempre é obtida diretamente. Estudos mostram que as doses recebidas pelos IOEs no setor de radiologia intervencionista podem induzir danos mensuráveis ao DNA e alterações de expressão gênica [BASHEERUDEEN, 2017; VISWESWARAN, 2019], que, podem elevar o risco do IOE desenvolver catarata e câncer [CIRAJ-BJELAC et al., 2010; LINET et al., 2012; LEE et al., 2021]. Dessa forma, quantificar a dose efetiva recebida pelos pacientes e IOEs é de extrema importância para minimizar os riscos oriundos dessa prática médica.

Uma das maneiras para realizar a medição da dose para exposição externa é a utilização de dosímetros e objetos simuladores. Os dosímetros mais utilizados são os dosímetros termoluminescentes (TLDs – thermoluminescent dosimeters) e opticamente estimulados (OSLDs – do inglês, *optically stimulated luminescence dosimeters*), os diodos, as câmaras de ionização e os filmes radiográficos e radiocrômicos. Os objetos simuladores podem ser de água, água sólida, acrílico, ou de outros materiais equivalentes, ou antropomórficos. Outra ferramenta dosimétrica para determinações de distribuições de dose são os filmes radiocrômicos que possuem a vantagem de pouca sensibilidade à luz ultravioleta, possibilidade de submersão na água, resistência a altas temperaturas, saturação de dose acima de 40 Gy, alta resolução espacial, praticidade de uso e visualização imediata da área irradiada possibilitam as determinações de distribuições de dose, inclusive em geometrias nas quais o dosímetro deve ser posicionado na água [HANSEN et al. 2019, VILLARREAL-BARAJAS et al. 2014]. A determinação da dose de modo experimental apresenta algumas limitações como, por exemplo: limitações do dosímetro (dependência energética, resolução limitada, tempo de leitura), limitações do objeto simulador (material de composição homogênea ou com pouca variação de densidades, custo elevado) e limitações na geometria do problema como dimensões [DUFEK et al. 2011, GIADDUI et al.. 2013].

A simulação computacional pelo método de Monte Carlo apresenta-se como uma solução viável e eficaz para contornar limitações experimentais ou até mesmo estimar com alta acurácia. A partir dessas simulações é possível estimar a dose em um órgão ou tecido tridimensionalmente utilizando geometrias complexas. A publicação 110 da *International Commission on Radiological Protection* (ICRP) [ICRP, 2009] apresenta simuladores antropomórficos computacionais de adultos referências, dos gêneros feminino e masculino, baseados em imagens médicas de pessoas reais, mas ainda em acordo com os parâmetros anatômicos de referência apresentados na publicação 89 [ICRP, 2002]. Esses simuladores são muito utilizados, porém, as simulações computacionais não se limitam ao uso dessas referências [CASSOLA et al. 2010]. A utilização do método de Monte Carlo para simular o transporte da radiação é também um procedimento demorado, pois envolve a simulação da

ordem de 10^7 ou mais partículas. Além disso, os modelos simulados devem ser validados para garantir que estes representem a complexidade do problema [MARCHANT E JOSHI, 2017]. Entretanto, uma vez validado o modelo, ele pode ser utilizado sem a necessidade de se repetir esse em outros processos trabalhos

Assim, com o contexto supracitado, a determinação da dose depositada durante os procedimentos intervencionistas permitirá uma avaliação dos danos causados pelas radiações ionizantes. Além disso, os filmes radiocrômicos serão caracterizados nos mesmos feixes clínicos que serão utilizados para determinação da dose recebida pelos pacientes durante procedimentos intervencionistas. O filme radiocrômico apresenta algumas vantagens como: auto-revelação, dispensando o processamento químico, a alta sensibilidade e grande resolução espacial, o que permite determinar não somente a dose total recebida, mas também a sua distribuição espacial. De forma concomitante, serão realizadas simulações computacionais, utilizando simulação Monte Carlo com o código MCNPX (PELOWITZ, 2011) para comparar os resultados obtidos experimentalmente.

iv) Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto é quantificar a dose de radiação no paciente e no IOE em procedimentos intervencionistas utilizando filmes radiocrômicos e simulação Monte Carlo. A partir do conhecimento da dose depositada será possível estimar os danos biológicos advindos da prática intervencionista.

a) Objetivos específicos

- I. Revisão bibliográfica;
- II. Validação/Simulação do feixe de radiação com o código MCNPX;
- III. Simulação do material do filme radiocrômico e toda sua caracterização por meio código MCNPX;
- IV. Simulação de cenários de radiologia intervencionista para determinação de parâmetros dosimétricos e distribuições de dose nos pacientes e nos IOEs;
- V. Caracterização do filme radiocrômico para os feixes de radiologia intervencionista utilizados;
- VI. Irradiação do filme radiocrômico nas condições clínicas de irradiação com o equipamento de radiologia intervencionista para determinação de parâmetros dosimétricos e distribuições de dose nos pacientes e nos IOEs;
- VII. Análise dos resultados obtidos com a simulação e com os determinados experimentalmente;
- VIII. Redação de artigos científicos e relatórios técnicos-científicos.

v) Metodologia proposta

Em meados da década de 60 um novo tipo de filme, conhecido como filme radiocrômico começou a ser estudado por apresentar características diferenciadas às encontradas em filmes radiográficos convencionais (ROOZEN *et al*, 2011). Entre essas características pode-se destacar a relativa insensibilidade à luz visível e a formação de imagem visível sem a necessidade de processamento químico. Assim, algumas propriedades dosimétricas desses filmes têm sido estudadas como: resolução espacial, linearidade, saturação, variação de resposta com a dose e energia (ALAND *et al.*, 2011).

Os filmes radiocrômicos não irradiados apresentam uma coloração translúcida e depois de irradiados essa coloração é alterada e uma imagem visível é formada. Essa mudança de coloração ocorre por um processo de polimerização, em que a energia da radiação é transferida para a parte receptiva da molécula foto-monomérica sem cor, iniciando a formação da coloração por meio de alterações químicas. Dessa reação, resulta uma poli-conjugação homogênea ao longo da cadeia do carbono presente no filme alterando a cor na região irradiada (AAPM, 1998). A figura 2 mostra a mudança de coloração em função da dose depositada do filme radiocrômico GAFCHROMIC XR-RV2.



Figura 2: Tiras irradiadas com: 0 mGy (não irradiada); 150/ 500/ 1000/ 2000/ 3000/ 4000 e 5000 mGy, respectivamente [SILVA *et al.*, 2010].

Para este estudo será utilizado o filme radiocrômico GAFCHROMIC XR-RV3, fabricado pela *International Specialty Products, New Jersey-USA*, o qual apresenta quatro camadas, quais sejam: substrato, adesivo, camada sensível e substrato, com espessuras de 97 microns, 20 microns, 17 microns e 97 microns, respectivamente. Estes filmes foram desenvolvidos para medidas na faixa de 0,05 Gy a 15 Gy dentro de uma faixa de energia de 20 - 200 keV. Além disso, será utilizado o equipamento neurorradiológico, um angiógrafo Canon do modelo Alphenix da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Primeira etapa: Inicialmente, será validado o feixe de radiação utilizando a simulação Monte Carlo. Posteriormente, será realizada a simulação do material do filme radiocrômico e toda sua caracterização por meio do código MCNPX. Após essa validação, serão realizadas simulações em cenários de radiologia intervencionista já construídos e validados por colaboradores deste projeto. Dessa forma, serão obtidos os parâmetros dosimétricos,

assim como as distribuições de dose seguindo os protocolos internacionais. Todas as simulações serão realizadas nos computadores pessoais dos proponentes do presente trabalho, os quais possuem a licença de todos os programas envolvidos na pesquisa.

Segunda etapa: A segunda etapa deste projeto consiste na caracterização do filme radiocrômico GAFCHROMIC XR-RV3 nas faixas de energia e dose às quais o filme será exposto. Para isso, as folhas serão cortadas em pequenas tiras de 3 cm x 3 cm e expostas a diferentes feixes de radiação. Serão utilizadas energias na faixa de 60-150 keV e doses absorvidas de até 5 Gy. A caracterização do filme consiste em analisar a dependência energética, orientação e posicionamento de escaneamento do filme, tamanho e proporção do filme. Para a leitura dos filmes serão utilizados dois métodos: digitalização das imagens por um *scanner* comercial e utilizando um densitômetro. As imagens digitalizadas serão analisadas por meio de um código de programação desenvolvido em Python para realizar as análises gráficas e analíticas. Para o método utilizando um densitômetro, serão escolhidos pontos dispersos ao longo da superfície do filme, e a média das medições juntamente com o desvio padrão será utilizado para a calibração.

Terceira etapa: Após a caracterização e calibração do filme radiocrômico GAFCHROMIC XR-RV3 serão realizadas exposições do objeto simulador nas condições clínicas. Os filmes serão posicionados sobre o objeto simulador para medições da dose de entrada na pele do paciente e irradiados na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Os filmes serão processados e será realizado um levantamento da distribuição de dose superficial. O filme radiocrômico será posicionado também, em regiões críticas ocupadas pelos IOEs envolvidos. Os valores de dose obtidos serão comparados aos valores estabelecidos em normas regulatórias nacionais e internacionais.

Quarta etapa: Os valores de dose determinados experimentalmente serão comparados com os resultados obtidos através de simulações computacionais com o código MCNPX. Após a validação dessas simulações, seremos capazes de quantificar a dose recebida pelos pacientes e IOEs de outras unidades de radiologia intervencionista, assim como estimar a dose em órgãos críticos, buscando assim, determinar os fatores que mais influenciam o aumento da dose efetiva nesses setores. Com isso, poderemos buscar medidas para mitigar os efeitos biológicos relacionados com a prática intervencionista.

vi) Etapas de execução do projeto com respectivo cronograma de atividades

O período para desenvolvimento das atividades propostas será de 12 meses, iniciando em outubro de 2022. O cronograma segue as atividades propostas nos objetivos específicos, os quais estão numerados, como mostra a seguinte tabela.

Tabela 1: Cronograma da execução do projeto

Cronograma de atividades (10/2022 a 09/2023)												
Atividade	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
II	x	x										
III		x	x									
IV			x	x	x							
V				x	x							
VI						x	x	x	x			
VII							x	x	x	x		
VIII								x	x	x	x	x

Para minimizar os efeitos negativos provenientes do novo coronavírus SARS-CoV-2 (COVID-19) planejamos iniciar as atividades experimentais apenas no ano de 2023. Dessa forma, iremos utilizar os primeiros meses para realizar estudos computacionais. A descrição completa do item que será adquirido está no anexo 7A. Os riscos associados ao projeto são baixos devido à experiência dos pesquisadores envolvidos que dominam as técnicas dosimétricas.

A principal dificuldade está associada a um possível agravamento na COVID-19 que prejudicaria o andamento experimental do projeto. Nesse momento, os laboratórios envolvidos estão funcionando em horário reduzido devido à COVID-19, o que pode dificultar, mas não impede a execução do projeto.

6 Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Os resultados esperados para este trabalho dizem respeito à otimização da Proteção Radiológica em procedimentos intervencionistas, visando a segurança da saúde dos pacientes e corpo clínico. Além disso, será avaliada a viabilidade de uso do filme radiocrômico para determinação de distribuição da dose de entrada na pele dos pacientes e IOEs durante procedimentos intervencionistas. Medições da taxa de kerma no ar e do

produto kerma-área são requisitos de controle de qualidade dos equipamentos fluoroscópicos, de acordo com a RDC 611 da ANVISA [ANVISA, 2022]. Porém, essas medições somente fornecem a dose total na área irradiada, não viabilizando uma verificação da distribuição da dose sobre as regiões mais expostas. Os filmes radiocrômicos apresentam alta resolução espacial e alta sensibilidade, além de apresentar uma metodologia de utilização rápida, prática e eficaz. Assim, a caracterização desse tipo de dosímetro possibilitará a inovação técnico-científica para os procedimentos de dosimetria dos equipamentos de radiologia intervencionista, uma vez que permitirá a análise da distribuição de dose por toda a superfície irradiada, melhorando a proteção radiológica dos pacientes e IOEs.

Através da metodologia experimental proposta e com o auxílio de simulações computacionais com o código Monte Carlo MCNPX, será possível reconhecer os fatores que influenciam no aumento da dose dos pacientes e IOEs. A partir disso, medidas de proteção radiológica podem ser adotadas nos setores de radiologia intervencionista com o intuito de minimizar os efeitos deletérios associados ao uso das radiações ionizantes nessa área.

Desse modo, os resultados obtidos neste projeto irão contribuir em termos tecnológicos, auxiliando na implementação de novos protocolos de proteção radiológica nos serviços de radiologia intervencionista e, em termos acadêmicos, melhorando nossa compreensão sobre o uso de filmes radiocrômicos na dosimetria intervencionista.

7 Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

Neste trabalho foi proposta a caracterização dosimétrica do filme radiocrômico GAFCHROMIC XR-RV3 em procedimentos de radiologia intervencionista. Esses filmes apresentam alta resolução espacial e alta sensibilidade, além de apresentar uma metodologia de utilização rápida, prática e eficaz. Assim, a caracterização desse tipo de dosímetro possibilitará a inovação técnico-científica para os procedimentos de dosimetria dos equipamentos de radiologia intervencionista, uma vez que permitirá a análise da distribuição de dose por toda a superfície irradiada, melhorando a proteção radiológica dos pacientes. Essa metodologia poderá, posteriormente, ser aplicada como uma metodologia de inovação para o controle de qualidade desses tratamentos na clínica.

Referências

1. ALAND T, KARIN T, KENNY J EVALUTION EBT2 film dosimetry system for radiotherapy quality assurance. **Australas. Pys. Eng. Sci. Med.** v.34 (2), p. 251-260, 2011.

2. American Association of Physicists in Medicine **Radiochromic Film Dosimetry**, AAPM Report TG 135, 2011.
3. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº 611**, de 20 de dezembro de 2022. Disponível em:< <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-330-de-20-de-dezembro-de-2019-235414748?inheritRedirect=true>>.
4. BASHEERUDEEN, SAFA ABDUL SYED et al. Entrance surface dose and induced DNA damage in blood lymphocytes of patients exposed to low-dose and low-dose-rate X-irradiation during diagnostic and therapeutic interventional radiology procedures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 818, p. 1-6, 2017.
5. BUSHBERG J T, SEIBERT J A, LEIDHOLDT JR E M, BOONE J M 2012 **The essential physics of medical imaging**. 3rd edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
6. CASSOLA, V F, DE MELO LIMA V J, KRAMER R, KHOURY H J 2010 FASH and MASH: Female and Male Adult human phantoms based on polygon meSH surfaces. Part I: development of the anatomy. **Phys. Med. Biol.** 55 133–162.
7. CIRAJ-BJELAC, O., REHANI, M.M., K.H. SIM, H.B. LIEW, E. VANO, N.J. KLEIMAN, Risk for radiation-induced cataract for staff in interventional cardiology: Is there reason for concern? Catheter. **Cardiovasc. Interv.** 76 (2010) 826–834.
8. CNEN. Comissão Nacional de Energia Nuclear. **Norma NN-3.01 Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica**, 2005.
9. DUFEK V, HORAKOVA I AND NOVAK L 2011 Organ and effective doses from verification techniques in image-guided radiotherapy. **Radiat. Prot. Dosim.** 147 277–80.
10. EDUARDO VILLARREAL-BARAJAS, J. AND KHAN, R.F. (2014), Energy response of EBT3 radiochromic films: implications for dosimetry in kilovoltage range. **Journal of Applied Clinical Medical Physics**, 15: 331-338.
11. GIADDUI T, CUI Y, GALVIN J, YU Y AND XIAO Y 2013 Comparative dose evaluations between XVI and OBI cone beam CT systems using Gafchromic XRQA2 film and nanoDot optical stimulated luminescence dosimeters. **Med. Phys.** 40.
12. ICRP 110 2009. **Adult Reference Computational Phantoms**. ICRP Publication 110. Ann. ICRP 39 (2).
13. ICRP 89 2002. **Basic Anatomical and Physiological Data for Use in Radiological Protection Reference Values**. ICRP Publication 89. Ann. ICRP 32 (3–4).
14. JON B. HANSEN, WESLEY S. CULBERSON, LARRY A. DEWERD, Surface dose rate from a flat 106Ru/106Rh episcleral plaque measured with a planar windowless extrapolation chamber and un-laminated EBT3 film, **Radiation Measurements**, Volume 121, 2019, Pages 18-25,

15. LEE, WON JIN et al. Lifetime cancer risks from occupational radiation exposure among workers at interventional radiology departments. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 94, n. 1, p. 139-145, 2021].
16. M.S. LINET, T.L. SLOVIS, D.L. MILLER, R. KLEINERMAN, C. LEE, P. RAJARAMAN, A. Berrington de Gonzalez, Cancer risks associated with external radiation from diagnostic imaging procedures, **CA Cancer J. Clin.** 62 (2012) 75–100.
17. MARCHANT T E, JOSHI K D 2017 Comprehensive Monte Carlo study of patient doses from cone-beam CT imaging in radiotherapy. **J. Radiol. Prot.** v.37, p.13-30.
18. McPARLAND, B.J. A study of patient radiation dose in interventional radiological procedures. **The British Journal of Radiology**, v. 71: 175-185, 1998.
19. NCRP 160 2009. **Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States**. Report 160, Bethesda, MD.
20. NCRP 93 1987. **Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States**. Report 93, Bethesda, MD.
21. PELOWITZ, D. B., **MCNPX User 's Manual: Version 2.7.0**. (LA-CP-11-00438). Los Alamos National Laboratory, abr. 2011.
22. ROOZEN et al Evaluation of EBT radiochromic film using a multiple exposure technique. **Australas. Pys. Eng. Sci. Med.** v.43, p. 281-289, 2011.
23. TSAPAKI, V. Patient and staff dosimetry problems in interventional radiology. **Radiation protection dosimetry**, v. 94, n. 1-2, p. 113-116, 2001.
24. VISWESWARAN, SHANGAMITHRA *et al.* DNA damage and gene expression changes in patients exposed to low-dose X-radiation during neuro-interventional radiology procedures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 844, p. 54-61, 2019
25. WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Bonn Call for Action: 10 Actions to Improve Radiation Protection in Medicine in the Next Decade**. Bonn, 2012. Disponível em: https://www.who.int/ionizing_radiation/medical_radiation_exposure/call-for-action/en/. Acesso em: 18 nov. 2019.

Edital PROPPG nº 10/2022**Programa de fomento a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA****a.1.1) identificação do projeto, incluindo título, palavras-chave e resumo**

Título: “Avaliação clínica e análise citogenética molecular através das técnicas de FISH e MLPA de indivíduos suspeitos de síndrome de DiGeorge: em busca da relação *gene versus* fenótipo”.

Palavras-chave: Síndrome de DiGeorge; FISH; MLPA; Microdeleção.

Resumo: A síndrome de DiGeorge ou deleção 22q11.2 (22q11.2DS; OMIM #188400) é a síndrome de microdeleção cromossômica mais frequente, que ocorre em aproximadamente 1 em cada 1.000-7.000 recém-nascidos. A 22q11.2DS é considerada uma das anomalias cromossômicas mais frequentemente observadas em associação com as cardiopatias congênitas (CHD), ficando atrás somente da síndrome de Down. A CHD 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. Um grande número de indivíduos que apresentam a CHD possui a deleção 22q11.2: em 52% dos indivíduos com arco aórtico tipo B interrompido, em 34% com truncus arteriosus, em 16% com Tetralogia de Fallot e em aproximadamente 5-10% com defeitos do septo ventricular. A relação entre os genes presentes na região 22q11.2 deletados em heterozigose e os fenótipos ainda é pouco compreendida. Sabe-se que 4 LCRs (A, B, C e D) definem essa região e dependendo do tamanho da deleção e LCRs envolvidas, o fenótipo pode ser discreto ou mais abrangente. O presente projeto visa verificar a existência e o real tamanho da deleção e quais os genes envolvidos em pacientes suspeitos de 22q11.2SD e/ou portadores de cardiopatia congênita, correlacionando os dados obtidos com aspectos clínicos e dismorfológicos.

a.1.2) dados do proponente e equipe (incluindo colaborações ou parcerias já estabelecidas para a execução do projeto)

Paulo Ricardo Gazzola Zen (proponente): Médico geneticista, professor associado do departamento de Clínica Médica da UFCSPA. Orientador nos PPGs Patologia e Pediatria da UFCSPA. Bolsista de Produtividade em Pesquisa 2 do CNPq.

Rafael Fabiano Machado da Rosa: Médico geneticista, professor adjunto do departamento de Clínica Médica da UFCSPA. Orientador no PPG Patologia da UFCSPA.

Luiza Emy Dorfman: Bióloga, professora da UNISINOS.

Patrícia Trevisan: Farmacêutica. *Senior Cytogenetic Technologist at Colorado Genetics Laboratory, Department of Pathology, Aurora, Colorado, USA.*

Maiara Anschau Floriani: Bióloga. Aluna de doutorado do PPG Patologia da UFCSPA.

Bruna Lixinski Diniz: Biomédica. Aluna de mestrado do PPG Patologia da UFCSPA.

Desirée Deconte: Aluna de doutorado do PPG Patologia da UFCSPA.

Victória Feitosa Muniz: Médica residente em Genética Médica e aluna de mestrado do PPG Patologia da UFCSPA.

Lívia Polisseni Cotta Nascimento: Médica residente em Genética Médica e aluna de mestrado do PPG Patologia da UFCSPA.

Marcela Rodrigues Nunes: Médica residente em Genética Médica da UFCSPA.

Cláudia Fernandes Lorea: Médica geneticista. Unidade de Cuidados a Saúde da Criança e Adolescente, Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPEL).

Juliana Alves Josahkian: Médica geneticista. Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário de Santa Maria (HU-SM).

a.1.3) caracterização da proposta

As malformações congênitas são anomalias estruturais ou funcionais originadas por eventos fisiológicos ou não que precedem o nascimento. As manifestações clínicas são diversificadas, podendo variar desde dismorfias menores até alterações complexas e raras. A etiologia das malformações pode estar relacionada a alterações mendelianas, cromossômicas, ambientais, entre outros, porém muitas vezes não é possível determinar a sua causa. Sugere-se que 6% das malformações congênitas estejam relacionadas a anomalias cromossômicas, podendo esta proporção aumentar quando são associados os desequilíbrios genômicos abaixo da resolução (<5Mb), ou seja, não diagnosticáveis pela análise cromossômica padrão, o cariótipo. As microdeleções e microduplicações (MMs) podem estar presentes no período pré-natal, as quais apenas são identificadas por métodos mais sofisticados de diagnóstico citogenético, como por exemplo, a hibridização in situ fluorescente (FISH), Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) ou microarray cromossômico (CMA). As microduplicações e microdeleções cromossômicas estão envolvidas em diversas malformações congênitas, sendo a mais comum e uma das principais causas de morbidade infantil, a cardiopatia congênita ou congenital heart disease (CHD).

A CHD é um conjunto de anormalidades estruturais e funcionais do coração e grandes vasos, que podem surgir durante a embriogênese cardíaca. Possui incidência de 19-75 casos a

cada mil nascidos vivos. A etiologia é complexa e multifatorial, com cerca de 80% das CHDs surgindo através da combinação de fatores genéticos e ambientais. A malformação cardíaca oriunda de anomalias genéticas ou cromossômicas, como a síndrome de Down, está presente em 1 a cada 100 crianças.

A base genética, epigenética e ambiental precisa da CHD ainda não está totalmente compreendida. A maioria das CHDs ocorrem como malformações de forma isolada, enquanto 25-30% estão associadas a alterações extracardíacas e alguns defeitos específicos são frequentemente encontrados na associação com síndromes genéticas conhecidas. Cerca de 20% dos casos podem ser atribuídos a anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, desordens genéticas não sindrômicas ou teratógenos. Aneuploidias e microdeleções de regiões cromossômicas estão associadas ao desenvolvimento da CHD, porém os mecanismos pelos quais esse desequilíbrio cromossômico altera a cardiogênese são pouco conhecidos e provavelmente muito mais complexos do que um efeito de dosagem gênica. Já se sabe que mutações em genes associados as CHDs humanas afetam um conjunto heterogêneo de moléculas que coordenam o desenvolvimento cardíaco, além de frequentemente alterarem a dosagem de proteínas.

A CHD tem sua base genética determinada pela associação de genes, únicos (10-15%) ou múltiplos, alterações cromossômicas (8-10%) e causas multifatoriais (85-90%). Os genes responsáveis pelo desenvolvimento cardíaco são os mais afetados por estas mutações, atualmente, mais de 50 genes são potenciais candidatos a serem estudados. As mutações podem ser herdadas ou ocorrer de forma esporádica ou de novo. A CHD ocorre associada a uma síndrome ou de forma isolada. Distúrbios na dosagem gênica, defeitos de gene único, grandes deleções/duplicações ou microdeleções/microduplicações estão relacionados a CHD sindrômica. Dentre as principais causas da CHD, a síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11.2) é a segunda mais comum, ficando atrás da síndrome de Down. A região deletada do cromossomo 22 abrange o fator de transcrição TBX1, afetando seus níveis de expressão. A haploinsuficiência deste gene está relacionado ao desenvolvimento anormal da faringe, corroborando com a clínica apresentada por portadores da síndrome. A CHD é a manifestação mais crítica e principal fator de morbimortalidade na SD22q11 afetando entre 74% e 80% dos pacientes. Dentre diversas CHDs relatadas, os defeitos conotruncais e/ou do arco aórtico são os mais prevalentes.

As síndromes de microdeleções e microduplicações (SMMs) originam-se de variações submicroscópicas no número de cópias de uma região do genoma, que por sua vez levam a 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. 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. 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).

A síndrome de deleção 22q11.2 (SD22q11 ou DiGeorge) (OMIM #188400) é uma das doenças mais comuns relacionadas a variantes do número de cópias (CNVs) e erros de recombinação meiótica não-homóloga. A SD22q11 é caracterizada por uma microdeleção no braço longo (q), região 11.2 do cromossomo 22, com perda de, aproximadamente, 90 genes. Na literatura são relatadas incidências nos nascimentos entre 1 em 2000-7000 nascidos vivos, atualmente, é considerada uma das anormalidades cromossômicas mais frequentemente observadas em associação com a CHD, ficando atrás apenas da síndrome de Down.

A SD22q11 é agora conhecida por ter uma apresentação heterogênea que inclui múltiplas anomalias congênitas e condições identificadas no decorrer da investigação clínica, tais como anomalias palatais, gastrointestinais e renais, doença autoimune, atrasos cognitivos variáveis, fenótipos comportamentais e doenças psiquiátricas. Através da identificação da CHD nesses indivíduos, criou-se hipóteses de que um mecanismo que leva a uma alteração no desenvolvimento embrionário poderia estar envolvido. Na população em geral, a deleção 22q11.2 está entre as causas mais comuns detectáveis de várias condições. Um grande número de indivíduos que apresentam a CHD possui a deleção 22q11.2: em 52% dos indivíduos com arco aórtico tipo B interrompido, em 34% com truncus arteriosus, em 16% com Tetralogia de Fallot e em aproximadamente 5-10% com defeitos do septo ventricular.

A relação entre os genes presentes na região 22q11.2 deletados em heterozigose e fenótipos ainda é pouco compreendida. Sabe-se que 4 LCRs (A, B, C e D) definem essa região. Estas LCRs, devido à semelhança substancial de sequência, facilitam a recombinação meiótica homóloga não-alélica, resultando em translocação, deleção ou duplicação desequilibrada. Dependendo do tamanho da deleção e LCRs envolvidas, o fenótipo pode ser sucinto ou até mais abrangente. Mais de 85% da recombinação ocorre entre LCR A e LCR D, resultando em uma deleção "típica" de 3 Mb. A deleção de 1,5 Mb entre LCR A e LCR B pode ser identificada em ~10% dos indivíduos afetados. Indivíduos com deleção LCR22A – LCR22B possuem o espectro completo de fenótipos que também é encontrado em indivíduos com a deleção típica

LCR22A – LCR22D, sugerindo que os fenótipos chave da SD22q11 são, na sua maior parte, devidos à diminuição da dosagem dos genes localizados na região das LCR22A – LCR22B. Defeitos cardiovasculares também parecem ser 3 vezes mais frequentes em deleções de LCR22A – LCR22B ou LCR22A – LCR22D. Já as deleções em regiões distais, LCR22B – LCR22D ou LCR22C – LCR22D, são associadas a alterações no desenvolvimento cardíaco semelhantes àsquelas associadas a deleção típica, embora apresentadas em menor frequência. Existem ~90 genes conhecidos presentes no locus típico de 3-Mb da região 22q11.2, incluindo 46 genes codificadores de proteínas, sete microRNAs (miRNAs), dez RNAs não codificantes e 27 pseudogenes.

A FISH foi a primeira metodologia aplicada na pesquisa citogenética, além de ser atualmente uma das principais técnicas para diagnósticos clínicos e análises de microdeleções e microduplicações. 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 48 horas. As sondas comerciais para SD22q11 têm como alvo o segmento de DNA entre as LCR22A - LCR22B da região 22q11.2, mas não podem precisar o tamanho da deleção. Por outro lado, são extremamente interessantes para utilização como triagem na investigação destes pacientes. Outras técnicas, como a amplificação de sonda multiplex dependente de ligação (MLPA) e o array-CGH são úteis para definir o tamanho da deleção. O array-CHG permite detectar rearranjos cromossômicos muito pequenos e começou então a ser utilizada auxiliando o diagnóstico clínico de pacientes que apresentavam atraso mental idiopático, deficiência intelectual, anormalidades congênicas, esquizofrenia e outros transtornos neuropsiquiátricos.

Em relação à detecção de genes com deleções/duplicações, podemos destacar a técnica de MLPA. Por ser um método sensível e rápido, simples e econômico, é indicado para caracterizar desordens congênicas e hereditárias, analisando quantitativamente mais de 40 dosagens diferentes de sequências em uma única reação de PCR. 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 realizar 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.

a.1.4) objetivos gerais e específicos

Objetivo geral:

- Realizar investigação clínica e citogenética molecular de pacientes cardiopatas ou não cardiopatas, dismórficos ou não dismórficos, com suspeita clínica de síndrome de DiGeorge.

Objetivos específicos:

- Analisar amostras de pacientes suspeitos de síndrome de DiGeorge, cardiopatas ou não cardiopatas, dismórficos ou não dismórficos, utilizando a técnica de FISH como metodologia de triagem molecular;
- Determinar o tamanho da deleção e genes envolvidos através da técnica de MLPA em pacientes com diagnóstico para síndrome de DiGeorge após triagem pela FISH;
- Investigar genes envolvidos na síndrome de DiGeorge, que não estejam localizados na região 22q11.2;
- Associar genes alterados identificados através da técnica de MLPA com os fenótipos clínicos de pacientes com síndrome de DiGeorge;
- Possibilitar o acesso a novas tecnologias aos pacientes suspeitos de síndrome de DiGeorge ou portadores de cardiopatia congênita;
- Descrever relatos de caso e séries de casos envolvendo pacientes suspeitos de síndrome de DiGeorge ou portadores de cardiopatia congênita em periódicos científicos;
- Fornecer laudos aos pacientes sobre os procedimentos diagnósticos realizados.

a.1.5) metodologia proposta

A amostra é composta por pacientes atendidos pelos médicos do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA/ISCOMPA no Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPEL) e Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HU-SM) em âmbito SUS, que apresentem ou não cardiopatia congênita, dismórficos ou não dismórficos com suspeita clínica de síndrome de DiGeorge. Parte das amostras já estão armazenadas no Laboratório de Citogenética da UFCSPA e novas amostras seguem sendo coletadas, sempre no âmbito dos projetos “Avaliação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) (Parecer Nº 2.315.917) e da UFCSPA (Parecer Nº 3.577.284) e “Investigação etiológica de pacientes suspeitos ou portadores de doenças genéticas, ou síndromes malformativas) aprovado pelo CEP da UFCSPA (parecer Nº 2.729.168). Durante o atendimento médico em genética são realizados entrevista, exame físico dismorfológico e

registro fotográfico. 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, também serão anotados.

Realizamos a coleta de uma amostra de sangue para cultivo de células e extração de DNA. O sangue será colocado em frascos com heparina e EDTA e será processado e armazenado no Laboratório de Citogenética da UFCSPA. O laboratório já possui um biorepositório com amostras de DNA para a realização da técnica de MLPA que também serão utilizadas neste trabalho.

A amostra será dividida em quatro grupos de acordo com o diagnóstico clínico de cada indivíduo: Grupo 1 (G1): Pacientes com suspeita clínica de SD22q11, dismórficos e cardiopatas; Grupo 2 (G2): Pacientes com suspeita clínica de SD22q11, dismórficos e não cardiopatas; Grupo 3 (G3): Pacientes com suspeita clínica de SD22q11, não dismórficos e cardiopatas; Grupo 4 (G4): Pacientes com suspeita clínica de SD22q11, não dismórficos e não cardiopatas.

Após a classificação, as amostras serão encaminhadas para a triagem molecular através da técnica de FISH e posterior análise pela técnica de MLPA (determinar o tamanho da deleção da região 22q11.2 entre as LCRs; determinar outras regiões que a FISH não pôde analisar, que podem estar associadas a 22q11.2DS e analisar genes envolvidos na cardiopatia.

Importante salientar que a sonda da FISH referente à região específica da deleção 22q11.2 (LSI TUPLE1-HIRA Spectrum Orange/LSI ARSA Spectrum Green) é o passo inicial para a seleção dos pacientes. O kit P311 para MLPA, utilizado para analisar genes envolvidos na cardiopatia, está disponível no Laboratório de Citogenética.

O estudo será observacional e transversal e o tamanho amostral do presente projeto dependerá do número de pacientes com a condição em estudo. Estima-se um total de 60 casos analisáveis, conforme número de pacientes avaliados e de reações disponíveis pelas técnicas de FISH e MLPA.

Critério de inclusão: Pacientes portadores de CC e com suspeita clínica de síndrome de deleção 22q11, hospitalizados ou de ambulatório do HCSA, HE-UFPEL e HU-SM que aceitem participar do estudo, assinando o TCLE. Pacientes cujos exames cardiológicos estejam disponíveis. Pacientes que já possuírem as amostras em biorepositório no Laboratório de Citogenética da UFCSPA e que estiveram de acordo com os termos de inclusão supracitados serão adicionados ao estudo.

Critério de exclusão: Pacientes portadores de CC e que não possuam suspeita clínica de síndrome de deleção 22q11. Pacientes que não aceitem participar do estudo assinando o

TCLE. Pacientes cujos exames cardiológicos não estejam disponíveis. Pacientes em que não for possível realizar a coleta de sangue periférico. Pacientes com quantidade insuficientes de sangue periférico para análise. Pacientes que estiverem no biorepositório e possuírem material insuficiente para análise.

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), quando for o caso.

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.

Cultura de células de sangue periférico: A cultura de células é baseada no protocolo de Moorhead et al. (1960).

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH): A técnica envolve 4 etapas críticas que são a desnaturação, hibridização, lavagens rigorosas e detecção. O Laboratório de Citogenética dispõe de microscópio de fluorescência para as análises.

Análise de microdeleções/microduplicações pela técnica de MLPA: A técnica é baseada na PCR que realiza uma análise genética semiquantitativa. 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. 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 9).

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.

Serão também utilizados os programas SPSS para Windows (versão 12.0), Microsoft® Excel 2002 e PEPI (versão 4.0), para comparação dos dados verificados pela técnica de FISH com os identificados pela avaliação clínica e citogenética através do cariótipo de alta resolução. Posteriormente, 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 do MLPA. 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. Os testes estatísticos utilizados incluirão o teste exato de Fisher bicaudado para comparação de frequências e o teste t para a comparação de médias. Serão considerados significantes valores de $p < 0,05$.

Orçamento

ITEM	QUANTIDADE	VALOR (R\$)	TOTAL (R\$)
Sonde de DNA Di George região LSI TUPLE 1 LARANJA/LSI ARSA VERDE	01	7.499,39	7.499,39
DAPI II contratorante (125NG/ML)	01	1.737,86	1.737,86
Reagentes e consumíveis	01	2.142,00	2.142,00
Total			11.379,25

O financiamento para coleta, processamento, armazenamento das amostras e análise por MLPA será realizado com os recursos já existentes no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, oriundos de edital PROEXT 2016 e FAPERGS 2017. Neste momento precisamos repor as sondas de FISH e reagentes e materiais complementares.

a.1.6) etapas de execução do projeto com respectivo cronograma de atividades – para um projeto de 12 meses, a contar do recebimento dos itens de consumo.

Etapa	Especificação	Unidade de tempo	Duração	Início (mês)	Final (mês)
Amostras	Avaliação dos pacientes	Meses	12	Em andamento	12
	Coleta de amostras na ISCMPA	Meses	12	Em andamento	12
	Recebimento de amostras externas (UFPEL, UFSM)	Meses	12	Em andamento	12
	Cultivo e extração de DNA	Meses	12	Em andamento	12

	Localização de amostras de DNA no biorepositório	Meses	2	1	12
Aquisição das sondas de FISH	Realização dos testes de FISH para verificar a deleção 22q11.2	Meses	12	1	12
MLPA	Realização dos testes de MLPA	Meses	4	4/10	6/12
Literatura	Revisão da literatura	Meses	12	1	12
Produção científica	Desenvolvimento de resumos e artigos relacionados ao assunto	Meses	12	1	12
Formação acadêmica	Desenvolvimento de TCC, dissertação e tese	Meses	-	1	12

a.1.7) produtos esperados como resultado da execução do projeto

Realização de testes de FISH e MLPA para pacientes do SUS; relatórios para os pacientes e médicos; resumos a serem apresentados em eventos científicos; artigos para publicação; elaboração do capítulo sobre a técnica de MLPA e FISH para o Manual do Laboratório de Citogenética; TCC, dissertação de mestrado, tese de doutorado.

a.1.8) potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

- Verificação da frequência da síndrome de DiGeorge e de anomalias genéticas associadas em nosso meio auxiliando na elaboração de estratégias, como programação de consultas com especialistas clínicos e cirúrgicos, planejamento de infraestrutura para realização de exames diagnósticos de imagem e disponibilização de leitos hospitalares (cirúrgicos e de UTI).
- Análise de custo efetividade sobre a realização de FISH e MLPA para o diagnóstico de anomalias genéticas associadas a síndrome de DiGeorge.
- Correlacionar aspectos genotípicos e fenotípicos visando aprimorar a seleção de pacientes visando a indicação de investigação de anomalias genéticas associadas a síndrome de DiGeorge.
- Correlacionar aspectos genotípicos e fenotípicos visando aprimorar a identificação de anomalias secundárias associadas a síndrome de DiGeorge.
- O banco de dados que está sendo construído permitirá a ampliação do conhecimento acerca das anomalias genéticas associadas a síndrome de DiGeorge mais prevalentes em nosso meio.
- Para a população, a difusão da pesquisa científica se dará pelo fornecimento de laudos dos exames realizados e pela difusão de informações através do perfil do Instagram e do Facebook. Este perfil pertence ao Grupo de Pesquisa em Genética Humana da UFCSPA e ao Programa de Extensão “Assistência, ensino e pesquisa em Genética Clínica”, dos quais o proponente é o coordenador, que envolve as atividades do Laboratório de Citogenética e do Serviço de Genética Clínica UFCSPA/HCSA.

7. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Congenital anomalies. WHO: 2019. [acesso em 01 de Fev de 2020]. Disponível em: https://www.who.int/topics/congenital_anomalies/en/ .
2. São Paulo (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. Declaração de Nascido Vivo - Manual de Anomalias Congênicas (2012) 2nd edition. Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, 97 pp.
3. Barber JCK. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man J. Med. Genet. 2002;39:375.
4. Wellesley, D, Dolk, H, Boyd, PA, Greenlees, R, Haeusler, M, Nelen, V, ... & Mullaney, C. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. Eur j hum genet . 2012; 20(5):521.
5. Fahed, AC, Gelb, BD, Seidman, JG, & Seidman, CE. Genetics of congenital heart disease: The glass half empty. Circ. Res. 2013; 112(4):707–720.
6. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. Nature. 2008;451(7181):943–8.
7. Sun, R; Liu, M; Lu, L; Zheng, Y; Zhang, P Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments. Cell Biochem Biophys. 2015;72(3):857-860.
8. Born, D. Cardiopatia congênita. Arq. Bras. Cardiol. 2009;93(6):130-132.
9. Digilio MC, Marino B. What is new in genetics of congenital heartdefects? Front Pediatr. 2016;4:120.
10. Blue, GM, Kirk, EP, Sholler, GF, Harvey, RP, Winlaw, DS. Congenital heart disease: Current knowledge about causes and inheritance. Med J Aust .2012;197(3):155–159.
11. Brennan, P; Young, ID. Congenital heart malformations: aetiology and associations. Semin Fetal Neonat M. 2001:17-25.
12. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. J Amer Col Card. 2002;39(12):1890–00.
13. 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.
14. Jacquemont, S. et al., 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11. 2 locus. Nature, 478(7367),pp.97.
15. Harewood, L. et al., 2010. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. Genome research, 20(5), pp.554-564.
16. Harewood, L., & Fraser, P., 2014. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. Human molecular genetics, 23(R1), pp.R76-R82.
17. Shprintzen, RJ. Velo-Cardio-Facial Syndrome: 30 Years of Study. National Institutes of Health, 2008;14:3-10.
18. McDonald-McGinn DM; Kirschner R; Goldmuntz E; Sullivan K; Eicher P; Gerdes M, et al. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. Genet Couns. 1999;10:11-24.
19. Mastroiacovo P, Rossi P, Cancrini C, Azzari C, DiGilio MC, et al. Chromosome 22q.11 deletion - Recommendations for Diagnosis and Treatment. Italian Primary Immunode ciencias Strategic Scienti c Committee, 2005.
20. Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. Pediatrics 2003;112:101-7.
21. McDonald-McGinn, DM, Tonnesen, MK, Laufer-Cahana, A, Finucane, B, Driscoll, DA, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! Genet. Med., 2001;3:23–29.
22. Repetto, GM, Guzmán, ML, Delgado, I, Loyola, H, Palomares, M, et al. Case fatality rate and associated factors in patients with 22q11 microdeletion syndrome: a retrospective cohort study. BMJ Open, 2014; 4:e005041.
23. Lischner, HW; Dacou, C; Digeorge, AM. Normal lymphocyte transfer (NLT) test: negative response in a patient with congenital absence of the thymus. Transplantation, 1967,5(3):555-557.
24. De La Chapelle, A, Herva, R, Koivisto, M, Aula, P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. Hum. Genet., 1981;57:253–256.
25. Scambler, PJ, Carey, AH, Wyse, RK, Roach, S, Dumanski, JP, et al. Microdeletions within 22q11 associated with sporadic and familial DiGeorge syndrome. Genomics, 1991;10:201–206.

26. McDonald-McGinn, DM, Sullivan, KE, Marino, B, Philip, N, Swillen, A, et al. 22q11. 2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 2015;1:15071.
27. Takao, A, Ando, M, Cho, K, Kinouchi, A, Murakami, Y. Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease. *Futura Pub. Co.*, 1980;253-269.
28. Peyvandi, S, Lupo, PJ, Garbarini, J, Woyciechowski, S, Edman, S, et al. 22q11.2 deletions in patients with conotruncal defects: data from 1,610 consecutive cases. *Pediatr. Cardiol.*, 2013;34:1687–1694.
29. Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FT, Christofolini DM, Kulikowski LD, et al. Atypical 22q11.2 deletion in a patient with DGS/VCFS spectrum. *Eur J Med Genet*. 2008;51(3):226–30.
30. Burnside RD. 22q11.21 deletion syndromes: a review of proximal, central, and distal deletions and their associated features. *Cytogenet Genome Res*. 2015;146(2):89–99.
31. Motahari, Z, Moody, SA, Maynard, TM, LaMantia, AS. In the line-up: deleted genes associated with DiGeorge/22q11. 2 deletion syndrome: are they all suspects?. *J. Neurodev. Disord.*, 2019; 11(1):7.
32. Arnold, J. Beobachtungen über Kerntheilungen in den Zellen der Geschwülste. *Virchows Archiv*, 1879;78(2):279-301.
33. Riegel, M. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. *Genetics and molecular biology*, 2014;37(1):194-209.
34. Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, 1971;298(7731):971-972.
35. Bui, TH. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon!. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2007;30(3):247-251.
36. Gall, JG, Pardue, ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci.*, 1969;63(2):378-383.
37. El-Ella, SS, El Gendy, F, Tawfik, MA, El Sobky, E, Khattab, A, et al. Chromosome 22 microdeletion in children with syndromic congenital heart disease by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Egypt. J. Med. Hum. Genet.*, 2012;13(3):313-322.
38. Shaffer, LG, Bejjani, BA, Torchia, B, Kirkpatrick, S, Coppinger, J, et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2007;145(4):335-345.
39. Cai, WW, Mao, JH, Chow, CW, Damani, S, Balmain, A, et al. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nat Biotechnol*, 2002;20(4):393-396.
40. Albertson, DG, Pinkel, D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Gen*, 2003;12:R145-R152.
41. Lee, C, Iafrate, AJ, Brothman, AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat. Genet.*, 2007;39:S48-S54.
42. Sørensen, KM, Andersen, PS, Larsen, LA, Schwartz, M, Schouten, JP. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal. Chem.*, 2008;80(23):9363-9368.
43. Schouten, JP, McElgunn, CJ, Waaijer, R. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.*, 2002;30(12):57.
44. Kozłowski, P, Jasinska, AJ, Kwiatkowski, DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 2008;29(23):4627-4636.
45. Stuppia, L, Antonucci, I, Palka, G, Gatta, V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int. J. Mol.*, 2012;13(3):3245-3276.
46. Hoovers J.M, 1999. Fluorescence in situ hybridization in the study of chromosomal abnormalities [Article in Dutch]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 143, pp.2265-2268.
47. 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.
48. 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.
49. 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

Identificação

Título: Efeitos da exposição ao material particulado 2,5 na resposta in vitro de monócitos e Linfócitos T ao vírus SARS-CoV-2

Projeto cadastrado COMPesp: 27/2022 (Anexo I)

Palavras-chaves: COVID-19; SARS-CoV-2; poluente atmosférico; inflamação; biomarcadores imunológicos.

Resumo: A infecção por SARS-CoV-2 causou uma pandemia sem precedentes na história, sendo reportados mais de 29 milhões de casos no Brasil, e o Rio Grande do Sul sendo o quarto estado com maior número de casos. A exposição aos poluentes atmosféricos induz a um quadro de estresse oxidativo, inflamação e alterações no sistema imune, influenciando na resposta de defesa do hospedeiro contra infecções virais por diferentes vias, o que resulta no aumento da replicação viral e desfecho das infecções. Apesar da ausência de evidências sobre exposição a poluição do ar e desregulação da resposta imune na infecção por SARS-CoV-2, é possível que esta associação exacerbe os efeitos da infecção. Assim, é de extrema importância a investigação dos efeitos da exposição a poluição atmosférica na infecção por SARS-CoV-2 e a identificação de mecanismos celulares e moleculares que possam estar associados a estas condições. Neste projeto será abordando o impacto de um poluente atmosférico (material particulado 2,5) sobre a resposta celular frente a partículas do vírus SARS-CoV-2 inativado. Desta forma, espera-se estabelecer a relação entre a exposição ao material particulado e infecção por SARS-CoV-2, criando evidência científica para o embasamento de políticas públicas que reduzam a emissão de poluentes visando reduzir a gravidade de doenças decorrentes dessa exposição.

Proponente:

Coordenador: Pedro R T Romão. Prof. Associado III - área Imunologia - 40 h DE – UFCSPA - Orientador Permanente do PPG Ciências da Saúde e PPG Biociências. Coordenador do PPGCS. Tem experiência em Imunologia de doenças infecciosas e Imunoregulação. Bolsista produtividade PQ2 CNPq.

Instituições participantes: UFCSPA e Universidade Federal de Goiás.

Equipe/Colaborações/parcerias já estabelecidas para a execução do projeto

Dra. Alessandra Peres (Imunologia – UFCSPA)

Dra. Cláudia Ramos Rhoden (Poluição Atmosférica – UFCSPA)

Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (Imunologia – UFG)

Dr. Gilson Pires Dorneles – Lab Imunologia da UFCSPA

Pós-Graduandos

Bruna Marmett (Bolsista de Doutorado UFCSPA)

Roseana Boek Carvalho (Bolsista de Doutorado UFCSPA)

Paula Coelho Teixeira (Mestranda do PPGCS da UFCSPA – bolsa edital COVID-19 CAPES)

Caracterização da proposta

A pandemia de COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2 é responsável por efeitos sem precedentes na saúde mundial (1, 2). Mais de 30 milhões de casos já foram reportados no Brasil até março de 2022, sendo o Rio Grande do Sul o quarto estado com maior número de casos no país (3). Com a evolução da pandemia e o aumento do número de indivíduos infectados e de pacientes em recuperação surgiram novos desafios no combate da doença. Sabe-se que a COVID-19 afeta diversos órgãos e são observados relatos crescentes de efeitos persistentes e prolongados após a fase aguda da COVID-19, sendo que a magnitude dos sintomas é dependente da gravidade da fase inicial da infecção.

A infecção por SARS-CoV-2 pode resultar em efeitos residuais como fadiga, dispneia, dor torácica, distúrbios cognitivos, artralgia e declínio na qualidade de vida. Estes sintomas são atribuídos ao dano celular, a resposta imune inata robusta com elevada produção de citocinas pró-inflamatórias e um estado pró-coagulante induzidos pelo SARS-CoV-2 (4-6). Além disso, alterações na resposta adaptativa, sobretudo através do aumento na frequência de linfócitos T e B autoreativos e elevada titulação de autoanticorpos caracterizam a fase crônica da COVID-19 (4, 6, 7).

A progressão e gravidade da COVID-19 esta associada a uma resposta hiperinflamatória e alterações na frequência e fenótipo de diferentes células, incluindo monócitos e linfócitos T. Um evento que contribui para as síndromes respiratórias agudas é a tempestade de citocinas, caracterizada por uma reação inflamatória excessiva em que as citocinas são rapidamente produzidas em grande quantidade em resposta à infecção microbiana. Pacientes com COVID-19 mostraram aumento nas concentrações sistêmicas de várias citocinas e quimiocinas, entre elas a IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- α , *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e *macrophage inflammatory protein-1 alpha* (MIP-1alpha) (4, 7, 8). Estas citocinas podem estar envolvidas na diminuição de células T detectadas em pacientes com COVID-19, considerando a correlação negativa encontrada entre os números de células T totais, células T CD4 + T e células T CD8+ com aos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10, demonstrados no estudo de Diao e colaboradores (2020). As células T desempenham um importante papel na *clearance* viral, com células T citotóxicas (CTLs) CD8+ capazes de secretar moléculas como IFN- γ para eliminar o patógeno, da mesma forma, as células T auxiliares CD4 + (Th) podem auxiliar as células B e T citotóxicas e aumentar sua capacidade de controle da infecção (9). Na infecção com SARS-CoV-2 ocorre a constante estimulação de células T pelo vírus e consequente induzindo um perfil de exaustão, que leva a alterações funcionais relacionadas a disfunções em Linfócitos T e B, mas também em outras células que compromete a resposta antiviral e relaciona-se com a gravidade da COVID-19 (10).

Fatores extrínsecos, como condições ambientais podem modular os efeitos causados pela infecção por SARS-CoV-2 (11-13). Um destes fatores é a poluição atmosférica, a qual representa um significativo fator de risco para o desenvolvimento de doenças, hospitalizações, morbidades e mortalidade (13, 14). Estima-se que 8 milhões de mortes precoces ocorrem ao ano decorrentes da exposição a poluição do ar e

91% da população mundial habita locais onde os níveis de poluição ultrapassam os preconizados pela Organização Mundial da Saúde (15, 16). Em 2013, a poluição do ar *outdoor* foi classificada como agente carcinogênico do Grupo 1 para humanos pela *International Agency of Research on Cancer* (IARC) (17). A poluição atmosférica é constituída de diversos compostos, dentre os quais, pode-se citar o material particulado (MP), dióxido de nitrogênio (NO₂), ozônio (O₃), dióxido de enxofre (SO₂) e monóxido de carbono (CO)(18).

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos causados na saúde pela inalação da poluição atmosférica têm como base a capacidade destes compostos de desencadear estresse oxidativo e inflamação. A inalação dos poluentes presentes no ar é capaz de formar espécies reativas de oxigênio (ERO) diretamente através da superfície das partículas, por compostos solúveis, como metais de transição e compostos orgânicos, disfunção mitocondrial e da alteração da atividade de enzimas, como a NADPH oxidase. Uma vez estabelecido o estresse oxidativo causa oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, alterações na sinalização celular, dano ao DNA e indução de resposta pró-inflamatória. Ademais, ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios através de células epiteliais e macrófagos alveolares, principalmente a ativação de vias sensíveis à estímulo redox (ex: NF-κB), levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais amplificam a resposta imune (19-21).

Os constituintes dos poluentes particulados estimulam as células por meio de uma variedade de mecanismos de detecção celular, incluindo TLRs, vias de detecção de ERO, os quais ativam cascatas de sinalização intracelular pró-inflamatórias, como as vias NF-κB e MAPK (22). Os TLRs são receptores celulares responsáveis pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de microrganismos potencialmente infecciosos e de outros estímulos nocivos semelhantes. As partículas de MP podem conter moléculas microbianas, como lipopolissacarídeo (LPS) e assim estimular células por meio de TLRs. O estresse oxidativo desencadeado pela exposição ao poluente particulado leva a ativação de NF-κB e AP-1, bem como a transcrição de genes contendo o promotor do elemento antioxidante-responsivo (ARE) (23). A estimulação *in vitro* de células epiteliais brônquicas humanas com MP produziu quantidades aumentadas de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 e GM-CSF (24).

A exposição a poluição atmosférica foi identificada como um fator de risco para infecções com SARS-Cov-2. Estudos observacionais retrospectivos demonstraram que a prévia exposição a elevadas concentrações de poluentes ambientais estava relacionada com maior gravidade de COVID-19 (14, 25-27). A inalação de poluentes atmosféricos é capaz de influenciar a resposta de defesa do hospedeiro contra infecções virais por diferentes vias, resultando no aumento da replicação viral e desregulação da resposta imune. Os potenciais mecanismos de interação entre os poluentes atmosféricos e o ciclo viral incluem: aumento da expressão de receptores e a produção/ atividade de proteases necessárias para entrada do vírus; redução da ativação de TLRs; redução da ativação da via intracelular NF-κB e JAK/STAT; alteração da expressão gênica; diminuição da produção de moléculas de sinalização imunológica antiviral, incluindo citocinas e quimiocinas; redução das funções de células imunológicas, como fagocitose, formação de

neutrophil extracellular trap (NET) e atividade de células NK citotóxicas. Portanto, a identificação de mecanismos que possam prevenir e mitigar as ações resultantes da exposição aos poluentes atmosféricos, especialmente no cenário de contaminação com SARS-CoV-2, torna-se crucial para o controle da gravidade destes casos (28).

Um número crescente de evidências aponta uma interação entre a exposição a diversos tipos de poluentes e alteração da resposta celular frente ao SARS-CoV-2. O aumento da taxa de infecção após exposição e redução de proliferação celular foram observadas em células-tronco basais das vias respiratórias humanas após a incubação de poluentes derivados de cigarro e SARS-CoV-2 (29). A exposição de células epiteliais do trato respiratório superior ao MP₁₀ resultou no aumento da expressão da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) de forma concentração dependente, logo aumentando a suscetibilidade do hospedeiro ao SARS-CoV-2 (30). Adicionalmente, em camundongos submetidos a exposição sub-crônica ao ozônio, foi observada a elevação da serino protease transmembranar II (TMPRSS2) e de seus transcritos nas vias aéreas extrapulmonares, parênquima e macrófagos alveolares, sugerindo que a exposição ao ozônio predispõe os indivíduos a infecções mais graves de SARS-CoV-2 (31). A exposição a poluição do ar foi associada ao aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2), a qual pode reduzir a defesa antiviral ao SARS-CoV-2 (32). Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma associação positiva entre a carga viral do SARS-CoV-2 e a concentração de PGE2 em pacientes com COVID-19 internados em UTI (33).

Sendo assim, é possível que a presença concomitante de poluentes atmosféricos e SARS-CoV-2 no ambiente possam exacerbar os efeitos da infecção, devido a alteração da resposta imune e inflamatória, resultando em inflamação pulmonar e sistêmica. A inflamação e disfunções imunológicas são um elo comum para os efeitos causados tanto pela poluição atmosférica quanto pela infecção por SARS-CoV-2, portanto a exposição à ambos fatores poderiam causar a exacerbação dos destes efeitos.

Objetivos

Objetivo geral: Este projeto terá como objetivo avaliar o efeito da exposição *in vitro* ao material particulado 2,5 e ao vírus SARS-CoV-2 em monócitos e linfócitos T.

Objetivos específicos:

- Determinar a viabilidade de monócitos e linfócitos T após exposição a diferentes concentrações de MP_{2,5}.
- Avaliar o impacto da estimulação *in vitro* de monócitos e linfócitos T com o poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado sobre os marcadores de ativação (CD28 e CD69) e inibição celular (PD-1 e CD95), e sobre a atividade citotóxica de linfócitos T CD8 através da expressão de perforina e granzima B.

- Avaliar o impacto da estimulação *in vitro* de monócitos e linfócitos T com o poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado sobre a ativação de fatores de transcrição intracelular (NF-κB e Akt).
- Avaliar o impacto da estimulação *in vitro* de monócitos e linfócitos T com o poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado sobre a expressão de citocinas (IL-17a, IFN-γ, TNF-α), geração de espécies reativas de oxigênio citosólica e mitocondrial e estado de funcionalidade da dinâmica mitocondrial.
- Avaliar o impacto da estimulação *in vitro* de monócitos e linfócitos T com o poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado sobre a proliferação celular, viabilidade e apoptose celular e estado de metilação global do DNA.
- Avaliar o impacto da estimulação *in vitro* de monócitos e linfócitos T com o poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado sobre a produção de citocinas (IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-17, IL-1, MCP-1, MIP1-β) no sobrenadante de cultura celular.

Metodologia

Desenho experimental: Será realizado experimento *in vitro* com o objetivo de avaliar o efeito da estimulação de monócitos e linfócitos T com o poluente atmosférico MP_{2,5} e SARS-CoV-2 inativado sobre os marcadores de ativação e inibição celular de linfócitos T, expressão de citocinas, geração de espécies reativas de oxigênio, potencial de membrana mitocondrial, proliferação celular e metilação de DNA. Com a realização deste protocolo experimental será possível aumentar o entendimento dos efeitos da exposição ao MP_{2,5} na imunopatogênese pelo SARS-CoV-2.

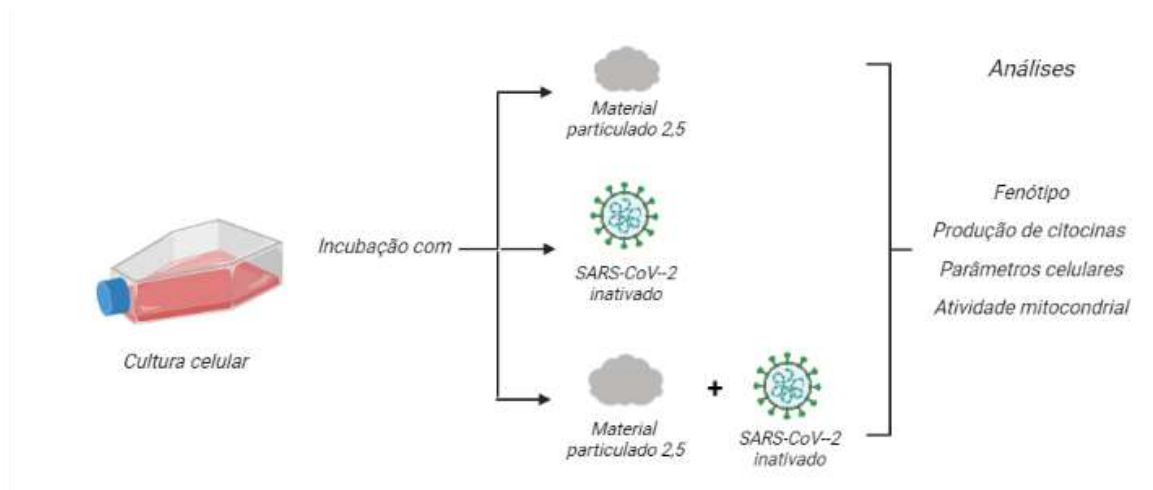


Figura 1. Desenho experimental. Os monócitos e linfócitos T serão incubados em três condições experimentais: a) Material particulado 2,5; b) SARS-CoV-2 inativado; c) Material particulado em conjunto com SARS-CoV-2 inativado.

Procedimentos experimentais: Monócitos da linhagem THP-1 (ATCC TIB-202) e células T da linhagem JURKAT (ATCC TIB-152) serão mantidos em cultura em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) contendo 2g/L de bicarbonato e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e antibióticos a 37°C e 5% CO₂. As células semi-confluentes serão plaqueadas em placas de 24 poços (1 x 10⁶ células) ou de 96 poços (1 x 10⁵

células) em incubadora de células (37°C, 5% CO₂) durante 3 (monócitos) e 24 horas (Linfócitos T), após serão expostas nas seguintes condições experimentais:

a) Material particulado 2,5: cultura de monócitos THP-1 e células T JURKAT (isoladamente) serão estimuladas durante 24 h com diferentes concentrações de MP_{2,5} (5, 10, 15 e 20 µg/mL);

b) SARS-CoV-2 inativado: cultura de monócitos THP-1 e células T JURKAT (isoladamente) serão estimuladas durante 18 h com vírus SARS-CoV-2 inativado;

c) Material particulado 2,5 + SARS-CoV-2 inativado: cultura de monócitos THP-1 e células T JURKAT (isoladamente) serão estimulados durante 24 h com diferentes concentrações de MP_{2,5} (5, 10, 15 e 20 µg/mL) e, em seguida incubados por 18 h com SARS-CoV-2 inativado.

Todos os experimentos serão realizados em triplicata.

Obtenção de material particulado 2,5 (MP_{2,5}): As partículas de MP_{2,5} foram coletadas com a utilização de um precipitador eletrostático localizado em São Paulo, Brasil. A composição de metais presente no material particulado 2.5 está disponível em Marmett e colaboradores (2018) (34). Este material já está armazenado no Laboratório de Poluição Atmosférica da UFCSPA.

Padronização da concentração de MP_{2,5} e avaliação de citotoxicidade: Monócitos e linfócitos T de linhagem serão ressuspensos na concentração de 4x10⁵ células/mL e incubadas com diferentes concentrações de MP_{2,5} (5, 10, 15 e 20 µg/mL) ou triton-100 (1%) em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (todos da Sigma-Aldrich) em placas de 96 poços durante 24 horas (37°C, 5%CO₂). Ao final, a citotoxicidade será determinada através do ensaio de viabilidade com MTT em leitor de microplaca utilizando comprimento de onda de 570 nm com correção de 630 nm (35).

Exposição ao MP_{2,5} e ao SARS-CoV-2 inativado: Após verificação de viabilidade celular, as linhagens de monócitos e linfócitos T (1 x 10⁶) serão plaqueados em placas de 96 poços (volume final de 200 µL) em meio RPMI-1640suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos (100 UI de penicilina/mL, 100 µg de estreptomicina/mL e 2 mM de L-glutamina) e, subsequentemente, incubadas com MP_{2,5} em dose previamente padronizada conforme descrita acima. As células serão expostas ao MP_{2,5} ou controle salina por 24 horas antes do estímulo imunogênico. Após este período, monócitos e linfócitos T tratadas com MP_{2,5} serão lavadas com solução fosfato-salina e ressuspensas em meio RPMI-1640 completo. Então, as células serão estimuladas com vírus SARS-CoV-2 inativado em diferentes proporções. O SARS-CoV-2 que será utilizado foi obtido no Instituto Butantã pela Dra. Simone Fonseca (colaboradora deste projeto). Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA/50 ng/mL, Sigma) mais ionomicina (1 µg/mL, Cayman) e DMSO serão usados como controles positivos e negativos de estimulação, respectivamente. As células serão incubadas por 18 h a 37 °C e 5% de CO e em seguida tratadas com Golgi Plug (BD Biosciences, EUA) 1 µg/mL nas últimas de 3 h.

Imunofenotipagem, expressão de citocinas intracelulares, proliferação celular e apoptose: Após estimulação *in vitro*, monócitos e linfócitos T de linhagem serão incubados com anticorpos monoclonais específicos conforme descrito nos objetivos em um procedimento de marcação conjugada com fluorocromos

específicos. Adicionalmente, as expressões de Akt, NF- κ B, granzima B e perforina, e das citocinas IL-17a, TNF- α , IFN- γ , em células T CD3+, CD4+, CD8+ e monócitos CD14+ serão avaliadas por citometria de fluxo. A tabela 1 apresenta a estratégia de combinação de anticorpos e respectivos fluorocromos para análise de citometria. Para a avaliação da expressão de citocinas intracelulares, as células serão incubadas com inibidor de transporte de proteínas (GolgiPlug, BD Bioscience), fixadas e permeabilizadas com kit específico conforme recomendações do fabricante (Ebioscience, Invitrogen, EUA), centrifugadas (8 min, 300 g) e ressuspensas em solução tampão específico. A proliferação celular será avaliada através do decaimento da fluorescência do Carboxyfluoresceína Diacetato Succinimidyl Ester (CFSE) conforme descrito anteriormente em Dorneles e colaboradores (2021). A viabilidade celular será avaliada utilizando o 7-ADD e a apoptose por meio de anexina-V-PI. Os dados de imunofenotipagem serão adquiridos utilizando BD FACSDiva em FACSCanto II (36).

<i>Tabela 1. Estratégia de combinação de anticorpos e respectivos fluorocromos para análise de citometria</i>	
<i>Painel célula T</i>	
CD3	BV510
CD4	APC
CD8	PE
CD28	PerCP-Cy5.5
PD-1	BB515
CD95	Pacific Blue
<i>Painel CD8</i>	
CD3	BV510
CD8	PE
CD28	FITC
Perforina	PerCP-Cy5.5
Granzima B	Alexa Fluor 647
<i>Painel célula T intracelular</i>	
CD3	BV510
CD4	APC
CD8	PE
IFN- γ	PE-Cy7
TNF- α	FITC
IL-17	PerCP-Cy5.5
<i>Painel célula T intracelular – Fator de transcrição</i>	
CD3	BV510
CD4	APC
CD8	PE
AKT1	PE-CF594
<i>Painel monócito</i>	
CD14	PE
CD16	FITC
CD69	PerCP-Cy5.5
<i>Painel monócito intracelular</i>	
CD14	PE
CD16	FITC
NF- κ B	PE-Cy7

Atividade mitocondrial e estado redox: Para a avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio em monócitos e linfócitos T, será usado o reagente MitoSox™ (MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, número de catálogo M36008, Invitrogen™, EUA) por citometria de fluxo com

excitação/emissão em 510/580. A avaliação do conteúdo mitocondrial e do estado de polarização mitocondrial serão avaliados através dos reagentes MitoTracker Green (MitoTracker TM Green FM - Special Packaging, número de catálogo M7514, InvitrogenTM, EUA) e MitoTracker Red (MitoTracker TM Red CMXRos - Special Packaging, número de catálogo M7512, InvitrogenTM, EUA), respectivamente. As células serão incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD14, anti-CD16 conjugados com fluorocromos específicos. Após o processo de lavagem com solução fosfato-salina, as células serão então incubadas com os reagentes MitoTracker Green e MitoTracker Red conforme recomendações do fabricante. A análise será realizada em citometria de fluxo.

Avaliação da metilação global do DNA: A metilação global do DNA de monócitos e linfócitos T serão analisadas através do kit EZ DNA Methylation-lightning (No. catálogo D5030T, Zymo Research, EUA) seguindo as recomendações do fabricante através da técnica de reação em cadeia da polimerase.

Produção de citocinas: A produção de citocinas IFN- α , IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-17, IL-1, MCP-1e MIP1- β será analisada no sobrenadante de cultura celular utilizando o método de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise estatística: 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% ($p < 0.05$).

Etapas de execução da proposta com respectivo cronograma de atividades

O presente projeto tem duração de 12 meses de execução

Quadro 2. Cronograma de atividades de execução do projeto.	
Atividades	Meses
Revisão bibliográfica	1-12
Obtenção de material particulado 2,5 (MP _{2,5})	1
Padronização da dose de MP _{2,5} e avaliação de citotoxicidade	2-3
Exposição ao MP _{2,5} e ao SARS-CoV-2 inativado	3-8
Imunofenotipagem, expressão de citocinas intracelular, proliferação celular e apoptose	3-10
Atividade mitocondrial e estado redox	3-10
Avaliação da metilação global do DNA	3-10
Análise estatística de dados	3-10
Elaboração de artigo científico	10-12
Retorno dos resultados aos voluntários	12

Orçamento

A infraestrutura, os equipamentos necessários e os materiais básicos para a realização do projeto estão disponíveis no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular e no Laboratório de Poluição Atmosférica e na Unidade Bioanalítica da UFCSPA.

Material	Quantidade	Custo unitário	Custo total
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	1 x 500 mg	R\$ 406,00	R\$ 406,00
Anticorpo anti-CD8 PE	100 testes	R\$ 1.756,99	R\$ 1.756,99
Anticorpo anti-CD3 BV510	100 testes	R\$ 1.655,46	R\$ 1.655,46
Anticorpo anti-perforina PerCP-Cy5.5	50 testes	R\$ 1.437,29	R\$ 1.437,29
Anticorpo anti-granzima B Alexa Fluor 647	1 x 0,1 mg	R\$ 3.456,27	R\$ 3.456,27
Anticorpo anti-AKT PE-CF594	2 x 50 testes	R\$ 789,37	R\$ 1.578,74
Soro fetal bovino	2 x 500 mL	R\$ 633,50	R\$ 1.267,00
Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína	1 x 50 mg	R\$ 399,00	R\$ 399,00
Total			R\$ 11.956,75

*Todos os demais itens de custeio necessários para a execução da proposta (aqui não descritos) já foram ou estão sendo adquiridos com recursos de outros projetos (FAPERGS) e verba PROAP.

Produtos esperados como resultado da execução do projeto

Principais resultados esperados

- Geração de conhecimento: o projeto permitirá conhecer as bases moleculares e celulares envolvidas no impacto da exposição a poluente atmosférico na modificação da resposta imune ao SARS-CoV-2;
- Formação de recursos humanos: Profissionais da saúde, alunos de Pós-Graduação e iniciação científica estarão envolvidos no desenvolvimento, discussão dos resultados desta pesquisa, fortalecendo a relação entre laboratórios e Universidades (UFCSPA e UFG) na busca do avanço científico, bem como na formação de recursos humanos, uma vez que o projeto envolverá alunos de Pós-graduação e Iniciação Científica;
- Produção de artigos científicos a serem publicados em revistas indexadas e internacionais de alto impacto; Dado a relevância do estudo e a necessidade de mais dados sobre interação entre a poluição atmosférica e a infecção de SARS-CoV-2, pretende-se ao fim de 12 meses já ter um artigo científico submetido com os dados da pesquisa;
- Impacto social: Este estudo *in vitro* será desenvolvido em paralelo ao projeto que irá avaliar a influência da exposição a poluição atmosférica em indivíduos com síndrome de pós-COVID-19 sobre função pulmonar, estado redox sistêmico, marcadores inflamatórios, fenótipo de linfócitos T periféricos e parâmetros genotóxicos (estudo submetido ao CEP e aguardando autorização para início). Com isso, será possível verificar o efeito conjunto da exposição a poluentes e infecção pelo SARS-CoV-2, apontar os marcadores que apresentam maior relevância clínica no tempo e tipo de sintomas da síndrome pós-COVID-19, bem como na identificação de concentração de poluentes presentes no ar e quais dos poluentes avaliados causam maior impacto nesta síndrome. Sendo assim, pode-se criar evidência científica para o embasamento de políticas públicas que reduzam a emissão de poluentes e realizem o monitoramento constante dos

mesmos visando reduzir a gravidade de doenças decorrentes dessa exposição. Estes resultados apresentam grande impacto especialmente no Brasil, que apresenta crescentes emissões de poluentes e grande disseminação de SARS-CoV-2. Salientando que o Rio Grande do Sul não dispõe de redes de monitoramento de poluentes e é o quarto Estado com maior número de casos de SARS-CoV-2).

Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

- A realização do projeto contribuirá para a geração de novos conhecimentos na área, considerando os poucos estudos avaliando o efeito do material particulado 2,5, um dos componentes principais da poluição atmosférica no contexto da COVID-19. Vale ressaltar que apesar do avanço da vacinação em inúmeros países, ainda temos um grande número de países com baixos níveis de vacinados e uma grande circulação de coronavírus e a ameaça de surgimento de novas variantes de preocupação. A exposição à fatores ambientais, como a poluição atmosférica, são capazes de contribuir para a infecção, tanto por reduzir a resposta imune quanto por aumentar a replicação viral. No entanto, a avaliação da possível contribuição da exposição a poluição atmosférica sobre a resposta celular a infecção de SARS-CoV-2 ainda é um tópico pouco explorado na literatura. Portanto, a avaliação do impacto da exposição *in vitro* da poluição atmosférica sobre a resposta de monócitos e linfócitos T contra partículas do vírus SARS-CoV-2 possibilita o melhor entendimento dos processos celulares, os marcadores inflamatórios e imunológicos envolvidos, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento sobre as bases da relação entre poluentes ambientais e a suscetibilidade a infecções por agentes patogênicos.

- O projeto propiciará a formação de recursos humanos, considerando que a equipe de trabalho inclui alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado. Além disso, será realizada 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.

- Publicações de artigos: Espera-se a produção de no mínimo 2 artigos (os marcadores de ativação e inibição celular de linfócitos T, produção de citocinas, geração de espécies reativas de oxigênio em monócitos e linfócitos T estimulados com poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado; potencial de membrana mitocondrial, proliferação celular e metilação global do DNA em monócitos e linfócitos T estimulados com poluente atmosférico MP_{2,5} e vírus SARS-CoV-2 inativado). Os artigos serão preparados e submetidos para publicação, em revistas indexadas e internacionais de alto impacto, tão logo se obtenha um conjunto de dados suficientes para as produções.

8. Referências

1. Datta SD, Talwar A, Lee JT. A Proposed Framework and Timeline of the Spectrum of Disease Due to SARS-CoV-2 Infection: Illness Beyond Acute Infection and Public Health Implications. JAMA. 2020;324(22):2251-2.
2. Del Rio C, Collins LF, Malani P. Long-term Health Consequences of COVID-19. JAMA. 2020;324(17):1723-4.
3. WHO. WHO Health Emergency DashboardWHO (COVID-19) Homepage: World Health Organization; 2021 [
4. Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. Lancet. 2021;397(10270):220-32.

5. McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, Carroll TP, Murphy MP, Dunlea DM, et al. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(6):812-21.
6. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med*. 2021;27(4):601-15.
7. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
8. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:827.
9. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. 2010;28:445-89.
10. Ng CT, Snell LM, Brooks DG, Oldstone MB. Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections. *Cell Host Microbe*. 2013;13(6):652-64.
11. Bashir MF, Ma BJ, Bilal, Komal B, Bashir MA, Farooq TH, et al. Correlation between environmental pollution indicators and COVID-19 pandemic: A brief study in Californian context. *Environ Res*. 2020;187:109652.
12. Chen P, Mao L, Nassis GP, Harmer P, Ainsworth BE, Li F. Coronavirus disease (COVID-19): The need to maintain regular physical activity while taking precautions. *J Sport Health Sci*. 2020;9(2):103-4.
13. Frontera A, Cianfanelli L, Vlachos K, Landoni G, Cremona G. Severe air pollution links to higher mortality in COVID-19 patients: The "double-hit" hypothesis. *J Infect*. 2020;81(2):255-9.
14. Katoto PDMC, Brand AS, Bakan B, Obadia PM, Kuhangana C, Kayembe-Kitenge T, et al. Acute and chronic exposure to air pollution in relation with incidence, prevalence, severity and mortality of COVID-19: a rapid systematic review. *Environ Health*. 2021;20(1):41.
15. WHO. An estimated 12.6 million deaths each year are attributable to unhealthy environments Geneva2016 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/deaths-attributable-to-unhealthy-environments/en/>].
16. Mortality and burden of disease from ambient air pollution [Internet]. Global Health Observatory; World Health Organization. 2016.
17. IARC. IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. International Agency of Research on Cancer/ World Health Organization; 2013.
18. WHO. Air Quality Guidelines: Global Update 2005.: World Health Organization (WHO); 2006.
19. Pope CA, Bhatnagar A, McCracken J, Abplanalp WT, Conklin DJ, O'Toole TE. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated with Endothelial Injury and Systemic Inflammation. *Circ Res*. 2016.
20. Aguilera I, Dratva J, Caviezel S, Burdet L, de Groot E, Ducret-Stich RE, 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*. 2016;124(11):1700-6.
21. Fraunberger EA, Scola G, Laliberté VL, Duong A, Andreazza AC. Redox Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4729192.
22. Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2013;94(6):1167-84.
23. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(7):995-1014.
24. Mitschik S, Schierl R, Nowak D, Jörres RA. Effects of particulate matter on cytokine production in vitro: a comparative analysis of published studies. *Inhal Toxicol*. 2008;20(4):399-414.
25. Czwojdzńska M, Terpińska M, Kuźniarski A, Płaczowska S, Piwowar A. Exposure to PM2.5 and PM10 and COVID-19 Infection Rates and Mortality: a one-year observational study in Poland. *Biomed J*. 2021.
26. Semczuk-Kaczmarek K, Rys-Czaporska A, Sierdzinski J, Kaczmarek LD, Szymanski FM, Platek AE. Association between air pollution and COVID-19 mortality and morbidity. *Intern Emerg Med*. 2021.
27. Prinz AL, Richter DJ. Long-term exposure to fine particulate matter air pollution: An ecological study of its effect on COVID-19 cases and fatality in Germany. *Environ Res*. 2022;204(Pt A):111948.
28. Rebuli ME, Brocke SA, Jaspers I. Impact of inhaled pollutants on response to viral infection in controlled exposures. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(6):1420-9.
29. Purkayastha A, Sen C, Garcia G, Langerman J, Shia DW, Meneses LK, et al. Direct Exposure to SARS-CoV-2 and Cigarette Smoke Increases Infection Severity and Alters the Stem Cell-Derived Airway Repair Response. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):869-75.e4.
30. Miyashita L, Foley G, Semple S, Grigg J. Traffic-derived particulate matter and angiotensin-converting enzyme 2 expression in human airway epithelial cells. *BioRxiv*. 2020.
31. Vo T, Paudel K, Choudhary I, Patial S, Saini Y. Ozone exposure upregulates the expression of host susceptibility protein TMPRSS2 to SARS-CoV-2. *BioRxiv*. 2020.
32. Ricke-Hoch M, Stelling E, Lasswitz L, Gunesch AP, Kasten M, Zapatero-Belinchón FJ, et al. Impaired immune response mediated by prostaglandin E2 promotes severe COVID-19 disease. *PLoS One*. 2021;16(8):e0255335.
33. **Romao P, Teixeira PC, Schipper L, al. e, Dorneles GP. Viral Load is Associated with Mitochondrial Dysfunction and Altered Monocyte Phenotype in Acute Severe SARS-CoV-2 Infection. SSRN. 2022.**
34. Marmett B, Nunes RB, de Souza KS, Lago PD, Rhoden CR. Aerobic training reduces oxidative stress in skeletal muscle of rats exposed to air pollution and supplemented with chromium picolinate. *Redox Rep*. 2018;23(1):146-52.
35. Antonello AM, Sartori T, Silva MB, Prophiro JS, Pinge-Filho P, Heermann R, et al. Anti-Trypanosoma activity of bioactive metabolites from *Photobacterium luminescens* and *Xenorhabdus nematophila*. *Exp Parasitol*. 2019;204:107724.

36. Dorneles GP, Lira FS, Romão PRT, Krüger K, Rosa-Neto JC, Peres A, et al. Levels of cardiorespiratory fitness in men exerts strong impact on lymphocyte function after mitogen stimulation. J Appl Physiol (1985). 2021;130(4):1133-42.

ANEXO I



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Pesquisa - COMPESQ

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Pesquisa analisou o projeto:

Número: 27/2022

Título: Efeitos da exposição ao material particulado 2,5 na resposta in vitro de monócitos e linfócitos T ao vírus SARS-CoV-2

Coordenador: Pedro Roosevelt Torres Romão

Vigência: 01/04/2022 a 01/04/2024

Pesquisadores:

Equipe UFCSPA:

- Roseana Böek Carvalho
- Paula Coelho Teixeira
- Pedro Roosevelt Torres Romão
- Bruna Marmett
- Alessandra Peres

Equipe Externa:

- Simone Gonçalves Da Fonseca - UFG

Atestamos que o projeto de pesquisa acima identificado foi registrado na Comissão de Pesquisa da UFCSPA. Salientamos que este registro não autoriza o pesquisador a coletar ou analisar dados oriundos de sujeitos de pesquisa. Salientamos também que este registro não garante a concessão de recursos financeiros por parte da UFCSPA a este projeto de pesquisa.

Porto Alegre, 28 de março de 2022

RENATA PADILHA GUEDES
Coordenadora Da Comissão De Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

EDITAL PROPPG Nº 10/2022 – Programa de fomento para a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA

PROJETO DE PESQUISA:

Efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide sobre prejuízos comportamentais e neuroinflamatórios da prole de ratas obesas

DADOS DO PROPONENTE E DA EQUIPE

Coordenadora: Dra. Renata Padilha Guedes – Profa. Depto. de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA

Colaboradores:

Márcia Giovenardi – Profa. Depto. de Ciências Básicas da Saúde, UFCSPA

Fernanda da Silva Rodrigues – Aluna de doutorado do PPG Biociências, UFCSPA

Jeferson Jantsch – Aluno de doutorado do PPG Biociências, UFCSPA

Gabriel de Farias Fraga – Aluno do curso de Biomedicina, UFCSPA

RESUMO

A obesidade ocasiona diversas alterações metabólicas, causando secreção crônica de moléculas pró-inflamatórias que, durante a gestação, são capazes de ultrapassar a barreira placentária e atingir os tecidos fetais, causando 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 pelo consumo de alimentos ultraprocessados sobre parâmetros metabólicos, neuroinflamatórios e comportamentais da prole, e do papel da suplementação com canabidiol (CBD) como forma 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, podendo favorecer o desenvolvimento de disfunções 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 e mantida durante toda a gestação e amamentação. 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, 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. 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.

Palavras-chave: obesidade; neuroinflamação; neurodesenvolvimento; sistema endocanabinóide

1. Caracterização da pesquisa

O ambiente intrauterino exerce efeitos significativos sobre a saúde pós-natal da prole até a idade adulta, com isso, exposições ambientais, incluindo infecções, contato com substâncias tóxicas, alterações nutricionais, e outros estressores são particularmente críticos durante a gestação (CONWAY; BROWN, 2019). Em relação à obesidade, diversas alterações no contexto metabólico da mãe podem ser disfuncionais para o desenvolvimento do feto, como a dislipidemia, a secreção crônica de citocinas pró-inflamatórias e alterações na composição da microbiota intestinal com subsequente elevação nos níveis plasmáticos e teciduais de ácidos graxos de cadeia curta (GLASTRAS et al., 2018; KONG et al., 2020; MACHADO; MONTEIRO; OLIVEIRA, 2019). Por isso, a obesidade materna é um dos principais fatores etiológicos de distúrbios neuronais e psiquiátricos na prole, que vão desde depressão e ansiedade até transtornos do espectro autista e esquizofrenia (ROBINSON; DALY; SUTIN, 2020). A principal relação apontada entre as alterações metabólicas maternas e esses desfechos neuronais é a neuroinflamação sustentada durante o período de desenvolvimento embrionário, 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).

A prevalência de obesidade em mulheres em idade reprodutiva varia de 20 a 40% ao redor do mundo, entretanto, a maior parte dos estudos têm como objetivo a prevenção dos distúrbios gestacionais através do manejo da obesidade materna, mas poucos se concentram na atenuação dos desfechos neurológicos uma vez que os danos já estão estabelecidos. Desse modo, a caracterização de possíveis agentes neuroprotetores que sejam capazes de minimizar os danos causados ao sistema nervoso central do feto pode ser uma importante aliada na redução de incidência desses distúrbios relacionados à obesidade, juntamente às estratégias de prevenção.

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). O CB1R é 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, dopamina, serotonina e ocitocina (BUSQUETS GARCIA et al., 2016; COVEY et al., 2017; KÖFALVI et al., 2020).

Das diversas funções exercidas pelo sistema endocanabinoide, destaca-se sua correlação com o comportamento alimentar e o metabolismo energético, principalmente através da sua influência no circuito de recompensa do cérebro em resposta a certos grupos alimentares, em especial aqueles ricos em gorduras e açúcar (CUNHA et al., 2020). Ainda, algumas alterações genéticas podem ser citadas, como 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). Já nos tecidos metabólicos, como intestino, fígado e adiposo, nos quais o sistema endocanabinoide se faz presente através dos receptores CB2, a sua

estimulação leva a um efeito protetor importante em indivíduos obesos, induzindo o aumento dos níveis de proteína desacopladora 1 (UCP1) no tecido adiposo e, conseqüentemente, da geração de calor e gasto de energia (ROSSI et al., 2016).

Por último, mas não menos significativo, 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, óxido nítrico etc.) (DONVITO et al., 2018). No sistema nervoso, os receptores CB1 atuam como mediadores anti-inflamatórios, reduzindo, 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 conseqüentemente 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 neurotóxicos. Com isso, estudos recentes sobre o papel da HAAG destacam que seu *knockdown* nas células microgлияis BV2 e o conseqüente aumento dos níveis de AEA levam a uma superexpressão de marcadores M2, revelando um importante efeito anti-inflamatório (TANAKA et al., 2019).

Sabe-se que o canabidiol (CBD) é capaz de inibir a sinalização endocanabinóide de forma dose-dependente, provavelmente ligando-se ao sítio alostérico do 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 endocanabinóide, apesar de não apresentar efeitos intrínsecos, sugere que é capaz de diminuir a atividade excessiva dos CB1R sem os efeitos colaterais relacionados aos seus agonistas inversos, 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-isquemia (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, inclusive atuando como agonista parcial do receptor 5-HT1A (SHANNON, 2019; SKELLEY et al., 2020).

Dessa forma, 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.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com canabidiol sobre aspectos metabólicos, comportamentais e neuroinflamatórios da prole gerados pela obesidade materna.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar comportamentos do tipo autista na prole juvenil e do tipo esquizofrênico na prole adulta de mães obesas.
- 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.
- 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.

3. Metodologia

3.1. Animais, descarte de resíduos e considerações éticas

Serão utilizados ratos *Wistar* machos (N=147) e fêmeas (N=162), contando com os filhotes, 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).

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 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFCSPA. Este projeto já foi aprovado pela CEUA sob o parecer 751/21.

3.2. Suplementação com óleo de canabidiol (CBD)

A suplementação de canabidiol será feita com o óleo da empresa Prati Donaduzzi, 200 mg/mL diluído em óleo de milho, para uma dose de 50mg/kg e um volume de 1mL/kg. A administração 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 e a duração do tratamento foram baseadas em um estudo piloto previamente realizado pelo grupo e em estudos anteriores que relatam efeitos positivos do CBD na cognição em modelos de roedores baseados em inflamação (BARICHELLO et al., 2012; CASSOL-JR et al., 2010; FAGHERAZZI et al., 2012; OSBORNE et al., 2017; SCHIAVON et al., 2014).

3.3. Delineamento do estudo

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) constituída de 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®), totalizando 4.4 Kcal/g - 48% carboidratos, 10% proteínas, 44% lipídios (n= 12/grupo). Os animais

terão livre acesso à água. As dietas serão fornecidas por 16 semanas (contando com o período de gestação) a partir da 3ª semana de vida. O controle do consumo alimentar será feito pela pesagem periódica das sobras que se encontram na grade da caixa moradia dos animais. Os animais serão pesados semanalmente, 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 21 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 + veículo (CT-VEH); mãe controle + óleo de CBD (CT-CBD); mãe obesa + veículo (OB-VEH); 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).

3.4. Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais adultos e juvenis serão submetidos a um jejum de 6 horas previas a eutanásia. As mães e os animais da prole 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.

3.5. Testes comportamentais

3.5.1. 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.

3.5.2. 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.

3.5.3. 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 $\text{Pref sacarose (\%)} = \frac{\text{consumo sacarose (mL)}}{\text{consumo sac (mL)} + \text{consumo água (mL)}} \times 100$.

3.5.4. 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.

3.6. 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.

3.7. 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.

3.8. Dosagens hormonais e de citocinas inflamatórias

Os níveis plasmáticos de insulina, leptina e citocinas inflamatórias serão determinados por ELISA utilizando kits comerciais.

3.9. 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.

3.10. Análise da expressão proteica (Western Blot)

Após quantificação, as proteínas de interesse (TLR4, SIRT1, 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 anti-GAPDH ou anti- β -actina.

3.11. Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta

A avaliação dos ácidos graxos de cadeia curta nas amostras de plasma e tecido cerebral dos animais será realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Para isto, as amostras biológicas (100 mg) serão homogeneizadas em 1 mL de solução de ácido fórmico 2%. Uma alíquota de 100 μ L do homogenato será utilizada para extração com a adição de 1900 μ L de uma solução de clorofórmio/metanol (2/1; v:v), formando uma única fase líquida. Posteriormente, serão adicionados 500 μ L de água deionizada promovendo uma separação entre a fase com clorofórmio (rica em lipídios) e uma fase metanol/aquosa. As amostras serão centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm. Em seguida, toda a fração contendo o clorofórmio será coletada e seca sob fluxo de nitrogênio a temperatura ambiente, sendo finalmente ressuspensa em 30 μ L de metanol e alíquotas de 2 μ L serão injetadas em um sistema analítico constituído por um cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 A PLUS acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 Ultra (Shimadzu, Japão). O espectrômetro será operado em modo scan (50 – 700 m/z) e resultados obtidos serão verificados comparando os achados com o descrito da biblioteca de referência espectral de massas do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST).

3.12. Dosagem de neurotransmissores

A quantificação simultânea dos neurotransmissores (ocitocina, glutamato, glutamina, GABA, serotonina e dopamina, assim como os seus metabolitos que incluem o ácido 3,4-diidroxifenilacético e o ácido homovanílico) será realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, utilizando amostras de tecido cerebral. Para isso, as amostras biológicas (100 mg) serão homogeneizadas em 1 mL de solução de ácido fórmico 2%. Uma alíquota de 50 μ L do homogenato será utilizada para a extração dos neurotransmissores, com a adição de 930 μ L de acetona e 20 μ L de padrão interno dopamina-d 4. As amostras serão homogeneizadas em vórtex e centrifugadas por 6 min a 10.000 rpm. Em seguida, alíquotas de 880 μ L serão secas sob fluxo de nitrogênio a temperatura ambiente, ressuspensas em 50 μ L de água ultrapura e alíquotas de 20 μ L serão injetadas em um sistema analítico constituído por um cromatógrafo líquido modelo Nexera UFLC acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo LCMS-8045 (Shimadzu, Japão). 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.

3.13. 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 Kolmogorov-Smirnov. 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).

4. Etapas de execução

O experimento I já foi realizado, incluindo testes comportamentais e coleta de tecidos. Sendo assim, esta proposta envolve a realização do experimento II e as análises correspondentes.

ATIVIDADE	TRIMESTRE			
	1º	2º	3º	4º
Período de dieta do experimento II	X	X		
Gavagem da prole e testes comportamentais			X	
Dosagens plasmáticas			X	X
Análise de expressão proteica			X	X
Análise de expressão gênica			X	X
Análises histológicas			X	X
Dosagem de neurotransmissores				X

5. Orçamento

Nesta proposta, estamos solicitando apenas consumíveis para a realização de Western blot e PCR em tempo real. Os demais produtos necessários para a realização do projeto, como primers, anticorpos primários e outros itens, já estão disponíveis para uso. Segue abaixo orçamento dos produtos aqui solicitados:

Anticorpos secundários	R\$ 3.001,00
Membrana de nitrocelulose	R\$ 2.313,00
Trizol	R\$ 642,85
Sybr™ Green Master Mix	R\$ 1.700,00
Microamp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	R\$ 306,69
Goscript Reverse Transcription System	R\$ 1.950,00
Substrato Clarity Ecl Western	R\$ 1.809,00
Luvas de procedimentos	R\$ 257,40
TOTAL	R\$ 11.979,94

6. Produtos esperados

O presente projeto constitui parte da tese de doutorado da aluna Fernanda Rodrigues, com isso, os resultados obtidos resultarão na tese da doutoranda e deverão ser publicados em periódicos classificados nos extratos mais elevados do Qualis/CAPES, além de serem apresentados em eventos científicos nacionais e internacionais. Ainda, o projeto contribuirá para a formação de alunos de Iniciação Científica diretamente envolvidos em todas as etapas de execução e 1 trabalho de conclusão de curso.

7. Potencial de impacto

Distúrbios neurológicos originados no desenvolvimento intrauterino são problemas de saúde pública e tendem a crescer paralelamente ao aumento da prevalência de obesidade em mulheres em idade reprodutiva. Desfechos graves, como versões severas de transtornos do espectro autista, não comprometem as apenas

as funções do indivíduo afetado, mas toda a família, requerendo uma rede de apoio especializada e uma miríade de tratamentos adjacentes. Para futuras intervenções clínicas eficazes, é de extrema importância que o mecanismo neuroinflamatório envolvido seja elucidado e que alternativas terapêuticas específicas e seletivas sejam propostas. Dessa forma, é possível contribuir com a promoção de políticas públicas voltadas ao tratamento dessas condições, de forma a complementar as ações preventivas. 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.

O presente projeto propõe o estudo da manipulação do sistema endocanabinóide como possível estratégia contra os efeitos deletérios da obesidade materna sobre o sistema nervoso central do feto. Até o momento, apesar dos muitos esforços voltados ao manejo da obesidade gestacional como forma de prevenção de desordens neurológicas, não existem terapias bem definidas para os danos já estabelecidos. Assim, este projeto tem grande potencial de abrir uma diversidade de linhas de investigação voltadas à solução de um problema emergente cujas estratégias de prevenção ainda não se mostraram suficientemente eficazes, além de elucidar os mecanismos envolvidos de forma a corroborar com o manejo de pacientes de forma prática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- BONDY, S. C. Aspects of the immune system that impact brain function. **Journal of Neuroimmunology**, v. 340, p. 577167, mar. 2020.
- BOYKO, M. et al. The influence of aging on poststroke depression using a rat model via middle cerebral artery occlusion. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 847–859, dez. 2013.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 STZ-Induced 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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

KIRKHAM, T. C. Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight: **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 5–6, p. 297–313, set. 2005.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

ROBINSON, E.; DALY, M.; SUTIN, A. Association of parental identification of child overweight and mental health problems during childhood. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. 9, p. 1928–1935, set. 2020.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- STRAIKER, A. et al. Cannabidiol Inhibits Endocannabinoid Signaling in Autaptic Hippocampal Neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 94, n. 1, p. 743–748, jul. 2018.
- 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 cannabidiol-dimethylheptyl 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.
- ZHANG, Y.-M. et al. Activation and blockade of prefrontal 5-HT₆ receptors produce different effects on depressive-like behaviors in unilateral 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neuropharmacology**, v. 110, p. 25–36, nov. 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

EDITAL PROPPG Nº 10/2022

PROGRAMA DE FOMENTO A REALIZAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA NA UFCSPA

IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

Título do projeto: Desenvolvimento, Otimização, Caracterização e Avaliação de Nanopartículas para a Produção de Medicamentos.

Coordenador(a): Profa. Dra. Tanira Alessandra Silveira Aguirre

Área do conhecimento predominante: Ciências Exatas e da Terra: Química; Subárea: Físico-Química

Caracterização da proposta: Pesquisa Científica

Instituição Executora/ Equipe: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre/ Profa. Dra. Dinara J. Moura, Profa. Dra. Elizandra Braganhol, Flávia Pires Peña, Isabele Leopoldino, Jeferson Henn, Matheus Bernardes Ferro.

Instituição Parceira/ Equipe de colaboradores: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Profa. Dra. Sílvia S. Guterres e Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann.

Palavras-chave: Nanomedicina; Nanopartícula; Babaçu; Polímero; Glioblastoma.

1. Resumo

A nanomedicina é uma área promissora para o desenvolvimento científico e social no Brasil, podendo ser aplicada na busca de novos tratamentos para doenças como, por exemplo, o câncer. Entretanto, ainda depende de muitos avanços científicos e tecnológicos já que as tecnologias necessárias para a ampliação da nanomedicina estão em desenvolvimento. O uso de nanopartículas poliméricas (NPs) para liberação controlada de substâncias bioativas tem mostrado potencial terapêutico significativo. Concomitantemente, as tecnologias de entrega direcionada estão se tornando cada vez mais importantes como uma área científica de investigação. No câncer, NPs podem ser usadas para administrar quimioterapias a células tumorais com maior eficácia e citotoxicidade reduzida em tecidos saudáveis periféricos. O glioma é um tipo comum de tumor que se origina nas células gliais que residem no cérebro. Os gliomas são chamados de tumores cerebrais intra-axiais, porque as células tumorais localizam-se dentro do cérebro e frequentemente misturam-se com o tecido normal desse órgão. Os glioblastomas estão entre os tipos de gliomas mais agressivos, produzindo frequentemente incapacidade progressiva e morte. A cirurgia é o tratamento inicial mais comum para glioblastoma e outras abordagens, como a radioterapia e a quimioterapia, também podem ser utilizadas em associação com a cirurgia ou não, dependendo do prognóstico. A temozolomida é um dos fármacos utilizados na quimioterapia, essa molécula é considerada como o padrão-ouro no tratamento de glioblastomas. No entanto, mesmo após cirurgia e tratamentos radio- e quimioterápicos, a média de sobrevivência é de menos de dois anos. As opções de tratamento limitadas e menos eficazes para esse tipo de glioma altamente agressivo exigem a melhoria das tecnologias existentes e o desenvolvimento de novos tratamentos. A nanotecnologia é uma alternativa promissora para o tratamento de glioblastomas e alguns nanomateriais demonstraram a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e permanecer nos tecidos próximos ao tumor apresentando efeito terapêutico pronunciado. O presente projeto visa investigar o desenvolvimento de nanopartículas inovadoras com núcleo composto por óleo de babaçu para a entrega de agentes antineoplásicos para o potencial tratamento de glioblastoma.

2. Contextualização do tema

Nanotecnologia pode ser definida como um termo geral associado às estruturas e fenômenos que ocorrem em dimensões em escala nanométrica e são aplicados no desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de materiais, dispositivos e sistemas com controle de forma e tamanho nessa escala em diversas áreas das ciências básicas e aplicadas. Existem diversos exemplos de estruturas que existem em dimensões nanométricas - ou nanoescala - como por exemplo podem-se citar biomoléculas essenciais dentro do corpo humano, componentes de alimentos e materiais particulados. Contudo, somente nos últimos 50 anos, foi possível **controlar** com exatidão e

precisão a modificação de moléculas e estruturas dentro dessa faixa de tamanho. É esse controle na escala nanométrica que distingue a nanotecnologia de outras áreas da tecnologia.

Historicamente, os Romanos já utilizavam princípios da nanotecnologia há 1600 anos atrás. O Cálice de Licurgo está atualmente em exibição no Museu Britânico em Londres e possui a cor verde quando iluminado frontalmente e a cor vermelha quando iluminado por trás. Essa alteração é devida a nanopartículas coloidais de ouro e prata contidas no vidro¹. Os fenômenos que ocorrem na nanoescala, de maneira geral, diferem daqueles que ocorrem em dimensões maiores e isso possibilita o desenvolvimento de novos materiais e estruturas. Quimicamente, os nanomateriais possuem grande área superficial com **elevada razão de área/volume** e isso propicia efeitos de interface e quânticos que não são vistos com tamanhos maiores e acarretam mudanças em propriedades físicas e químicas da matéria.

A nanotecnologia possui grande potencial para trazer benefícios para a sociedade advindos de diversas áreas de pesquisa e aplicação, e atrai investimentos crescentes de governos e indústrias em todo o mundo. O mercado global de nanotecnologia deverá ultrapassar **125 bilhões de dólares até 2024**, segundo o relatório *Global Nanotechnology Market*². Isso representa um acréscimo de aproximadamente 1500 % em 20 anos³, demonstrando o crescente interesse na área. Os setores industriais que mais prontamente adotam a nanotecnologia são o setor de informações e comunicações, incluindo campos eletrônicos e fotônica, tecnologia de alimentos, agricultura, tecnologia de energia e produtos médicos. Nesse último, o termo particular nanomedicina é utilizado e pode ser entendido como a aplicação da nanotecnologia à área médica incluindo diversas abordagens de sistemas de administração de fármacos (*drug delivery*), diagnósticos, implantes e teranóstica.

Um nanômetro (nm) é 1×10^{-9} m, de maneira comparativa um fio de cabelo humano possui 80.000 nm de largura, um glóbulo vermelho possui aproximadamente 7.000 nm de largura e uma molécula de água tem aproximadamente 0,3 nm de diâmetro. A definição da nanoescala já foi realizada de algumas formas diferentes dependendo da área do conhecimento que a está gerando. A *Royal Society* do Reino Unido e *Royal Academy of Engineering* em seu relatório de 2004 sugere que o alcance da nanoescala é do nível atômico, em torno de 0,2 nm até cerca de 100 nm⁴. Contudo, é interessante notar que parte da literatura se refere à nanoescala como dimensões entre 100 e 1000 nm. Particularmente na área de desenvolvimento de nanossistemas carreadores de substâncias com efeito terapêutico, a maior parte desses sistemas estará em uma faixa entre 100 – 500 nm⁵.

2.1 Nanopartículas e o vetorização de fármacos

Pode-se atribuir o conceito de administração de fármacos direcionada à Paul Ehrlich, que no início do século XX tentou desenvolver as chamadas “*magic bullets*” as quais iriam conter certos fármacos que seriam direcionados para doenças específicas e matariam todos os patógenos após um único tratamento⁶. Ehrlich era um médico com grande interesse em bacteriologia e imunologia e, seus estudos podem ser considerados os primeiros indícios de terapia medicamentosa direcionada. Ele desenvolveu a arsfenamina, uma molécula a base de arsênico a qual foi comercializada sob a marca Salvarsan em 1910 para o tratamento da sífilis. Este composto sintético pareceu ser eficaz, curando a doença sem ser tóxico ao paciente e ele recebeu o Prêmio Nobel em 1908. Já no final dos anos 60, o professor Peter Paul Speiser do Instituto Federal Suíço de Tecnologia em Zurique desenvolveu as primeiras nanopartículas poliméricas para fins de entrega direcionada de fármacos e para vacinas. As nanopartículas foram preparadas pelo método de polimerização em emulsão ou polimerização heterogênea em meio aquoso utilizando metil metacrilato como monômero⁷.

As nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis (NPs) atraem maior atenção dos pesquisadores, pois têm demonstrado grandes potencialidades terapêuticas devido principalmente à capacidade de encapsulação de uma quantidade suficiente de moléculas para efeito terapêutico e estabilidade tanto nos fluídos biológicos como durante o armazenamento. Em termos econômicos, as nanopartículas (poliméricas ou não) detêm mais de 85% do mercado global de nanomateriais². Na área farmacêutica, diversos medicamentos nanotecnológicos são comercializados sendo que a grande maioria é administrada ou por injeção intravenosa (i.v.) ou pela via ocular. O **DOXIL® (Janssen) foi o primeiro medicamento contendo um carreador nanotecnológico a ser aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration)** nos Estados Unidos em 1995. Um dos principais benefícios do DOXIL® no tratamento de tumores sólidos foi melhorar o perfil de segurança da doxorubicina e a tolerância ao tratamento dos pacientes. A formulação do medicamento em lipossomas reduz a cardiotoxicidade limitando a

exposição da doxorubicina ao tecido cardíaco⁸. Outras formulações de lipossomas comercializadas incluem AmBisome® (Astellas), lipossomas de anfotericina B para indicações de doenças infecciosas, DaunoXome® (Galen), lipossomas de daunorrubicina de 50 nm aprovados para o sarcoma de Kaposi associado à AIDS e Onivyde® (Ipsen INC), uma formulação lipossomal de 100 nm de irinotecano aprovada em 2015 para o tratamento de adenocarcinoma ductal pancreático em combinação com 5-fluorouracil e leucovorina^{9,10}. Já o Abraxame® (Abraxis Bioscience) foi o primeiro medicamento contendo nanopartículas aprovado pelo FDA em 2005. Essas nanopartículas contêm paclitaxel encapsulado e são revestidas de albumina, uma maneira inteligente de evitar a ligação inespecífica de proteínas do sangue. O uso aprovado foi para o câncer de mama metastático e, recentemente, para o adenocarcinoma ductal pancreático¹¹.

2.2 Obtenção de nanopartículas poliméricas

Em termos de metodologia para preparação de nanopartículas poliméricas (NPs), duas abordagens gerais podem ser utilizadas e diferem na forma do polímero. Uma utiliza os monômeros dispersos e a polimerização ocorre *in situ*, já na outra o polímero pré-formado é utilizado¹². Ambas as técnicas fornecem nanopartículas em suspensão coloidal aquosa. Além de escolher a forma em que o polímero será empregado, pode ser selecionada a técnicas de preparação de nanopartículas, sendo que nem todas são compatíveis com ambas as formas dos polímeros. Seis técnicas são consideradas clássicas na literatura: nanoprecipitação, emulsão-difusão, emulsão-coacervação, dupla emulsificação, revestimento polimérico e camada por camada (*layer-by-layer*)¹³.

Os polímeros pré-formados utilizados devem ser biodegradáveis e biocompatíveis a fim de proteger a molécula ativa e produzir nanopartículas que não sejam nem tóxicas nem inflamatórias. O polímero permite modular características físicas e químicas da nanopartícula (por exemplo estabilidade, hidrofobicidade), comportamento biológico (por exemplo, captação celular, bioadesão) e características de liberação do fármaco (por exemplo, prolongada, retardada, sustentada)¹³. Os polímeros mais encontrados na literatura para o preparo de NPs são: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ε-caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico^{12,14}. Polímeros sintéticos são melhores que polímeros naturais em termos de pureza e reprodutibilidade. O PCL é amplamente usado na preparação de NPs e está entre os polímeros hidrofóbicos semicristalinos que são biocompatíveis e biodegradáveis. A alta permeabilidade ao fármaco e as propriedades lentas de degradação *in vivo* do PCL também são características favoráveis desse polímero para o preparo de NPs.

As nanopartículas devem ser preparadas por uma técnica que não destrua a substância bioativa e que possua estabilidade físico-química. A técnica de **nanoprecipitação do polímero pré-formado foi inicialmente desenvolvida por Fessi et al. em 1989** e é largamente utilizada atualmente, pois permite a formação instantânea e reprodutível de nanopartículas monodispersas¹⁵. A obtenção de nanoesferas ou nanocápsulas é realizada em uma etapa na qual a fase orgânica é injetada à fase aquosa sob agitação magnética¹⁵. Na técnica de nanoprecipitação do polímero pré-formado, a fase orgânica é composta pelo polímero e um solvente orgânico, geralmente acetona ou etanol, e a molécula com caráter lipofílico que se deseja encapsular. Caso a intenção seja a formação de **nanocápsulas**, pode-se adicionar à essa fase, componentes lipofílicos que formarão o núcleo. Já a fase aquosa é composta por uma quantidade em excesso de água e um tensoativo com valor de equilíbrio hidrofílico lipofílico (EHL) elevado.

As substâncias bioativas podem ser encapsuladas no interior nas nanocápsulas e a **superfície dessas NPs pode ser modificada** para superar as barreiras naturais, como membranas celulares. Ainda, com o auxílio de biossensores (por exemplo, anticorpos) as NPs com superfície modificada podem reconhecer células e tecidos específicos e anexar-se para liberar as substâncias bioativas para o alvo durante um período de tempo relativamente longo. Estes mecanismos são de interesse sobretudo para o tratamento do câncer, uma vez que ocorre a liberação controlada dos agentes quimioterápicos exclusivamente no tecido tumoral, os efeitos secundários podem ser reduzidos e, simultaneamente, doses mais elevadas de agentes antineoplásicos podem atingir o tecido afetado. O tratamento do câncer baseado no transporte direcionado de substâncias bioativas pode, além disso, tirar proveito do efeito EPR (permeabilidade e retenção aumentadas) em que se investiga a potencialidade de as nanopartículas se depositarem nos tumores em maior grau do que em tecido saudável.

2.3 Nanopartículas poliméricas e o câncer do sistema nervoso central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) devem-se ao crescimento de células anormais nos tecidos do cérebro e da medula espinhal. O câncer do SNC representa de 1,4 a 1,8% de todos tumores malignos no mundo e cerca de 88% dos tumores de SNC são no cérebro¹⁶. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer do SNC é o 14º tipo mais frequente em homens, com o risco estimado de 4,3/100 mil, e ocupa a 16ª posição entre as mulheres, com o risco estimado de 3,6/100 mil¹⁷. **Nas estatísticas mais recentes, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimava que, no Brasil, o número de casos de câncer de SNC seria de 11.090 em 2020, sendo 5.870 homens e 5.220 mulheres** ¹⁶. Os glioblastomas são os mais agressivos tumores no SNC, sendo considerado incurável, constituindo aproximadamente 70% de todos os gliomas¹⁸. Em 2014, o Ministério da Saúde publicou o texto Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia, que sugere que os protocolos de tratamento para os gliomas grau IV (glioblastoma multiforme (GBM), espongiblastoma polar, astroblastoma e gliomatose cerebral) poderiam ser um dos seguintes ¹⁹: cirurgia seguida por radioterapia; cirurgia seguida por radioterapia associada à quimioterapia; radioterapia associada à quimioterapia; radioterapia paliativa; quimioterapia paliativa.

Entretanto, o resultado de sucesso do tratamento ainda é considerado baixo e deve-se principalmente a fatores clínicos: localização primária destes tumores com natureza infiltrativa, características de resistências aos fármacos quimioterápicos e a seletividade e impermeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). A existência da BHE, uma 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 resultados falhos com as terapias atuais²⁰. Alguns mecanismos celulares importantes estão modificados em células tumorais afetando diretamente o tratamento com quimioterápicos, como, por exemplo, o transporte do fármaco pela membrana celular, alteração da expressão de enzimas-chave, alteração no metabolismo do fármaco, aumento do reparo de DNA e inabilidade de entrar na via apoptótica²¹, justificando a busca por novos modelos de terapia, como novos alvos terapêuticos e alterações nas moléculas utilizadas no tratamento da doença.

A quimioterapia para pacientes com glioblastoma tornou-se também parte do tratamento adjuvante. Inicialmente foi demonstrado benefício com nitrosuréia carmustina e outras nitrosuréias, tanto em regime de monoterapia como em combinação. Outros estudos mostraram benefícios com o uso da temozolomida como terapia adjuvante, e atualmente esse fármaco é considerado como de primeira escolha. A **temozolomida (TMZ)** pertence a uma classe de agentes alquilantes, como um derivado da imidazotetrazina, é uma substância de baixo peso molecular, sendo 100% absorvida por via oral, e praticamente toda ela deverá ter sido eliminada após 8 horas da ingestão. Neste contexto, a incorporação da temozolomida (TMZ) a compostos vetorizados caracteriza-se como uma alternativa promissora na busca pelo melhoramento terapêutico de pacientes portadores de GBM. Outros agentes antineoplásicos ainda podem ser empregados na clínica dependendo do caso, como por exemplo, imatinibe, bevacizumabe, procarbazina, lomustina e dacarbazina ^{22,23} e também são passíveis de encapsulação.

Desde a década de 60, a administração de altas doses de **dexametasona (DXM)** representa o padrão ouro para o tratamento para reduzir o edema causado por tumores cerebrais, embora o mecanismo exato de ação não seja conhecido²⁴. Nos últimos 10 anos, novos estudos *in vitro*, *in vivo* pré-clínicos e clínicos, foram realizados e a influência negativa da DXM no GBM têm sido discutida. Os resultados reportados ainda são muitas vezes contraditórios com provável influência genética²⁴. Além disso, recentemente um amplo estudo clínico demonstrou que pacientes com glioblastoma recorrentes e que fazem uso da dexametasona tiveram um prejuízo neurocognitivo associado ao uso do corticosteroide²⁵. Nesse contexto, a nanoencapsulação da DXM pode ser investigada a fim de propor uma redução na dose administrada e menos efeitos negativos aos pacientes.

As nanopartículas poliméricas (NPs) apresentam uma alternativa interessante de entrega de fármacos, podendo atuar como reservatório e levando a um controle de liberação das moléculas de interesse, com a finalidade de obter resultados terapêuticos melhorados bem como efeitos adversos reduzidos. A liberação controlada e constante de fármacos permite, em muitos casos, a redução da dose e consequentemente dos efeitos indesejados de certos fármacos. Em casos específicos de **tratamento de GBM existem diversas linhas de pesquisa focadas em nanomedicina, alguns artigos publicados fazem uma revisão aprofundada do tema**^{23,26}. **Não será apresentada a revisão completa da literatura na área de aplicação das NPs no tratamento de GBM, uma**

vez que se optou em focar na elucidação da tecnologia proposta nesse projeto. Contudo, de uma maneira geral, pode-se afirmar que a maioria das NPs encontradas na literatura e relacionadas com GBM, tratam de encapsulação de TMZ e são produzidas a partir de PLA, PLGA e diversas possuem revestimentos de diferentes tipos de PEG (poli etilenoglicol)²⁷⁻²⁹. Em termos terapêuticos, os efeitos apresentados em modelos animais são estatisticamente melhores quando comparados à administração da substância bioativa livre²³.

3. Justificativa

Levando-se em consideração o exposto acima acerca da severidade dos glioblastomas e a necessidade urgente de novas terapias, o presente projeto visa **contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos para esse tipo específico de glioma** a partir de um trabalho sistemático que inclui desenvolvimento, caracterização, otimização e avaliação preliminar *in vitro* de novas nanopartículas contendo TMZ. Além do desenvolvimento tecnológico, o projeto visa a **avaliação biológica preliminar** das nanopartículas que forem obtidas, com características adequadas, em ensaios *in vitro* a fim de avaliar a eficácia e compreender a ação vetorizada da TMZ no tratamento de gliomas.

A **investigação de novas nanopartículas poliméricas** para a administração de moléculas com efeito terapêutico será realizada e, especificamente, serão utilizados um agente antineoplásico (TMZ) e um glicocorticoide (DXM) para a avaliação preliminar *in vitro* após a obtenção de NPs com adequado perfil nanotecnológico. Para o preparo de nanocápsulas será utilizado o método de **nanoprecipitação do polímero pré-formado** utilizando-se o polímero PCL; o óleo de babaçu será o núcleo principal, podendo esse ser combinado com outros componentes lipofílicos conforme necessário. Acetona e etanol serão utilizados como solventes orgânicos e polissorbato 80 será o tensoativo a ser adicionado na fase aquosa. Pretende-se **obter metodologia viável de ser executada integralmente na UFCSPA**, para isso planeja-se realizar uma extensa investigação físico-química para avaliação dos efeitos dos solventes, dos agentes tensoativos, do núcleo lipofílico e da concentração do polímero na morfologia e estabilidade das partículas. É interessante apontar que o óleo de babaçu é um óleo natural de origem brasileira com atividades anti-inflamatória e analgésica utilizado já em formulações cosméticas aplicadas em humanos. Nesse contexto, produtos naturais e de fontes renováveis têm uma ampla aceitação industrial pela sua característica de sustentabilidade. Além disso, componentes com um amplo histórico de uso em humanos possuem a vantagem de já terem sido submetidos à verificação do perfil toxicológico, e possuem a tendência de serem aprovados pelos órgãos regulamentadores de uma forma mais rápida. **Não foram encontrados relatos na literatura de estudos que incorporam o óleo de babaçu como núcleo lipofílico de nanocápsulas, indicando o potencial inovador do projeto.** O objeto do acesso ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado para o óleo de babaçu foi realizado junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número do cadastro: ABCECDB em nome da proponente desse projeto. As nanopartículas que forem obtidas de maneira reprodutível e que apresentarem características nanotecnológicas adequadas poderão representar uma **plataforma para administração de substâncias bioativas**.

Além do citado, gostaríamos de **contribuir para um maior entendimento da influência do tratamento da dexametasona em pacientes que estão sob o regime quimioterápico com a temozolomida**. A justificativa do uso dos corticoides é a prevenção de edema pós-cirurgia de retirada do tumor. Entretanto, os efeitos dessa terapia sobre o microambiente tumoral é completamente desconhecida, e estudos de colaboradores estão investigando se a utilização de dexametasona em pacientes com glioblastoma pode gerar um prejuízo na resposta à quimioterapia. Nesse projeto, pretende-se observar as características de malignidade celular *in vitro* de linhagens celulares de glioblastoma (animal e humana) mediante administração de dexametasona nanoencapsulada e, posteriormente, a resposta a temozolomida nanoencapsulada, em uma tentativa de reprodução do regime terapêutico pelo qual os pacientes com GBM passam e avaliar se o controle na liberação dos fármacos exerce influência no tratamento.

4. Objetivos

O projeto possui como **objetivo geral** desenvolver, otimizar, caracterizar e avaliar, de maneira preliminar, nanopartículas inovadoras para administração de substâncias bioativas para o tratamento de glioblastoma.

E como **metas específicas**:

META 1: Desenvolver nanopartículas com núcleo lipídico formado pelo óleo de babaçu.

META 2: Otimização do processo de obtenção das nanopartículas.

META 3: Caracterizar as nanopartículas em termos de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, análise morfológica, análise térmica e estabilidade.

META 4: Incorporar substâncias bioativas em nanopartículas e caracterizar em termos de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, análise morfológica, análise térmica, estabilidade, teor e eficiência de encapsulação. As substâncias selecionadas para incorporação em um primeiro momento são: temozolomida - **NP_{TMZ}** (padrão de tratamento do GBM na atualidade) e dexametasona - **NP_{DXM}** (tratamento concomitante que apresenta dados atuais conflitantes – a inclusão será feita para avaliação da influência da dexametasona nas avaliações *in vitro* da temozolomida após a nanoencapsulação).

META 5: Desenvolver e validar um método analítico de quantificação das substâncias bioativas encapsuladas nas nanopartículas.

META 6: Avaliar o perfil de liberação *in vitro* dos fármacos encapsulados nas nanopartículas.

META 7: Avaliar as nanopartículas em termos de citotoxicidade e proliferação celular por meio de ensaios *in vitro* em linhagens celulares de glioblastoma em modelos sub-crônico e agudo.

Meta 8: Avaliar o estresse oxidativo gerado nas linhagens de GBM humano tratadas com nanopartículas em modelos sub-crônico e agudo.

Meta 9: Avaliar a participação das vias de sinalização PI3K/Akt e ERK1/2 na citotoxicidade causada pelas nanopartículas em modelos sub-crônico e agudo.

Meta 10: Avaliar a disfunção mitocondrial e elucidar os mecanismos de bloqueio da proliferação e morte celular pelas nanopartículas, como necrose e apoptose em modelos sub-crônico e agudo.

Meta 11: Mimeticar o protocolo clínico de tratamento para GBM utilizando as formulações preparadas.

Meta 12: Expor linhagens de células a concentração plasmática de dexametasona nanoencapsulada (**NP_{DXM}**) imitando a posologia da clínica e avaliar proliferação celular, ciclo celular, morte celular e expressão de citocinas.

Meta 13: Avaliar a resposta à TMZ nanoencapsulada (**NP_{TMZ}**) das células de glioma expostas à DXM nanoencapsulada (**NP_{DXM}**).

5. Materiais e métodos

5.1. Matérias-primas

As matérias-primas principais a serem utilizadas são: óleo de babaçu (*Orbignya oleífera*, Mundo dos Óleos, Brasil), poli(ε-caprolactona) (Sigma-Aldrich, Brasil) triglicerídeos de cadeia média (ácidos cáprico e caprílico, Delaware, Brasil), oleato de sorbitano (Sigma-Aldrich, Brasil), trioleato de sorbitano (Sigma-Aldrich, Brasil), polissorbato 80 (Tween® 80, Sigma-Aldrich, Brasil), sesquioleato de sorbitano (Sigma-Aldrich, Brasil), temozolomida, dexametasona (Sigma-Aldrich, Brasil). Os solventes orgânicos serão etanol e acetona (Neon, Brasil) para o preparo das NPs e acetonitrila e metanol (Merck, Brasil) para quantificação.

5.2. Métodos

5.2.1. Preparação das nanopartículas

Para a preparação das nanopartículas serão feitas duas fases, uma orgânica (FO) e uma aquosa (FA). Inicialmente, na FO serão misturados PCL (100 mg), (acetona (27 mL), óleo de babaçu (38 mg), triglicerídeo de cadeia média do ácido cáprico-caprílico (160 µL). A FA, por outro lado, será composta de água ultrapura (53 mL) e polissorbato 80 (70 mg). Ambas as fases serão colocadas sob agitação e aquecimento a 40 °C. Após completa homogeneização das fases, a fase orgânica será injetada na fase aquosa lentamente o auxílio de funil específico para que ocorra a organização do sistema. A formulação é deixada em agitação magnética controlada por 10 min e, posteriormente, será levada ao rotaevaporador e seu volume será reduzido a 10 mL.

5.2.2. Otimização do processo de obtenção das nanopartículas

Será realizada uma extensa avaliação sistemática das variáveis envolvidas na preparação das nanocápsulas seguindo parâmetros mostrados por Badri *et al*¹³. Serão verificadas a influência de parâmetros como volume e tipo de solvente, quantidade de polímero, tipo e quantidade de tensoativos, componentes lipídicos no núcleo e eliminação do solvente, na obtenção, estabilidade, potencial zeta e polidispersão das nanopartículas. Para isso, diversos lotes de nanocápsulas serão preparados por nanoprecipitação de polímero pré-formado e as que apresentarem tamanho de partícula entre 100 e 500 nm, menor índice de polidispersão e maior potencial zeta serão consideradas adequadas. A maior eficiência de encapsulação também poderá ser usada como fator decisivo.

5.2.3. Caracterização físico-química das nanopartículas

As nanopartículas serão caracterizadas por diversas técnicas as quais estão descritas abaixo. As análises serão realizadas em triplicatas de lote de formulações.

5.2.3.1 Determinação de pH: a determinação de pH será realizada em potenciômetro (B474 Micronal) diretamente nas suspensões de nanocápsulas.

5.2.3.2 Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão: as determinações dos diâmetros médios ponderados por volume (D4,3), distribuição de tamanho de partícula e Span (indicador polidispersão) das nanocápsulas serão realizadas através de difração a laser (Mastersizer 2000®, Malvern Instruments, UK). As amostras serão adicionadas diretamente à água destilada na unidade de dispersão do equipamento até atingir um índice de obscurecimento mínimo de 2%. Tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico *z-average*) e índice de polidispersão (PDI) de formulações serão determinados por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das nanocápsulas (500 vezes, v/v) em água destilada. Todas as análises serão realizadas em triplicata de lote.

5.2.3.3 Potencial zeta: o potencial zeta das nanocápsulas será obtido através de eletroforese (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), após diluição das dispersões (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada através de membrana 0,45 µm. Os resultados serão obtidos através da média de três determinações de diferentes lotes.

5.2.3.4 Análise térmica das dispersões coloidais: as nanocápsulas serão analisadas por calorimetria exploratória diferencial a fim de avaliar a cristalinidade e identificar possíveis modificações na estrutura cristalina dos lipídeos nanoestruturados, e das moléculas encapsuladas. As amostras serão mantidas em atmosfera de nitrogênio e uma rampa apropriada de aquecimento e resfriamento será realizada.

5.2.3.5 Estabilidade: as nanocápsulas serão avaliadas quanto à estabilidade com base no aspecto visual, pH, diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. As dispersões serão mantidas em câmara climática (32 ± 2 °C, 75 ± 5% UR) sendo avaliadas após intervalos pré-determinados.

5.2.3.6 Teor das moléculas encapsuladas: um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) adequado para a quantificação da(s) molécula(s) encapsulada(s) será desenvolvido e validado conforme legislação vigente. As nanocápsulas serão tratadas com o solvente adequado a fim de extrair a(s) substância(s) bioativa(s) encapsulada, a amostra será filtrada (0,45 µm) e a quantificação será feita pelo método analítico.

5.2.3.7 Eficiência de encapsulação: a eficiência de encapsulação da(s) molécula(s) encapsulada(s) será calculada pela diferença entre o teor total de molécula e a molécula livre nas formulações. A molécula livre será analisada por ultrafiltração / centrifugação (Microcon®; MC Millipore 30.000 Da) a 4120 g por 10 min e quantificada pelo método analítico previamente validado.

5.2.3.8 Liberação das moléculas encapsuladas a partir das nanocápsulas: uma alíquota de cada nanocápsula será adicionada em membranas de celulose de diálise e incubados em de solução tampão a 36 °C. Em intervalos pré-determinados, 1 mL de cada solução será coletado do meio externo e o volume completado com meio novo. As amostras serão analisadas pelo método analítico previamente validado. 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.

5.2.4 Análises *in vitro*

Uma série de ensaios *in vitro* com complexidade crescente são propostas nesse projeto para avaliação das nanopartículas com núcleo de óleo de babaçu e com agentes antineoplásicos incorporados. Serão utilizadas as linhagens celulares T98G (resistente à TMZ) e U87 (sensível à TMZ) para os experimentos. As linhagens foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e do banco da *American Type Culture Collection* (ATCC). Ambas as linhagens serão mantidas conforme condições sugeridas pela ATCC.

5.2.4.1 Viabilidade celular preliminar (MTT): As células U87 (linhagem celular de glioblastoma) serão cultivadas em meio adequado e mantidas incubados em 5% de CO₂ a 37°C. As células serão semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1 × 10⁴ por poço e serão tratados com concentrações crescentes das nanopartículas (NP_{TMZ} e NP_{DXM}) e controles negativos (nanopartícula sem fármaco) e positivo (Triton-X) serão incluídos nas mesmas placas. Cada amostra será adicionada a dois poços em uma mesma placa e três placas diferentes serão analisadas. Após 4, 8 e 24 horas de tratamento, as células serão submetidas ao ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) conforme protocolo estabelecido. A absorbância será medida a 540 nm no espectrofotômetro Spectramax M2e (Molecular Devices, CA, USA).

5.2.4.2 Protocolos de tratamento sub-crônico e agudo: as linhagens serão tratadas com nanopartículas (NP_{TMZ}) em concentrações estabelecidas conforme ensaios prévios de viabilidade celular. Os esquemas de tratamento seguirão um protocolo sub-crônico e outro agudo.

5.2.4.3 Protocolo de tratamento clínico: as linhagens serão tratadas com as nanopartículas (NP_{TMZ}), em concentrações estabelecidas conforme ensaios prévios de viabilidade celular.

5.2.4.4 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 com as nanopartículas 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 590 nm no espectrofotômetro Spectramax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

5.2.4.5 Proliferação celular por ensaio clonogênico: o ensaio baseia-se na capacidade de uma única célula crescer e formar colônias. As células remanescentes dos esquemas de tratamento serão separadas em diluições apropriadas para formar colônias em torno de 15 dias. As colônias serão fixadas com solução de ácido acético e metanol (3:1), coradas com cristal violeta (1% m/v) e contadas.

5.2.4.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD): a atividade da SOD será determinada conforme³⁰, e os resultados serão expressos em unidades de SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como o montante da enzima capaz de inibir a taxa de formação de adrenocromo em 50%.

5.2.4.7 Atividade da enzima catalase (CAT): a atividade da CAT será determinada pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, conforme³⁰, e os resultados serão expressos em unidades de CAT/mg de proteína.

5.2.4.8 Atividade da enzima glutathione-peroxidase (GPx): a atividade da GPx será determinada pelo consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx³¹.

5.2.4.9 Detecção da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS): os níveis intracelulares de ROS serão estimados a sonda fluorescente H2DCF-DA, que ao penetrar no meio intracelular é oxidada por peroxidases e convertida em DCF, que é altamente fluorescente. Dados serão coletados por citômetro de fluxo FACS Calibur e analisados pelo software CellQuest Pro, onde um total de 10000 eventos serão coletados por amostra.

5.2.4.10 Avaliação do estresse oxidativo mitocondrial (MitoSOX): 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, onde um total de 10000 eventos serão coletados por amostra.

5.2.4.11 Efeitos das formulações sobre as vias de sinalização PI3K/Akt e ERK1/2: as linhagens serão tratadas por 1 h com os inibidores de PI3K/Akt e ERK1/2, e então tratadas com as concentrações de IC₂₅ e IC₅₀ das formulações nos tempos pré-determinados. Após, a viabilidade celular será verificada através do ensaio de captação do corante vermelho neutro e confirmação da inibição será verificada por *western blotting*.

5.2.4.12 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 (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e analisados pelo software CellQuest Pro (Becton Dickinson), onde um total de 10000 eventos serão coletados por amostra.

5.2.4.13 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.

5.2.4.14 Avaliação da influência da DXM: As linhagens celulares de glioma serão tratadas com dexametasona (NP_{DXM}) com concentração a ser definida em análise preliminar por 5 dias e temozolomida (NP_{TMZ}) na concentração de 75 µM por 5 dias. Após as células passarão 72 h em repouso com meio de cultura padrão livre de fármacos, como forma de recuperação. Com esse regime teremos diferentes grupos: controle (DMEM), dexametasona, TMZ e dexametasona + TMZ (terapia combinada). A partir daí, serão avaliadas conforme itens 5.4.2.15 a 5.4.2.17.

5.2.4.15 Avaliação sobre o crescimento *in vitro* dos gliomas: A proliferação celular das culturas tratadas será avaliada pelos métodos de proliferação celular (SRB), viabilidade celular (MTT), migração celular (*scratch assay*), ensaio clonogênico e citometria de fluxo para ciclo e morte celular (necrose e apoptose utilizando AnnexinV/Pi) seguindo os padrões da literatura.

5.2.4.16 Citometria de fluxo: A expressão de CD73 será avaliada por citometria de fluxo de acordo com literatura específica.

5.2.4.17 Dosagem de citocinas: As citocinas IL-10, TNF- α , TGF- β , IL-1 β e MCP-1 serão dosadas no sobrenadante das culturas celulares pelo método de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (*R&D Systems*).

5.2.5 Análises estatísticas

Os resultados de todos os procedimentos experimentais serão analisados estatisticamente mediante a aplicação de técnicas estatísticas apropriadas. Serão utilizados análise de variância ANOVA, teste de Tukey e pós-teste de Dunnett, podendo ser incluídos outros testes se necessário. O software Graph Pad Prism 6.0 será utilizado e os valores serão considerados estatisticamente significantes para $P < 0,05$.

6. Cronograma para um ano de execução do projeto (conforme item a.1 - vi da seção 4.4 do Edital PROPPG Nº 10/2022).

Atividade	TRI 1	TRI 2	TRI 3	TRI 4
Revisão da literatura	X	X	X	X
Desenvolver e validar um método analítico de quantificação da temozolomida.	X	X		
Desenvolver e validar um método analítico de quantificação da dexametasona.	X	X		
Incorporar temozolomida nas nanopartículas e caracterizá-las em termos de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, análise morfológica, análise térmica, estabilidade, teor e eficiência de encapsulação.		X	X	X
Avaliar o perfil de liberação da temozolomida encapsulada nas nanopartículas.			X	X
Treinamento dos alunos nas técnicas necessárias.	X	X	X	X
Análise dos resultados.	X	X	X	X
Redação de resumo para conferência e um artigo científico.		X		X

7. Produtos esperados como resultado da execução do projeto

i) Ao final do primeiro ano de execução, pretende-se obter ao menos uma nova nanopartícula (nanocápsula com núcleo composto de óleo de babaçu) com características nanotecnológicas adequadas em termos de tamanho e estabilidade; ii) ao final do segundo ano de execução será produzida ao menos uma NPs otimizada com temozolomida encapsulada com características nanotecnológicas adequadas em termos de tamanho, estabilidade, eficiência de encapsulação e controle de liberação; iii) Até o final do projeto espera-se que testes preliminares *in vitro* mostrem a viabilidade em células de glioblastoma para a aplicação da(s) nanopartícula(s) inovadora(s) na produção de novos medicamentos a partir da incorporação da(s) nanopartícula(s) a uma forma farmacêutica apropriada.

Ao final do projeto, poderá ser obtida ao menos uma **nova nanopartícula** com fortes indicativos de efeito para o tratamento do **glioblastoma** e, eventualmente, parcerias (públicas e privadas, acadêmicas e industriais) para testes pré-clínicos e clínicos poderão ser criadas a fim de **transladar a pesquisa científica em produto comercializável**. Contribuindo assim para a saúde pública, sabendo que a importância de um medicamento novo reside em valor terapêutico e também em benefícios que se produzem para os pacientes e para a sociedade como um todo.

Os estudos, realizados em consórcio com as áreas biológica e toxicológica permitirão uma formação integrada de recursos humanos bem como incremento da produção intelectual com publicações de artigos em periódicos Qualis A1 internacional, de acordo com normas para a proteção intelectual, e de possível depósito de pedido de patente.

8. Potencial de impacto dos resultados do ponto de vista técnico-científico, de inovação e/ou difusão

O projeto visa a contribuir com informações relevantes em um aspecto multidisciplinar. Trata-se de um projeto com o intuito de esclarecer questões que envolvem a preparação de nanopartículas e a influência de diferentes componentes que possuem funções estruturais e funcionais tanto nas propriedades físico-químicas como biológicas desses sistemas. A proposta desse projeto é **inovadora**, pois serão utilizados excipientes de fontes naturais e renováveis, combinados em uma formulação **nanoestruturada**. O projeto possui potencial para produção de uma **plataforma** de formulações para administração de moléculas com efeito terapêutico.

Nos campos **técnico e científico**, pretende-se enriquecer o conhecimento acerca de fatores cruciais na produção de nanocápsulas com núcleo lipídico formado por óleo de babaçu. A consolidação da área de pesquisa em

nanomedicina na UFCSPA é outra contribuição científica, além da capacitação de alunos de graduação e pós-graduação. O projeto inclui como objetivo possibilitar a **formação de recursos humanos** com conhecimento multi- e interdisciplinar capacitados a desenvolver pesquisa na área de *drug delivery* e físico-química de coloides com conhecimento científico sólido em métodos de caracterização físico-química, bem como técnicas *in vitro* de avaliação dos nanossistemas.

Nas áreas **tecnológica e de inovação** entende-se que o projeto poderá gerar um ou mais produtos **nanotecnológicos** a serem desenvolvidos em parceria com possível empresa interessada. É importante ressaltar, que produtos nanotecnológicos encontram-se no mercado nas áreas farmacêuticas e cosmética (exemplos: Abraxame® - Abraxis Bioscience e Photoprot® - Biolab), demonstrando a viabilidades de escalonamento dessas formulações. Apesar da pesquisa proposta nesse projeto ser caracterizada como pesquisa científica, devido ao caráter investigativo básico envolvido na produção de novas nanopartículas, é de extrema importância a consciência da possibilidade de **viabilidade tecnológica e inovadora** da proposta. Além disso, devido à forte interação entre a UFCSPA e o Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (HSCMPA) acredita-se que estes estudos poderão eventualmente ser conduzidos em parceria ampliando a **pesquisa translacional** focada na **nanomedicina**. Isso trará para a Instituição a qualificação da produção científica centrada na formação integrada de recursos humanos de áreas afins de forma estratégica para atender as demandas da sociedade.

9. Colaborações para execução do projeto e infra-estrutura

A proponente possui uma rede de colaborações com docentes de instituições nacionais que possibilitam a execução de todas as etapas do projeto. A maior parte do projeto será executada no Laboratório de Imunoterapia da UFCSPA e algumas análises para a caracterização físico-química, com por exemplo, a análise de tamanho das partículas por espalhamento de luz dinâmico, será realizada em laboratório da UFRGS. Embora um grande número de experimentos sejam propostos no projeto, a rede de colaboradores irá **trabalhar em paralelo** nas atividades que envolvem avaliação biológica *in vitro* após a obtenção das NPs de forma a viabilizar a execução de todas as metas propostas. Na UFCSPA, a proponente possui parcerias com professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências (Dra Dinara Jaqueline Moura e Dra Elizandra Braganhol – colaboradoras diretas nesse projeto, e outros) e também do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde em diferentes áreas do conhecimento, o que torna este projeto extremamente interessante e completo. Atualmente um aluno de Doutorado do PPG Biociências, M.Sc. Jeferson Gustavo Henn, está diretamente vinculado ao projeto. Além disso, alunos de iniciação científica dos Cursos de Graduação em Química Medicinal, Farmácia e Medicina estão diretamente vinculados ao projeto. Novos alunos de graduação e de pós-graduação também poderão eventualmente ser vinculados, sendo inicialmente treinados em todas as etapas do trabalho.

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, destiladores, sala de cultura, sala de lavagem e esterilização para o cultivo de células, espectrofotômetro, citômetro de fluxo, microscópio de fluorescência e termocicladores para PCR em tempo real. Além disso, a Central Analítica da UFCSPA também é um espaço multiusuário e possui cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector DAD e de Fluorescência. 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).

10. Resultados preliminares

Esse projeto teve o início da execução em 2019 (tendo sido parcialmente paralisado em 2020 e 2021 devido à pandemia de COVID -19) com a participação de alunos de graduação e de pós-graduação os quais trabalharam nas metas 1 à 4, tendo finalizado as duas primeiras.

11. Orçamento

Encontra-se em material anexo, conforme item a.5 da seção 4.4 do Edital PROPPG nº 10/2022.

Referências

1. Merali, Z. This 1,600-Year-Old Goblet Shows that the Romans Were Nanotechnology Pioneers Read more: <https://www.smithsonianmag.com/history/this-1600-year-old-goblet-shows-that-the-romans-were-nanotechnology-pioneers>. *Smithsonian Magazine*.
2. Markets, R. and. Global Nanotechnology Market 2018-2024: Market is Expected to Exceed US\$ 125 Billion. *PRNewswire* <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-nanotechnology-market-2018-2024-market-is-expected-to-exceed-us-125-billion-300641054.html> (2018).
3. Jia, L. Global Governmental Investment in Nanotechnologies Lee. *Curr Nanosci* **1**, 263–266 (2005).
4. Society, T. R. *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. (Latimer Trend Ltd, Plymouth, UK, 2004).
5. Mora-huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **385**, 113–142 (2010).
6. Mg, K., Krenn, V., Huebner, F., Wagner, W. & Resch, R. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress Nanomedicine & Nanotechnology. **6**, (2015).
7. Perspectives, H. Nanoparticles — a historical perspective. **331**, 1–10 (2007).
8. Barenholz, Y. C. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug : Lessons learned. *J. Control. Release* **160**, 117–134 (2012).
9. Ragelle, H., Danhier, F., Préat, V., Langer, R. & Anderson, G. Expert Opinion on Drug Delivery Nanoparticle-based drug delivery systems : a commercial and regulatory outlook as the field matures. *Expert Opin. Drug Deliv.* **14**, 851–864 (2017).
10. Drugs@FDA. Drugs@FDA. *US. Food and drug administration* <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/> (2022).
11. Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* **20094** **4**, 99–106 (2009).
12. Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., E, L. de L. F. & Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* **26**, 726–737 (2003).
13. Badri, W., Miladi, K., Nazari, Q. A., Fessi, H. & Elaissari, A. Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (2016) doi:10.1016/j.colsurfa.2016.12.029.
14. Miladi, K. *et al.* Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI J.* **13**, 28–57 (2014).
15. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55**, R1–R4 (1989).
16. Instituto Nacional de Câncer. Câncer do sistema nervoso central. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central> (2022).
17. WHO. Cancer Today. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i (2022).
18. Verano-braga, T., Gorshkov, V., Munthe, S. & Sørensen, M. D. SuperQuant-assisted comparative proteome analysis of glioblastoma subpopulations allows for identification of potential novel therapeutic targets and cell markers. *Oncotarget* **9**, 9400–9414 (2018).
19. Saúde, M. da. *Protocolos Clínicos E Diretrizes Terapêuticas em Oncologia*. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_clinicos_diretrizes_terapeuticas_oncologia.pdf (2014).
20. Ohka, F., Natsume, A. & Wakabayashi, T. Current Trends in Targeted Therapies for GlioblastomaMultiforme Fumiharu. *Neurol. Res. Int.* (2012) doi:10.1155/2012/878425.
21. Housman, G. *et al.* Drug Resistance in Cancer : An Overview. *Cancers (Basel)*. **6**, 1769–1792 (2014).
22. Research, C. I. of H. DrugBank. <https://www.drugbank.ca/>.
23. Paolillo, M., Boselli, C. & Schinelli, S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sci.* **8**, (2018).
24. Cenciarini, M. *et al.* Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).
25. Ivan Caramanna, I. *et al.*, EORTC Brain Tumor Group, Corticosteroids use and neurocognitive functioning in patients with recurrent glioblastoma: evidence from European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) trial 26101, *Neuro-Oncology Practice*, (2022).

26. Ozdemir-kaynak, E., Qutub, A. A. & Yesil-celiktas, O. Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment : New Models for Nanoparticle Therapy. *Front. Physiol.* **9**, 1–14 (2018).
27. Ananta, J. S., Paulmurugan, R. & Massoud, T. F. Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation. *Neurol. Res.* **38**, 51–59 (2016).
28. Chu, L. *et al.* Nose-to-brain delivery of temozolomide-loaded PLGA nanoparticles functionalized with anti-EPHA3 for glioblastoma targeting. *Drug Deliv.* **25**, 1634–1641 (2018).
29. Jain, D. *et al.* Surface-coated PLA nanoparticles loaded with temozolomide for improved brain deposition and potential treatment of gliomas: development, characterization and in vivo studies. *Drug Deliv.* **23**, 989–1006 (2016).
30. Misra, H. P. & Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3170–5 (1972).
31. Flohé, L. & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114–120 (1984).

Desenvolvimento e aplicação de novas metodologias de microamostragem baseadas em interações líquido-líquido na determinação de NPS em matrizes biológicas *postmortem*.

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 caracterizados materiais para interações líquido-líquido que incluem diferentes solventes de hidrofiliabilidade comutável (SHS). 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. **Palavras-chave:** Novas substâncias psicoativas; microamostragem; SHS; análises *postmortem*.

1. DADOS DO PROPONENTE E COLABORADORES

Proponente

- Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/0040291517754373>

Pesquisadores Associados com Bolsa de Produtividade

- Mauricio Yonamine, PQ Nível 1D, USP, SP.
<http://lattes.cnpq.br/2665536223113975>
- José Luiz da Costa, PQ Nível 2, UNICAMP, SP.
<http://lattes.cnpq.br/9846018023731358>

Pesquisadores Associados

- André Valle de Bairros, UFSM, RS.
<http://lattes.cnpq.br/9350662167425345>
- Sarah Eller, UFCSPA, RS.
<http://lattes.cnpq.br/9846018023731358>
- Daniel Scolmeister, DPL-IGP, RS.
<http://lattes.cnpq.br/0675742044754836>

2. ÁREA DE CONHECIMENTO PREDOMINANTE

Análises Toxicológicas e Toxicologia Forense

3. INSTITUIÇÃO PARTICIPANTES

Instituições de Ensino Superior

- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, RS.
- Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS.
- 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.

4. CARACTERIZAÇÃO DA PROPOSTA

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, as interações líquido-líquido serão explorados nesta proposta sendo apresentadas a seguir.

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 hidrofiliidade 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 par iônico [18, 19].

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 1**, 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 [20]. 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 [21, 22].

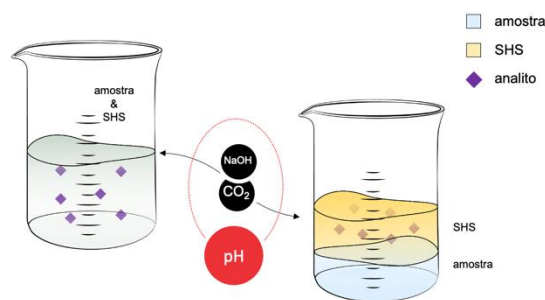


Figura 1. Comportamento de um solvente de hidrofilicidade comutável quando ocorre a adição ou remoção de CO_2 .

O uso desses solventes na HLLME foi denominado microextração líquido-líquido homogênea com solvente de hidrofilicidade 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 [21]. 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 [23].

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 [22]. 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 [24].

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 de alto impacto.

6. OBJETIVO

Objetivo Geral

Desenvolvimento e a subsequente aplicação de novas metodologias de microamostragem, baseadas em interações líquido-líquido, associadas à métodos de espectrometria de massas na determinação de NPS em diferentes amostras biológicas.

Objetivos Específicos

- i. Promover soluções analíticas modernas para as demandas na rotina das análises toxicológicas;
- ii. Caracterizar novos SHS para a construção de metodologias de microamostragem baseada em interações líquido-líquido e, subsequentemente, aplicá-los na rotina das análises toxicológicas;
- iii. Validar todas as metodologias propostas seguindo guias internacionais e realizar a transferência de tecnologia para o DPL-IGP, RS;

- iv. 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;
- v. Participar de redes de alerta nacionais e internacionais para apontar as semelhanças e disparidades entre regiões geográficas quanto ao consumo de drogas;
- vi. Formar recursos humanos altamente especializados por meio do envolvimento de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado no projeto;
- vii. Fortalecer rede de pesquisadores estabelecida quando da realização do estudo, assim como agregar novos pesquisadores com expertise no tema proposto;
- viii. Divulgar os resultados do projeto por meio de publicações científicas de alto impacto (Qualis CAPES A1 e A2).

7. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

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.

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.

Infraestrutura e equipamentos

As análises serão realizadas na Central Analítica da UFCSPA, laboratório que 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. Dentre os diferentes equipamentos disponibilizados (<https://www.analiticaufcspa.org>) os seguintes serão utilizados:

- 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).

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.

Desenvolvimento de métodos por UHPLC-MS

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. 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. 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.

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* [25] e *ANSI/ASB Standard 036 for Method Validation in Forensic Toxicology* [26] 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.

Responsabilidades institucionais

O delineamento experimental e desenvolvimento metodológico serão de responsabilidade do proponente e da equipe vinculados à UFCSPA. 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. Fortalecimento de ações colaborativas entre as Instituições de Ensino Superior e a Instituição de Segurança Pública participantes;
- iv. Estabelecer e fortalecer rede de colaboração entre pesquisadores de instituições de ensino e pesquisa estaduais e nacionais;
- v. Propiciar formação qualificada de pesquisadores de diversas áreas da saúde em nível de mestrado, doutorado e pós-doutorado;
- vi. 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 caracterização e aplicação dos materiais citados.

Cronograma (12 meses)							
	Atividade	Tempo (meses de execução)					
		1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
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	Caracterizar novos SHS para a construção de metodologias de microamostragem baseada em interações líquido-líquido	X	X				
5	Validação das metodologias desenvolvidas		X	X	X		
6	Implementação das técnicas desenvolvidas em amostras reais				X	X	
7	Análises estatísticas dos resultados da determinação de NPS em matrizes biológicas				X	X	X
8	Reuniões com a equipe da Instituição de Segurança Pública para análise dos resultados e discussão dos dados obtidos			X	X	X	X
9	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
10	Transferência de tecnologia para as instituições parceiras					X	X
11	Redação resumos para congressos; apresentação			X	X	X	X
12	Redação de artigos para publicação			X	X	X	X
13	Redação do Relatório Final						X

10. ORÇAMENTO

Orçamento detalhado					
Descrição			Quant.	Descrição	Valor
Custeio	Reagentes e insumos	Microtubo, graduado, com fundo cônico, tampa lisa/reta com trava, cor transparente, fabricado em polipropileno atóxico com 99,9% de pureza; autoclavável a 120 oC por até 15 minutos; resistentes à centrifugação de até 20.000 Rcf; [produto livre de dnase, rnase e pirogênicos; capacidade de 1,5 mL.	20	pacote com 500 unidades	R\$ 409,00
		Placa de cultura de 24 poços fundo chato, com superfície lisa tratada, laterais elevadas, identificação alfanumérica, tampa com anel de vedação individual em cada poço, fabricado em poliestireno, identificação, livre de DNase, RNase e pirogênicos, esterilizado por radiação gama, livre de substâncias citotóxicas, embalagem individual.	200	unidade	R\$ 2856,00
		Estante dupla face para 60 microtubos de 0,5/1,5/2,0 mL	20	unidade	R\$ 249,40
		Insert de 250 ul, de vidro, com mola depp, para vial de 2 mL n9, 29 x 5,7, caixa com 100 unidades	27	caixa c/ 100 unids	R\$ 3061,53
		Vial 9-425, 2 mL, para tampa de rosca, transparente, com tarja, caixa com 100 unidades	10	caixa c/ 100 unids	R\$ 592,30
		Tampa de rosca, azul, 9-425, septo 9 mm, silicone/PTFE, vermelho/branco, cx c/ 100 unids	10	caixa c/ 100 unids	R\$ 498,90
		Acetonitrila grau LC-MS	3	Galão com 2,5 litros	R\$ 2367,00
		N,N-Dimetilciclohexilamina, 99% de pureza	1	Frasco com 1L	R\$ 742,00
		Dipropilamina, 99% de pureza	1	Frasco com 1L	R\$ 468,00
		Ácido hexanóico, natural, >97% de pureza	1	Frasco com 1 kg	R\$ 377,00
		Ácido di-(2-etil-hexil)-fosfórico, 97% de pureza	1	Frasco com 25 g	R\$ 285,00
		TOTAL			

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] 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.
- [19] Lasarte-Aragónés, G., et al. Use of switchable solvents in the microextraction context. *Talanta* 131 (2015) 645-649.
- [20] Jessop, P.G., et al. A solvent having switchable hydrophilicity. *Green Chemistry* 12 (2010) 809-81.
- [21] Vanderveen, J.R., et al. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents. *Green Chemistry* 16 (2014) 1187-1197.
- [22] 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.
- [23] Jessop, P.G., et al. Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity. *Green Chemistry*, 13 (2011) 619-623.
- [24] 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).
- [25] 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.
- [26] 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.

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. A metodologia de LAMP não necessita de equipamentos sofisticados, uma vez que consiste em um processo de amplificação isotérmica, podendo ser realizada em um banho-maria e a análise dos resultados consiste apenas na inspeção visual da mudança de cor da reação. 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, inclusive em laboratórios com pouco acesso a equipamentos de alto custo.

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 concatêmeros 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 30 a 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. Serão analisadas 20 amostras de cada uma das seguintes espécies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*.

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 5.1.1, as amostras serão fervidas por 5 minutos a 95°C na presença de Chelex a 5%.

5.2. PCR

As sequências dos primers a serem utilizados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – sequência dos *primers* para detecção de espécies do gênero *Candida* pela técnica de LAMP

Espécie	<i>primers</i>
<i>Candida albicans</i> ¹	F3 GTTGGCAAAATATCAATGGTAA B3 GTAACTCAGAAGCTGGAAC FIP AGCTTGGAAGGCATCAATAATATCTATCGATGTTCTTTAGATTCTGGT BIP GACGGTCAAGGTCATACTTTCTATGAAATCTGGCGTTGTTGTC LF TGAGCAACATCTTGTTGAAGATAAGT LB TTAAGTATTGTCAAACCTCTGGAAC
<i>Candida glabrata</i> ²	F3 TGGTAGTGAGTGATACTCGTT B3 CTAAAGACGTCTGTCTGCC FIP GCAGATTAATAGAGAAGCTTGCGCTGAGTTAACTTGAAATTGTAGGCC BIP GCGGCGGGGTTAATACTGTCAAAAACACTCACTTATCCCT LF GGTGTTTACCAACTCGGTGTTGATCT
<i>Candida tropicalis</i> ²	F3 TTTGGTATTCCAAAGGGC B3 AGTCCTACCTGATTGAGGT FIP CCTAGCGTATTGCTCAACACCAATGCCTGTTTGAGCGTCA BIP ACGTGGAACTTATTTAAGCGACTATAAATTGTTGGGCCACTAG LF CCGGGGGTTTGAGGGAGAAA
<i>Candida orthopsilosis</i> ³	F3 TTGTCGCTTCTGACAACT B3 TTGTTCCATCTTTGTACCTG FIP TGGCATTGGCAATATCACGGTAATCAGCCGTGTATTAAGGAC BIP ACGAGGATAAAGCATTGCAAAAAGCTTTATTTGCGTCTACTAAATTGAC LF ATCTTTTCAGCTATCCCA LB GAAACTGCGTATCAAAGGTC
<i>Candida parapsilosis</i> ³	F3 TGATCTTTGTGGTACGGTAA B3 CATCACTGACAGCAAACG FIP ACCTCTCCTTGATTGCTTTAACATACATCTATCTCAATGACAAGCGA BIP CCAGAGCCAGAAGGAGAAGGCCACTTCCCATCTTTCGT LF CATAGCTCTTGAAGCTAGTGACGGG LB CCCAAGAATTACACCACAATTGTAC
<i>Candida metapsilosis</i> ³	F3 CATTGAAAATCCCGCATTCA B3 CTTCCGTCACATTTTGTGCA FIP GGCTACGAATTTTCTTTACCTCCACATCCCAACAAAGGAGCA BIP ACCTTATTGCCCGTGTATTGAAAGCCTTATCTTCATTAGCGTTG LF GAGACACCTTTGTTGTTAG LB CCGGAATAGCTGAAAAGATTCTG

Fonte: ¹ Lin et al., 2021; ² Kasahara et al., 2014; ³ Trabasso et al., 2014

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 MgCl₂, 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, 900µM de cada dNTP, 0,8M de betaína, 3mM de MgCl₂ 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.

5.6. 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.

6. 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												

7. 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.

8. 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.

9. 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.

Lin X, Jin X, Du W, Shan X, Huang Q, Fu R, Lv W, Yang H, Su Y, Huang G. Quantitative and specific detection of viable pathogens on a portable microfluidic chip system by combining improved propidium monoazide (PMAxx) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal. Methods*. 2021; 13: 3569-3576.

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/josnurd.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* Ssensu 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: 0.1128/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.